اثرات ترکیبی اسانس میخک و عصاره دانه انگور بر روی عوامل فساد باکتریایی پَتی گوشت گاومیش در دمای نگهداری ۸ درجه سانتی گراد

عذرا فرهنگ فر[۱]، حسین تاجیک[۲*]، سید مهدی رضوی روحانی[۳]، مهران مرادی[۴] و جواد علی اکبرلو[۵]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش:۹۰/۲/۲۰

۱-دانش آموخته دکتری دامپزشکی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۲-دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۳- استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۴- دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
۵- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
*مسئول مکاتبه: E mail: h.tajik@urmia.ac.ir

چکیده:
در این مطالعه اثرات غلظت های مختلف اسانس روغنی میخک (۰/۱ درصد) و عصاره دانه انگور (۰/۱ و ۰/۲ درصد) به تنهایی و به صورت توأم بر روی جمعیت باکتریایی فساد (شامل باکتری های مزوفیل و سرمادوست، باکتری های اسید لاکتیک و گونه های سودوموناس) پَتی گوشت خام گاومیش در درجه حرارت یخچالی نامناسب (۸ درجه سانتی گراد) در طول نگهداری به مدت ۹ روز بررسی گردید. نتایج نشان داد که در پایان ۹ روز نگهداری، اسانس در غلظت ۰/۱ درصد و در مقایسه با گروه کنترل، موجب کاهش معنی داری ($P<۰/۰۵$) در رشد سودوموناس، سرمادوست و باکتری های اسید لاکتیک گردید، ولی بر روی شمارش کلی باکتری های مزوفیل اثر معنی داری نشان نداد ($P>۰/۰۵$). استفاده توام اسانس (۰/۱درصد) و عصاره دانه انگور (۰/۱ و۰/۲ درصد)، اثر معنی داری بر روی باکتری های مزوفیل و سودوموناس نشان نداد ($P>۰/۰۵$). در طول نگهداری پَتی، باکتری های مزوفیل و سرمادوست به ترتیب مقاوم ترین (کاهش ۰/۵-۰ واحد لگاریتمی) و حساس ترین (کاهش ۰/۸-۰ واحد لگاریتمی) عوامل مولد فساد به ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده بودند. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود اثرات ضد میکروبی معنی دار اسانس میخک در کنترل عوامل مولد فساد در مقایسه با گروه کنترل، عصاره دانه انگور در غلظت های مورد استفاده اثرات ضد میکروبی مناسبی در کنترل فساد میکروبی پَتی گوشت گاومیش ندارد.

واژه‌های کلیدی: اسانس میخک، عصاره دانه انگور، فساد، پَتی، گوشت گاومیش

Combined Influence of the Clove Essential oil and Grape Seed Extract on the Spoilage Related Bacteria of Buffalo Patties during the Storage at 8 °C

A Farhangfar[1], H Tajik[2*], SM Razavi Rohani[3], M Moradi[4] and J Aliakbarlu[5]

Received: 16January, 2011 Accepted: 10 May, 2011

[1]Graduated Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
[3]Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
[4]PhD Student of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: h.tajik@urmia.ac.ir

Abstract

In this study, the effect of the clove essential oil (EO) (0.1 %) and grape seed extract (GSE) (0.1 and 0.2 %) alone and in combination with each other on different spoilage related bacteria (mesophilic viable count, psychrotrophic viable count, lactic acid bacteria and *Pseudomonas* spp.) of raw buffalo patties was examined during inadequate refrigeration temperature (8 °C) for 9 days. Results showed that until the end of storage, incorporation of 0.1% EO significantly effect the growth of *Pseudomonas* spp., psychrotrophic and lactic acid bacteria ($P<0.05$) and did not affect growth of mesophilic bacteria. However, combining EO (0.1 %) and GSE (0.1 and 0.2 %) yielded any significant effect on mesophilic bacteria and *Pseudomonas* spp. During the storage of patties, mesophilic and psychrotrophic bacteria were most resistant and sensitive spoilage groups to the agents by 0-0.5 and 0.8 log cycles reduction, respectively. In conclusion, these findings demonstrated that in spite of the efficiency of clove EO for controlling spoilage flora of patty, GSE in mentioned concentrations had not satisfactory inhibitory activity on spoilage bacteria.

Keywords: Clove essential oil, Grape seed extract, Spoilage, patty, Buffalo meat

مقدمه

استفاده از روش های سنتی نگهداری در برخی مواد غذایی تازه، تأثیر نامطلوبی بر جذابیت محصول دارد. از طرفی تولیدکنندگان، به طور قابل توجهی با ممنوعیت استفاده از نگهدارنده های سنتتیک در محصولات خود مواجه هستند. بنابراین جستجو برای یافتن جایگزین طبیعی برای افزودنی های شیمیایی منطقی است، چون طبیعت برای طولانی مدت، منبع مناسبی برای این ترکیبات به شمار می رود (اسمید و گوریس ۲۰۰۷). در سال های اخیر، به طور گسترده ای از ترکیبات طبیعی با منشاء گیاهی در صنعت غذا استفاده می شود. بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان به دست آمده از گیاهان، دارای گستره بزرگی از فعالیت در برابر باکتری ها و قارچ ها و نیز کنترل روند اکسیداسیون در

مواد غذایی هستند. این امر منجر به استفاده از این ترکیبات به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در غذاها می گردد. اسانس ها[1] دسته ای از ترکیبات فرار و معطر گیاه هستند که کاربردهای وسیع و مختلفی در صنایع غذایی، دارویی و عطر سازی دارند. این ترکیبات، مخلوطی از انواع ترکیبات لیپوفیل و فرار با بوی مطبوع است. ترکیبات اسانس های گیاهی شامل ترکیبات فنلی، ترپنی، الکل های آلیفاتیک، آلدئید، کتون، اسیدها و ایزوفلاونوئید است. این ترکیبات به خصوص مواد فنلی، عامل اصلی خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان اسانس ها هستند(بارت ۲۰۰۴).

میخک[2] از خانواده میرتاسه یکی از قدیمی ترین و با ارزش ترین ادویه های مورد استفاده در مشرق زمین است (پارثازاراثی و همکاران ۲۰۰۸). اسانس این گیاه به دلیل داشتن خصوصیات ضد میکروبی و به خصوص ویژگی آنتی اکسیدان، یکی از مهم ترین اسانس های گیاهی است که دارای گستره وسیعی از مصارف در فرآورده‌های غذایی می باشد (کالمبا و کونیکا ۲۰۰۳). سطوح بالای اوژنول اسانس میخک، تأثیرات قوی بیولوژیکی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان را نشان می دهد. این ترکیبات فنلی قادر هستند پروتئین‌ها را دناتوره کرده و با فسفولیپیدهای غشای سلولی واکنش داده و نفوذپذیری آنها را تغییر دهند. همچنین سبب روبش[3] رادیکال‌های آزاد نیز می‌گردند (رهنما ۱۳۸۷).

انگور یکی از قدیمی ترین میوه هایی است که در جهان کشت و بهره برداری می گردد. عصاره دانه انگور[4] به عنوان یکی از محصولات جانبی با ارزش افزوده بالای انگور، از نظر ترکیبات فنلی (این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدان اند) بسیار غنی بوده و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی، با قدرت ضد میکروبی مطرح است. فلاونوئیدها در حدود ۸۵ درصد کل ترکیبات فنلی انگور را تشکیل می دهند (کلوتره و کانداسوامی ۲۰۰۵ و پینلو و همکاران ۲۰۰۶). عصاره دانه انگور دارای اثرات ضد میکروبی بر روی عوامل بیماری زای مواد غذایی است. حساسیت باکتری های گرم مثبت نسبت به عصاره دانه انگور بیشتر از گرم منفی ها است (بانون و همکاران ۲۰۰۷).

یکی از مشکلات اصلی استفاده از اسانس ها در مواد غذایی، بوی شدید این ترکیبات است که خصوصاً در استفاده از غلظت های بالا ایجاد می گردد و متأسفانه در برخی از موارد، اثرات ارگانولپتیک نامناسبی در ماده غذایی ایجاد می نماید. امروزه برای جلوگیری از این حالت، استفاده از روش های ترکیبی (ترکیب اسانس با سایر ترکیبات ضد میکروبی و یا ترکیب اسانس با روش های نگهداری غیر حرارتی)، انکپسولاسیون اسانس ها و افزودن آنها به فیلم ها و پوشش های خوراکی-ضد میکروبی بسیار مورد توجه است (مرادی و همکاران ۲۰۱۰ و تاج کریمی و همکاران ۲۰۱۰). بنابراین این مطالعه با هدف بررسی تأثیرات هم افزایی اسانس روغنی میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی و ترکیبی بر روی باکتری های عامل فساد در پَتی[5] گوشت گاومیش در دمای نگهداری ۸ درجه سانتی گراد انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه اسانس روغنی

به میزان لازم گیاه تازه میخک (گل) از بازار خریداری و اسانس آن به روش تقطیر با آب تهیه و سپس با سولفات سدیم آبگیری و از فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵

[1] Essential oils
[2] Clove (*Syzygium aromaticum*)
[3] Scavenging
[4] Grape seed extract
[5] Patty

میکرونی عبور داده و در ظروف تیره در چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی استفاده گردید. دستگاه گاز کروماتوگرافی از نوع Hewlet Packard 6890N با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به صورت زیر تنظیم گردید: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتیگراد، توقف در این دما به مدت ۶ دقیقه، دمای انتهایی ۲۵۰ درجه سانتیگراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتیگراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه، دمای اتاقک تزریق ۲۸۰ درجه سانتیگراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مدل Hewlet Packard 5973N با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتیگراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در برنامه کتابخانه نرم افزاری دستگاه صورت پذیرفت.

تهیه عصاره دانه انگور

عصاره دانه انگور به صورت پودر از شرکت پلی فنلیک با مشخصات ذیل تهیه گردید: میزان فنل کل (≥ 90g GAE/100 g) و پروفایل فنلی: منومر (>۱۰٪)، الیگومر (۸۰-۶۰٪) وپلیمر (<۲۵٪). محلول استوک عصاره، روزانه در داخل آب مقطر تهیه و پس از عبور از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی، استفاده گردید.

تهیه و آماده سازی گوشت چرخ کرده گاومیش

عضله راسته[1] تازه گاومیش به میزان لازم بلافاصله بعد از کشتار، از کشتارگاه تهیه و در شرایط کاملاً استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. عضله در شرایط استریل قطعه قطعه شده و توسط دستگاه چرخ گوشت، چرخ و در پلاستیک های پلی اتیلنی استریل نگهداری گردید.

تعیین بهترین غلظت اسانس به روش ارزیابی حسی

دراین مرحله بهترین غلظت مورد استفاده از اسانس میخک برای استفاده با عصاره دانه انگور در گوشت به روش ارزیابی حسی تعیین گردید. در این مرحله ۶ غلظت از اسانس (۱= صفر، ۲=۰/۱، ۳=۰/۲۵، ۴=۰/۵، ۵=۱ و ۶=۲ درصد) را به گوشت چرخ کرده اضافه نموده و پس از هم زدن مقدماتی با دست، به مدت ۲ دقیقه در دور ۲۰۰ دور در دقیقه توسط دستگاه استومکر، هموژن گردید. سپس نمونه ها به صورت پَتی در اندازه های لازم آماده گردید و به صورت خام از نظر بو، رنگ و مقبولیت کلی به روش ارزیابی "مقیاس کامل نشده نه نقطه ای[2]" ارزیابی گردید (برانان ۲۰۰۹). لازم به ذکر می باشد، انتخاب غلظت ها بر اساس مطالعه اولیه نگارنده گان بر روی اثرات ضد باکتریایی اسانس میخک در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

تعیین اثرات اسانس و عصاره بر روی باکتری های عامل فساد میکروبی

گوشت چرخ شده در پلاستیک های پلی اتیلنی استریل تقسیم شده و سپس با اضافه کردن اسانس و عصاره، مجموعاً شش گروه به شرح ذیل تهیه شد: ۱: کنترل، ۲: ۰/۱ درصد اسانس، ۳: ۰/۱ درصد عصاره، ۴: ۰/۲درصد عصاره، ۵: ۰/۱درصد عصاره +۰/۱درصد اسانس، ۶: ۰/۲ درصد عصاره + ۰/۱درصد اسانس. لازم به ذکر است درصد عصاره مورد استفاده با بررسی

[1] *Major psoas*
[2] nine-point hedonic scale

کارهای قبلی انجام شده در این زمینه انتخاب و غلظت اسانس نیز بر اساس نتایج اولیه آنالیز حسی تعیین گردید. در مرحله بعد، نمونه ها به مدت ۲ دقیقه در دور ۲۰۰ دور در دقیقه هموژن شده و پس از شکل دادن نمونه ها به شکل پَتی، نمونه ها در ظروف یکبار مصرف پلی استرن تراسپرنت قرار داده و روی آن پوشش های پلی پروپیلنی کشیده و در دمای هشت درجه سانتی گراد به مدت ۹ روز نگهداری گردید.

شمارش عوامل فساد باکتریایی

در روزهای صفر، سه، شش و نه، مقدار ۱۰ گرم نمونه را در ۹۰ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد (۱:۱۰) هموژن نموده سپس رقت های بعدی را در لوله های حاوی آب پپتونه ۰/۱ درصد تهیه و در پلیت های حاوی آگارهای انتخابی مربوط به عوامل باکتریایی مولد فساد کشت داده شد:

- شمارش باکتری های سرما دوست روی پلیت های حاوی محیط پلیت کانت آگار(PCA[1]) (انکوباسیون در ۷ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته).
- شمارش باکتری های مزوفیل هوازی روی پلیت های حاوی محیط PCA (انکوباسیون در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت).
- شمارش باکتری های اسید لاکتیک در محیط کشت MRS[2] آگار (انکوباسیون در ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت).
- شمارش سودوموناس ها روی محیط سودوموناس آگار حاوی مکمل انتخابی ستریماید- فوسیدین- سفالوریدین (انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ - ۲ روز).

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات، در قالب طرح کاملاً تصادفی و در حداقل سه تکرار انجام گردید. اختلاف (معنی دار بودن یا نبودن) بین تیمارها در هر یک از روزهای آنالیز توسط نرم افزار GraphPad (Version 5.00, San Diego California, USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تحلیل واریانس با رویه ANOVA و تست Newman-Keuls Post در سطح معنی دار $P < ۰/۰۵$ صورت گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس روغنی

آنالیز ترکیبات اسانس روغنی میخک مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان داد که از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، ۲۳ ترکیب که ۸۶/۲ درصد ترکیبات اسانس را شامل می گردد، شناسایی گردید. در بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس میخک، سیِرن بیشترین میزان (۲۳/۱٪) را داشت و سپس ترکیباتی همچون اوژنول (۲۱٪)، متیل سیل سیلات (۱۵٪) و بتا هومولِن (۱۴/۲) قرار داشتند. میزان بالای اوژنول در اسانس میخک تأثیرات قوی ضد میکروبی و آنتی اکسیدان را ایجاد می نماید. به طوری که قادر است پروتئین ها را دناتوره کرده، با فسفولیپیدهای غشای سلولی واکنش و نفوذپذیری آنها را تغییر داده و سبب به دام انداختن رادیکال های آزاد شود (لی و همکاران ۲۰۰۱).

تعیین بهترین غلظت اسانس به روش ارزیابی حسی

یکی از مشکلات اصلی استفاده از اسانس های گیاهی در مواد غذایی، بوی شدید این ترکیبات است که در برخی از موارد، اثرات ارگانولپتیک نامناسبی در ماده غذایی ایجاد می نماید. راهکار مناسب برای جلوگیری از این حالت، کاهش میزان مصرف اسانس در ماده غذایی همراه با استفاده از یک سری از نگهدارنده های طبیعی دیگر همراه با اسانس است. جدول ۱ مربوط به نتایج تعیین مقدماتی بهترین غلظت از اسانس برای استفاده توأم با عصاره در پَتی در مراحل بعدی می باشد. در مقبولیت کلی داورها برای غلظت ۰/۲۵ امتیاز کمتر از ۵ (یعنی کمتر

[1] Plate Count Agar
[2] de Man, Rogosa, Sharpe

از حد وسط) دادند. بنابراین یک غلظت کمتر، یعنی ۰/۱ انتخاب گردید.

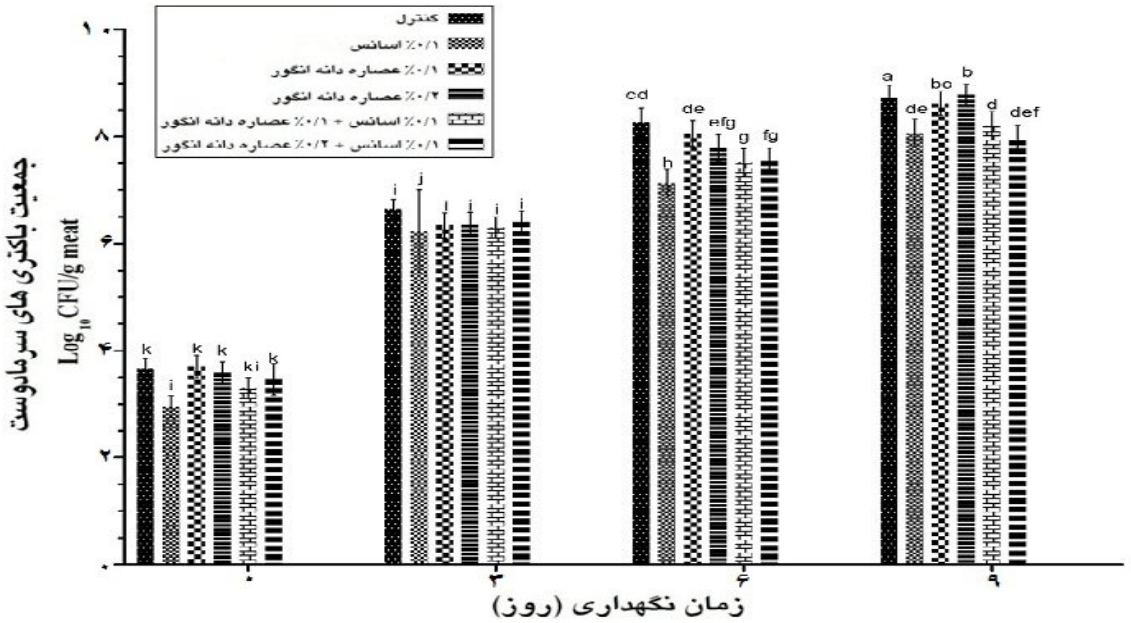
نتیجه به دست آمده مشابه نتایج حاصل از مطالعه ای بود که اثرات استفاده از اسانس پونه کوهی ۱ درصد و ۰/۱ درصد بر روی خصوصیات حسی گوشت جوجه بسته بندی شده به روش اتمسفر تغییر یافته و نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مدت ۲۵ روز بررسی نموده اند. نمونه های حاوی پونه کوهی ۰/۱ درصد بو و مزه خوشایندی را به گوشت جوجه دادند، ولی ویژگی های حسی (بو ومزه) گوشت سینه جوجه پخته به علت بوی شدید اسانس پونه کوهی در غلظت ۱ درصد، از نظر حسی مورد تأیید گروه ارزیاب قرار نگرفت (کولیارا و همکاران ۲۰۰۶).

اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری های سرمادوست

این دسته، مهمترین باکتری ها در ایجاد و پیشرفت فساد میکروبی در محصولات گوشتی می باشند (اعلمی و خامسان ۱۳۸۰). در این دسته، به دلیل غالب بودن باکتری های گرم منفی، اثرات ترکیبات ضد میکروبی بر روی آنها کمتر و ضعیف تر است. همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است در روز ۹، کاهش جمعیت باکتری های سرمادوست در تمامی گروه ها در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود ($p<۰/۰۵$). این کاهش در گروه های حاوی اسانس بسیار چشمگیرتر از گروه های حاوی عصاره است، به طوری که در پایان دوره نگهداری، در مقایسه با گروه کنترل، گروه حاوی ۰/۲ درصد عصاره + ۰/۱درصد اسانس، باعث کاهش ۰/۷ واحد لگاریتمی تعداد باکتری های سرمادوست گردید. خاصیت ضد میکروبی عصاره دانه انگور عمدتاً مربوط به گروه های هیدروکسیل ترکیبات فنلی همچون اسید گالیک، اسید پارا کوماریک، اسید فرولیک، اسید کافیئک، کاتکین، اپی کاتکین، اپی گالوکاتکین گالات، کورستین، کامپفرول، مورین، ترانس رسوراتول، سیانیدین ۳- گلوکوزید و پروآنتوسیانیدین های پلی مری است. این ترکیبات، توانایی نفوذ در غشاء باکتری و واکنش با پروتئین های سیتوپلاسمی و سلولی را دارند (آدامز ۲۰۰۵).

جدول ۱- تعیین بهترین غلظت از اسانس میخک برای استفاده توام با عصاره دانه انگور در پَتی گوشت گاومیش به روش ارزیابی حسی.

شاخص های ارزیابی حسی			میزان اسانس
مقبولیت کلی	بو	رنگ	(درصد)
۱/۵۶±۶/۴۷	/۰۳±۶/۷۷	۳/۲±۶/۶۵	۰
۲/۷۸±۵/۱۷	/۵۹±۵/۰۹	/۰۷±۶/۲۵	۰/۱
۱/۶۸±۴/۳۸	/۸۶±۴/۲۶	/۸۵±۶/۷۲	۰/۲۵
۱/۵۷±۴/۵۹	/۳۴±۴/۲۱	/۱۲±۵/۹۰	۰/۵
۲/۲۰±۴/۱۸	/۶۳±۳/۱۱	/۳۵±۵/۷۴	۱
۱/۷۹±۲/۶۱	/۳۹±۱/۹۶	/۷۵±۲/۴۸	۲



شکل ۱- اثرات اسانس میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی و ترکیبی علیه باکتری های سرمادوست در پَتی گوشت گاومیش در دمای ۸ درجه سانتیگراد. حروف غیر مشابه در هر روز نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در بین تیمارها است.

اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری های مزوفیل

نتایج اثرات اسانس میخک و عصاره دانه انگور بر روی جمعیت باکتری های مزوفیل در جدول شماره ۲ آورده شده است. در تمامی گروه ها نسبت به گروه کنترل، کاهش جمعیت باکتری های مزوفیل در پایان ۹ روز اتفاق افتاد، ولی این کاهش معنی دار نبود ($P>۰/۰۵$). این یافته ها نشان می دهد که اسانس میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی یا به صورت ترکیب با هم بر باکتری های مزوفیل اثر ضد باکتریایی و مؤثری ندارند. به طوری که در انتهای دوره، در بهترین حالت، اسانس ۰/۱ درصد، تنها باعث کاهش ۰/۵ واحد لگاریتمی در تعداد باکتری در مقایسه با گروه کنترل گردید. فقط در این حالت، و در پایان دوره نگهداری، شمارش این دسته از باکتری ها هیچ گاه به بالاتر از استاندارد $\log_{10}$ CFU/g ۷ که بر اساس معیارهای ICMSF[1] بیشترین میزان مجاز میکروبی در گوشت تازه گاو است، نرسید (کولیارا و همکاران ۲۰۰۶).

تعداد نسبتاً بالای باکتری های مزوفیل در پَتی گوشت گاومیش می تواند به فرآیند چرخ کردن نسبت داده شود که به افزایش سطح گوشت و در نتیجه به افزایش جمعیت باکتری های مزوفیل منتهی می گردد.

در مطالعه ای مشابه، اثرات لوتئین، سِساموِل، اسید الاژیک و عصاره برگ زیتون به ترتیب در غلظت های ۲۰۰-۱۰۰، ۵۰۰-۲۵۰، ۶۰۰-۳۰۰ و ۲۰۰-۱۰۰ میکروگرم در هر گرم گوشت، بر شمارش کلی باکتری ها (عمدتاً مزوفیل ها) در پَتی گوشت خام بررسی شد. در مقایسه با گروه کنترل، هر ۴ ماده مورد استفاده باعث کاهش معنی دار باکتری های مزوفیل زنده در پَتی گردیدند ($P<۰/۰۰۱$) (هایس و همکاران ۲۰۰۹). همچنین اثرات استفاده از اسانس پونه کوهی (۰/۱ و ۱ درصد) در سینه جوجه تازه نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ روز، بررسی شد که غلظت ۱ درصد اسانس پونه تأثیر بهتری در افزایش ماندگاری نسبت به غلظت ۰/۱ درصد داشت به طوری که به ترتیب ماندگاری

[1] International Commission on Microbiological Specifications for Foods

را ۲۰-۱۹ و۲-۱ روز افزایش دادند (کولیارا و همکاران ۲۰۰۶).

اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری های اسید لاکتیک

باکتری های اسید لاکتیک نقش مهمی در فساد گوشت در مرحله نگهداری دارد (اعلمی و خامسان ۱۳۸۰). مطابق شکل ۲ تیمارهای حاوی اسانس به طور معنی داری باعث کاهش جمعیت باکتری های اسید لاکتیک شدند ($P<۰/۰۵$). اسانس در کاهش این دسته از باکتری ها مؤثرتر از ۰/۱ درصدعصاره بود. به طوری که جمعیت باکتری های اسید لاکتیک در پایان دوره، توسط۱ /۰ درصد اسانس میخک به اندازه $\log_{10}$ CFU/g ۰/۵و ۰/۱ درصد عصاره ۰/۲ درصد عصاره به ترتیب ۰/۵ و ۰/۶ واحد لگاریتمی کاهش یافت. این کاهش در صورت استفاده توأم این دو ترکیب، ۰/۶ واحد لگاریتمی شد. این بدین معنی است که استفاده توأم این دو ترکیب اثرات معنی داری بر روی تعداد باکتری های اسید لاکتیک ندارد ($P>۰/۰۵$). به نظر می رسد در بین عوامل باکتریایی مختلف، این باکتری ها از حساسیت بالایی نسبت به عصاره دانه انگور دارد.

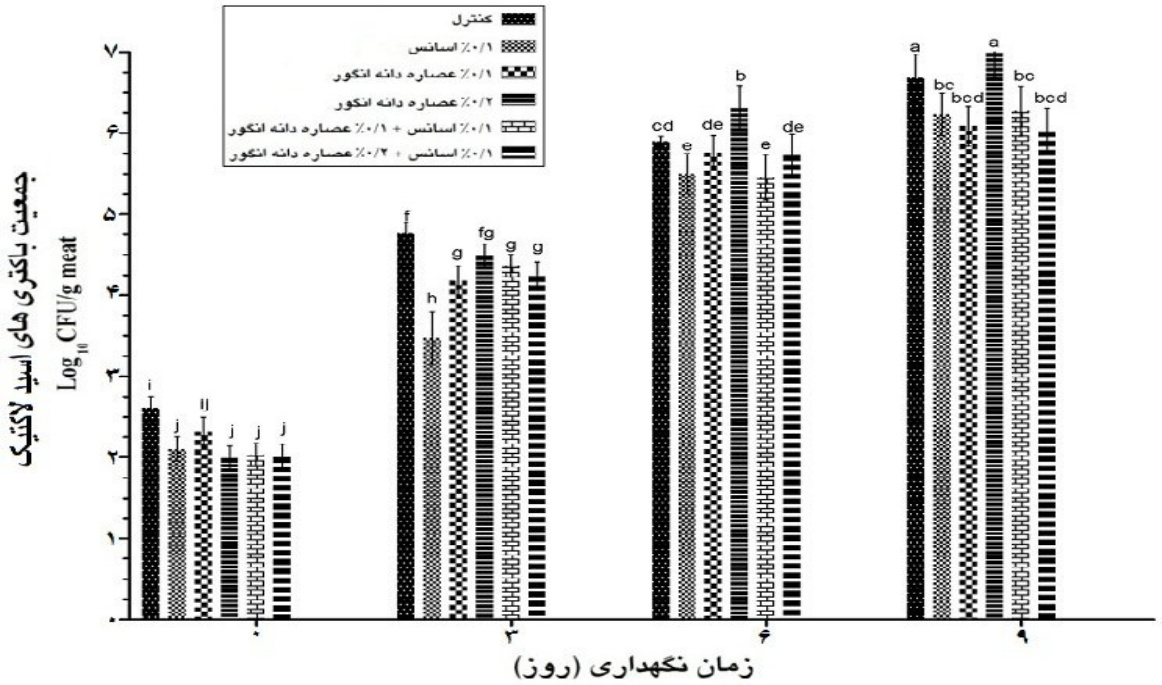
در مطالعه کولیارا و همکاران (۲۰۰۶) که اثرات اسانس پونه کوهی بر روی شمارش باکتری های اسید لاکتیک در گوشت سینه جوجه بسته بندی شده در شرایط هوازی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۹ روز انجام شد، نتایج نشان داد که تعداد باکتری ها در گروه کنترل به$\log_{10}$ CFU/g ۷ رسید، این میزان در گروه حاوی اسانس (۰/۱ درصد) تقریبا $\log_{10}$ CFU/g ۱ بود در حالی که یک درصد اسانس به طور کامل از رشد این دسته از باکتری ها جلوگیری نمود این نتایج مشابه نتایج زیکا و همکاران (۱۹۸۳) بود که کاهش $\log_{10}$ CFU/g ۴ در جمعیت باکتری های اسید لاکتیک در محیط کشت خالص متعاقب افزودن اسانس پونه کوهی در غلظت ۴ گرم در لیتر را گزارش کردند.

جدول ۲-اثرات اسانس میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی و ترکیبی علیه باکتری های مزوفیل در پَتی گوشت گاومیش در دمای ۸ درجه سانتی گراد.

گروه	زمان نگهداری (روز)			
	صفر	سه	شش	نه
کنترل	۲/۸۲[*]±۰/۱۵[g**]	۵/۸۱±۰/۱۸[d]	۷/۰۷±۰/۱۵[c]	۷/۶۰±۰/۰۵[a]
۰/۱درصداسانس میخک	۳/۰۶±۰/۲۱[g]	۴/۹۹±۰/۱۵[ef]	۶/۷۱±۰/۱۷[c]	۷/۱۱±۰/۱۵[a]
۰/۱ درصد عصاره دانه انگور	۲/۹۴±۰/۱۲[g]	۵/۰۸±۰/۱۹[def]	۷/۰۷±۰/۲[abc]	۷/۵۸±۰/۱۶[a]
۰/۲ درصد عصاره دانه انگور	۲/۹۶±۰/۱۵[g]	۵/۴۶±۰/۲۰[de]	۶/۹۱±۰/۱۸[bc]	۷/۶۲±۰/۱۵[a]
۰/۱درصداسانس میخک + ۰/۱ درصد عصاره دانه انگور	۲/۹۴±۰/۱۵[g]	۴/۸۴±۰/۱۴[f]	۷/۰۱±۰/۰۷[abc]	۷/۲۳±۰/۲[a]
۰/۱درصداسانس میخک + ۰/۲ درصد عصاره دانه انگور	۲/۵۳±۰/۱۷[g]	۵/۰۷±۰/۱۰[ef]	۶/۷۸±۰/۱[c]	۷/۴۱±۰/۱ [a]

[*] میانگین شمارش باکتریایی(لگاریتم CFU/g)

[**] حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P<۰/۰۵$) است.



شکل ۲- اثرات اسانس میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی و ترکیبی علیه باکتری های اسید لاکتیک در پَتی گوشت گاومیش در دمای ۸ درجه سانتیگراد.

حروف غیر مشابه در هر روز نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < ۰/۰۵$) در بین تیمارها است.

اثرات ضد میکروبی بر روی سودوموناس ها

از آن جایی که باکتری های گرم منفی (و به طور عمده گونه‌های سودوموناس) تحت شرایط هوازی و سرما سرعت رشد بیشتری دارند، در گوشت‌هایی که در یخچال و در معرض هوا نگهداری می‌شوند، جمعیت میکروبی غالب را تشکیل می‌دهند (اعلمی و خامسان ۱۳۸۰). ۰/۱ و ۰/۲ درصد عصاره تأثیری بر رشد باکتری نداشتند (جدول۳). اگر چه اسانس نیز روند منظمی در کاهش رشد باکتری نداشت اما در انتهای ۹ روز نگهداری پَتی، سودوموناس را در مقایسه با شاهد به طور معنی داری کاهش داد. در حالی که استفاده توأم اسانس (۰/۱درصد) و عصاره دانه انگور (۰/۱ و ۰/۲ درصد)، اثر معنی داری بر روی تعداد سودوموناس ها نشان نداد (جدول۳). این یافته ها مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه هایونی و همکاران (۲۰۰۸) و دلامار لونگارای و همکاران (۲۰۰۷) است که نشان دادند اسانس مریم گلی در شرایط آزمایشگاهی، اثرات ضد باکتریایی علیه گونه های سودوموناس و استافیلوکوکوس نشان نداد. در مطالعه کولیارا و همکاران (۲۰۰۶) استفاده از روغن پونه کوهی مؤثرتر از استفاده از MAP در کاهش شمار سودوموناس ها بود. اسکاندامیس و همکاران(۲۰۰۲) گزارش کردند که در گوشت گاو نگهداری شده در ۵درجه سانتی گراد سودوموناس ها مقاوم ترین گروه باکتری به اسانس پونه کوهی است. اسانس پونه کوهی جمعیت سودوموناس را ۰/۵ و بسته بندی خلاء ۲/۲ واحد لگاریتمی کاهش داد. در مطالعه حاضر، ۰/۱ درصد عصاره دانه انگور و ۰/۱ درصد اسانس، باعث کاهش ۰/۳ و ۰/۴ واحد لگاریتمی در جمعیت سودوموناس ها گردید.

نکته جالب اینکه در استفاده از ۰/۲ درصد عصاره دانه انگور ، نه تنها عصاره باعث کاهش تعداد باکتری نگردید، بلکه تعداد باکتری ها در پایان ۹ روز نگهداری پَتی گوشت گاومیش حتی بیشتر از گروه کنترل گزارش گردید (جدول۳).

اثرات ترکیبات ضد میکروبی در گوشت و سایر فرآورده های غذایی بستگی به عواملی همچون دمای نگهداری، میزان اکسیژن، نوع بسته بندی، میزان و نوع میکروفلور سطحی و نیز عواملی همچون میزان چربی، پروتئین و شرایط فیزیکی–شیمیایی دارد(کارگا و همکاران ۲۰۰۳). تاکنون در زمینه استفاده از اسانس میخک و عصاره دانه انگور برای کنترل عوامل باکتریایی مولد فساد گوشت قرمز مطالعه ایی صورت نگرفته است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از اسانس و عصاره در گوشت چرخ کرده تابعی از غلظت و نوع باکتری می باشد.

جدول ۳- اثرات اسانس میخک و عصاره دانه انگور به تنهایی و ترکیبی علیه سودوموناس ها در پَتی گوشت گاومیش در دمای ۸ درجه سانتیگراد.

گروه	زمان نگهداری (روز)			
	صفر	سه	شش	نه
کنترل	۴/۹۲ * ±۰/۰۵ ^{i**}	۸/۱۴±۰/۱۵ ^{f}	۱۰±۰/۰۹ ^{de}	۱۰/۷۵±۰/۱۶ ^{ab}
۰/۱درصداسانس میخک	۴/۷۹±۰/۰۸ ^{ij}	۷/۱۶±۰/۱ ^{h}	۹/۸۱±۰/۱۵ ^{e}	۱۰/۳۳±۰/۲ ^{cd}
۰/۱ درصد عصاره دانه انگور	۴/۹۶±۰/۱۱ ^{j}	۷/۵±۰/۱۲ ^{gh}	۹/۸۶±۰/۱۸ ^{e}	۱۰/۴۷±۰/۲۱ ^{bc}
۰/۲ درصد عصاره دانه انگور	۴/۸۱±۰/۰۵ ^{ij}	۷/۷۹±۰/۱ ^{fg}	۹/۸۸±۰/۱۴ ^{e}	۱۰/۹۲±۰/۲ ^{a}
۰/۱ درصداسانس میخک + ۰/۱ درصد عصاره دانه انگور	۴/۵۲±۰/۰۴ ^{j}	۷/۲۲±۰/۱ ^{h}	۹/۷۱±۰/۱۲ ^{e}	۱۰/۴۹±۰/۲ ^{bc}
۰/۱ درصداسانس میخک +۰/۲ درصد عصاره دانه انگور	۴/۸۷±۰/۱ ^{ij}	۷/۶۹±۰/۱۳ ^{g}	۹/۷۵±۰/۱۳ ^{e}	۱۰/۴۳±۰/۱۷ ^{bc}

* میانگین شمارش باکتریایی(لگاریتم CFU/g)

** حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) است.

نتایج نشان داد که در پایان ۹ روز نگهداری پَتی گوشت، اسانس در غلظت ۰/۱ درصد و در مقایسه با گروه کنترل، موجب کاهش معنی دار ($P <$۰/۰۵) در رشد باکتری های سودوموناس، سرمادوست و اسید لاکتیک گردید، در حالی که بر روی باکترهای مزوفیل اثر معنی داری نشان نداد. همچنین در استفاده توأم اسانس (۰/۱درصد) و عصاره دانه انگور (۰/۱ و۰/۲ درصد)، اثر معنی داری در تعداد باکتری های مزوفیل و سودوموناس مشاهده نگردید. در طول نگهداری پَتی ، باکتری های مزوفیل و سرمادوست به ترتیب مقاوم ترین و حساس ترین عوامل فسادزا به ترکیبات ضد باکتریایی مورد استفاده بودند. در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با وجود اثرات ضد باکتریایی معنی دار اسانس میخک در کنترل عوامل مولد فساد در مقایسه با گروه کنترل، عصاره دانه انگور

در غلظت های مورد استفاده اثرات ضد باکتریایی مناسبی در کنترل فساد باکتریایی پَتی گوشت گاومیش نشان نداد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از بودجه پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. که بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی سپاسگزاری می گردد. از شرکت پلی فنلیک به خاطر در اختیار قرار دادن عصاره دانه انگور نیز قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

اعلمی م و خامسان ع، ۱۳۸۰. میکروبیولوژی گوشت (ترجمه). انتشارات مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد.

رهنما م، ۱۳۸۷. بررسی روش های افزایش اثرات ضد میکروبی نایسین. پایان نامه دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه.

Adams B, Sivarooban T, Hettiarachchy NS and Johnson MG, 2005. Inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* by soy protein edible film containing grape seed extract, nisin, and malic acid. Discovery 6: 3-9.

Banon S, Diaz P, Rodriguez M, Garrido MD and Price A, 2007. Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. Meat Sci 77: 626–633.

Brannan RG, 2009. Effect of grape seed extract on descriptive sensory analysis of ground chicken during refrigerated storage. Meat Sci 81: 589–595.

Burt S, 2004. Essential oils: their antibacterial propertied and potential application in food- a review. Int J Food Microbiol 94: 223-253.

Careaga M, Fernandez E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME and Hernandez-Sanchez H, 2003. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. Int J Food Microbiol 83: 331–335.

Chouliara E, Karatapanis A, Savvaidis IN and Kontominas MG, 2006. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat stored at 4°C. Food Microbiol 24: 607–617.

Clouatre DL and Kandaswami C, 2005. Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, USA

Delamare Longaray APL, Ivete TMP, Artico L, Atti-Serafini L and Echeverrrigary S, 2007. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis L.* and *Salvia triloba L.* cultivated in south Brazil. Food Chem 100: 603–608.

Hayes JE, Stepanyan V, Allen P, O'Grady MN and Kerry JP, 2009. Effect Of Lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. Meat Sci 84: 613-620.

Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H and Hamdi M, 2008. Tunisian *Salvia officinalis L.* and *Schinus molle L.* essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. Int J Food Microbiol 125: 242–251.

Kalemba D and Kunicka A, 2003. Antibacterial and antifungal Properties of Essential oils. Cur Medical Chem 10: 813-829.

Lee KG and Shibamoto T, 2001. Antioxidant Property of aroma extract isolated from clove buds (*Syzgium aromaticum L.*). Food Chem 74: 443-448.

Moradi M, Tajik H, No HK, Razavi Rohani SM, Oromiehie A and Ghasemi S, 2010. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. Journal of Chitin and Chitosan 15: 35-45.

Parthasarathy VA, Chempakam B and Zachariah TJ, 2008. Chemistry of Spices. CAB International, UK.

Pinelo M, Arnous A and Meyer AS, 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. Trends Food Sci Technol 17: 579-590.

Skandamis P, Tsigarida E and Nychas GJE, 2002. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella Typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. Food Microbiol 19: 97-103.

Smid EJ and Gorris LGM, 2007. Natural antimicrobials for food preservation. pp. 237-259. In: Rahman SM (ed). Hand book of Food Preservation. Taylor and Francis Group.

Tajkarimi MM, Ibrahim SA and Cliver DO, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21: 1199–1218.

Zaika LL, Kissinger JG and Wasserman AE, 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. Food Sci 48: 1455–1459.