مقاله پژوهشی

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

رزاق محمودی[1]*، پیمان زارع[2]، سوما نصرت پور[3]، کریم مردانی[4]، ابوالفضل صفری[5]

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^{3}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 ازنظر خصوصیات ارگانولپتیکی، بقا و نابودی سالمونلا و قابلیت ماندگاری باکتری پروبیوتیک موردبررسی 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. بااین‌وجود 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 ازنظر ممانعت رشد سالمونلا تیفی موریوم و نیز ازنظر 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 موردنیاز 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).

[1] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز (نویسنده مسئول)

[2] استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

[3] دانش آموخته دکتری حرفه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

[4] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[5] کارشناس آزمایشگاه کنترل کیفی، کارخانه شیر پگاه تبریز

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی با داشتن ترکیبات متنوع بیولوژیک و فیزیولوژیک، از توان بسیار بالایی جهت به‌کارگیری‌شان به‌عنوان 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 حذف‌کننده رادیکال آزاد به‌عنوان 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 به‌عنوان گیاهان دارویی از سال‌ها قبل به‌عنوان مدر، ضد تب، معرق، مقوی، ضد اسپاسم و ... استفاده شده است. این گیاه در طب سنتی ایران نیز به‌عنوان داروی ضد اسپاسم، ضد درد و کاهنده چربی خون استفاده به کار رفته است. همچنین از این گیاه به‌عنوان ادویه در غذا و در برطرف کردن بیماری‌های معده و درمان زخم‌ها استفاده شده است (۶).

کاربرد پروبیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها به‌عنوان افزودنی‌های بیولوژیک، به‌طور گسترده‌ای موردمطالعه قرارگرفته 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 ضدمیکروبی‌شان، 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 به‌طور 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 به‌ویژه 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 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 ازنظر 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 گازکروماتوگراف از نوع Agilent 6890 با ستون موبینه 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 به‌عنوان 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 ومحاسبه میزان تلقیح باکتری‌های مورد مطالعه: باکتری سالمونلا تیفی موریوم ATCC۱۳۳۱۱ از بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز تهیه و محاسبه میزان باکتری لازم ($۱۰^۳$ cfu/ml) جهت تلقیح در شیر با استفاده از

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 نمونه‌های شیر مشخص شد (۱۰). باکتری لاکتو باسیلوس اسیوفیلوس ATCC۴۳۵۶ تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌عنوان 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 میلی‌لیتر 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 باکتری‌های 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 غلظت‌های 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). استارتر بکار رفته در این مطالعه ترموفیل شامل باکتری‌های استرپتوکوکوس سالیواریوس تحت گونه ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکئه 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 استارتر 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 نمونه‌ها اضافه شد. سپس حجم مورد نیاز از اسانس مذکور برای ایجاد غلظت‌های 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 نمونه‌ها به ۰/۶ درصد (بر حسب اسید لاکتیک) تیمارها به یخچال ۴ درجه سانتی گراد منتقل و به مدت ۴ هفته جهت انجام آزمون‌های مورد نظر نگهداری شدند.

نمونه برداری از تیمارها و شمارش باکتری‌ها: برای نمونه برداری از تیمارها ابتدا نمونه‌ها 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 رقت‌ها از آن تهیه شده و از رقت‌های اولیه برای کشت بر روی سالمونلا شیگلا آگار (SS agar) و از رقت‌های 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 پیپت پاستور بر روی محیط کشت پخش شد، محیط SS agar به مدت ۲۴ ساعت و MRS agarبه مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس شمارش‌ها انجام شد. در روز آخر نمونه برداری برای ارزیابی حضور و عدم حضور باکتری سالمونلا تیفی موریوم در تیمارها از روش PCRاستفاده شد که در این روش از ژن hilA به‌عنوان ژن اختصاصی سالمونلا برای تعیین حضور آن استفاده شد.

ارزیابی PCR: از ژن hilA به‌عنوان یک ژن اختصاصی سالمونلا برای تعیین حضور سالمونلا تایفی موریوم استفاده گردید. پرایمرهای hilA سالمونلا پیشین و معکوس به ترتیب hilA-F GTCCGGTCGTAGTGGTGTCT وhilA-R CGCATACTGCGATAATCCCT با سایز ۴۹۷amplicon زوج باز (۱۱) می‌باشد. نمونه و یاDNA استخراجی از آن به‌عنوان الگویی 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 MgCl2,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.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

الکتروفورز محصول پی سی آر(15 µl) با agarose gel (%1) 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:

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) وLSD انجام شد، لازم به ذکر است تمام تحلیل‌های آماری با نرم افزار SPSS۱۷ مورد بررسی قرارگرفت. نتایج معنی دار در P<۰/۰۵ مد نظر قرار گرفت.

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

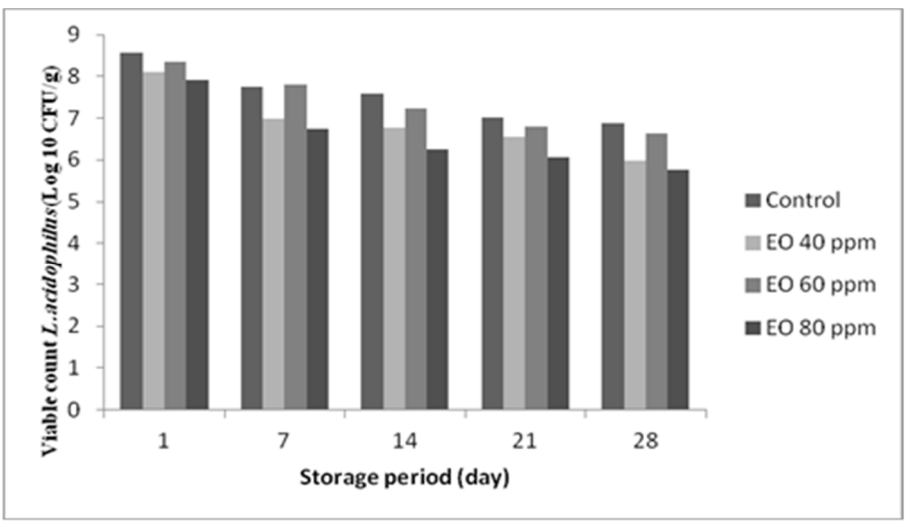
شماره ترکیب	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	درصد
۱	Verbenene	۶/۹۷	۱/۲۵
۲	Beta –Pinene	۷/۵۹	۱۱/۰۲
۳	Beta.-Myrcene	۷/۹۳	۱۰/۰۵
۴	Benzene, 1-methyl	۸/۸۸	۱/۶۶
۵	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)	۹/۰۱	۲/۰۰
۶	2,3,3-Trimethyl-3-cyclopentene acetaldehyde	۱۱/۸۰	۱/۷۱
۷	Bicyclogermacrene	۱۲/۴۹	۸/۲۵
۸	Benzene	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

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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

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

×: 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.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]



تصویر (۲): ژل الکتروفورز حاصل از PCRنمونه‌های 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 (۱۰/۰۵ درصد)، B Germacrene (۱۰/۱۱ 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، تری ترپن ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، استرول‌ها و تانن ها گزارش شده است که در این میان ترکیباتی همچون فلاونوئید ها (از ترکیبات پایه و مهم گروه فنل ها) و تانن ها 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 فنل ها جزء ترکیبات اصلی و پایه موجود در اسانس می‌باشند.

خصوصیات ارگانولپتیکی: خصوصیات ارگانولپتیک نمونه‌های مختلف ماست بررسی و میانگین نتایج ارزیابی شده طی نگهداری ۲۸ روز در جدول ۲ ارائه شده است. تفاوت‌های قابل ملاحظه ای ($P<۰/۰۵$) در خصوصیات طعمی و حسی نمونه‌های مختلف ماست به‌ویژه تیمارهای واجد اسانس و پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. غلظت ppm ۴۰ 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 ($P<۰/۰۵$). 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 پروبیوتیک ها، می‌توان از غلظت‌های پائین تری از اسانس‌ها جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی و اثرات نامطلوب غلظت‌های بالاتر اسانس‌ها بر خصوصیات ارگانولپتیکی 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 ($P<۰/۰۵$)(شکل ۱). در مطالعه حاضر با توجه به نتایج حاصل از شمارش لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، تیمار ماست پروبیوتیک حاوی اسانس کلپوره (۶۰ppm) بالاترین میزان ماندگاری باکتری پروبیوتیک (۶/۴۲ Log cfu/g) در انتهای دوره نگهداری ماست را داشت ($P<۰/۰۵$). کمترین میزان قابلیت ماندگاری پروبیوتیک (۵/۲۸ cfu/g) در نمونه ماست پروبیوتیک آلوده به سالمونلا گزارش شد (شکل ۱). در بالاترین غلظت بکار رفته اسانس در این مطالعه قابلیت ماندگاری پروبیوتیک (Log ۵/۴۳ cfu/g) در ماست در مقایسه با سایر غلظت‌های آن کمتر بود ($P<۰/۰۵$). 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

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 Zizophora clinopodioides روی فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بعنوان کشت استارتر ماست توسط صزبی-جماب و نیازمن، تأثیر نعناع، آویشن و سیر توسط سیمسک و همکاران (۱۵) و نیز نتایج مربوط به Ziziphoraتوسط 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 باکتری‌ای 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 و۴ میکرولیتری اسانس فاقد تأثیر بر روی اشرشیاکلی بوده و غلظت ۲ میکرولیتر نیز بر استافیلوکوکوس اروئوس بی تأثیر بوده است، اما با بکارگیری غلظت ۴ میکرولیتر در مورد استافیلوکوکوس اروئوس 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 اروئوس 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). بااین‌وجود 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 سالمونلاتیفی موریوم برخوردار می‌باشد، با توجه به اهمیت سالمونلاتیفی 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 propertied and potential application in food-a review. Int Food microbial 2004; 94: 223-53.
3. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychass r. Inhibtion of Oregano essential and

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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 hilA. Appl Env Microbiol 2000; 66 (12): 5248–52.
12. Meilgaard MC, Civille GV, Carr BT. Sensory evalution techniques. 2nd 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, Gariepy 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. Oganesian GB, Galstyan AM, Mantsatanyan VA, Shashakov AS, Agababjiyan PV. Phenyl propanoid glycosidded of teucrium polium. Chemistry of natural compounds 1991; 27(5): 556-9.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]

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

Razzagh Mahmoudi[*1], *Payman Zare*[2], *Soma Nosratpour*[3], *Karim Mardani*[4], *Abolfazl Safari*[5]

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

[1] *Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran*
[3] *D.V.M., Department of Food Hygiene and Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran*
[4] *Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[5] *BSc., Quality Control Laboratory, Pegah Milk Factory Tabriz, Tabriz, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-03-28]