نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۵ شماره۳/ سال ۱۳۹۴

بررسی خواص ضد میکروبی عصاره و اسانس برگ گیاه خلفه بر روی استافیلوکوکوس اورئوس به منظور کاهش مصرف نیترات در فرآورده‌های گوشتی

پرنیان پزشکی[1*]

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۱

[1] دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیئت علمی گروه تغذیه، مرکز آموزش عالی علوم پزشکی وارستگان

*مسئول مکاتبه: Email: parnian.pezeshki85@gmail.com

چکیده

در این تحقیق اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره برگ گیاه خلفه (*Portulaca oleracea*) بر استافیلوکوکوس اورئوس و تأثیر آنها بر کاهش مصرف نیترات در فرآورده‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا عصاره متانولی و اسانس برگ خلفه تهیه و ترکیبات شیمیایی آنها تعیین گردید، سپس چهار سطح غلظت از اسانس و عصاره شامل۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی پی ام و همچنین نیترات به میزان ۵۰ پی پی ام انتخاب گردید. به منظور بررسی تأثیر اسانس و عصاره خلفه بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس، رشد این میکروارگانیسم در طی سه دوره زمانی ۱۵، ۳۰ و ٤٥ روز در سوسیس نگهداری شده در دمای $-12^{C^{o}}$ مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی نتایج حاصل از تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس و عصاره برگ گیاه خلفه مشخص شد که به ترتیب ۸۳ ٪ و ۹۳/٤٪ از ترکیبات عصاره متانولی و اسانس برگ خلفه را مشتقات فنولی و فلاوونوئیدی تشکیل داده است. اسانس نسبت به عصاره اثر بازدارندگی بیشتری نشان داد به گونه‌ای که کمترین غلظت بازدارنده برابر ۱۰۰۰۰ پی پی ام بود و همچنین هیچ اثر کشندگی در آن مشاهده نشد. این در حالیست که کمترین غلظت بازدارنده و کشنده اسانس به ترتیب ۵۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی پی ام تعیین شد. نیترات در غلظت مورد استفاده هیچ اثر بازدارندگی بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس از خود نشان نداد. طبق نتایج این بررسی، عصاره و اسانس برگ خلفه می‌تواند به عنوان یک ترکیب نگهدارنده طبیعی در فرآورده‌های غذایی مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس و عصاره برگ خلفه، استافیلوکوکوس اورئوس، نیترات، خاصیت ضد باکتریایی

مقدمه

فرآورده‌های گوشتی از جمله سوسیس به دلایل گوناگون از جمله سهولت مصرف، استفاده از گوشت در ترکیب و طعم مطلوب مصرف بالایی دارد. این فرآورده‌ها به عنوان منبعی مناسب از عناصر غذایی، محیط خوبی جهت رشد میکروب‌های عامل فساد و بیماری‌زا محسوب می شود. شمارش کلی باکتریایی

فرآورده‌های خام گوشتی میزان 10^7 تا 10^8 باکتری در هر گرم برآورد شده است. در این میان، استافیلوکوکوس اورئوس فلور میکروبی غالب را تشکیل می‌دهد (محمدی ۱۳۹۱). استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد عفونت های غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می باشد که عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکال می باشد و از بسیاری از فرآورده‌های گوشتی ایزوله شده است (رجی و همکاران ۲۰۰٤، چو و همکاران ۲۰۰۲)، لذا محققین درصدد یافتن راهکارهایی جهت بهبود کیفیت و کنترل رشد میکروبی برآمدند که از جمله آن می‌توان به استفاده از نیترات و نیتریت در فرآورده‌های گوشتی نظیر سوسیس و کالباس اشاره کرد. از مهمترین اهداف استفاده از این ترکیبات در فرآورده‌های گوشتی می توان به ایجاد رنگ و طعم مناسب در محصول، کنترل رشد اسپورها (مخصوصا اسپور کلستریدیوم بوتولینوم) و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری فرآورده گوشتی اشاره نمود. لازم به ذکر است که استفاده از مقادیر بالای نمک‌های نیترات و نیتریت در فرآورده‌های گوشتی سلامت انسان را تهدید می کند، چرا که مقادیر مازاد نیترات طی واکنش با اسیدهای آمینه به تولید ترکیبات سرطان‌زا منجر می شود (کامکار و همکاران ۱۳۸۲). به دنبال آشکار شدن عوارض نامطلوب استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی شیمیایی بر سلامت عموم، جایگزین نمودن آنها با ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، خصوصا فرآورده‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات انجام گرفته روی عصاره های گیاهی به دست آمده از سیر، پیاز، دارچین، جوز، کاری (زردچوبه هندی)، خردل، فلفل سیاه، آویشن، پونه کوهی، رزماری (اکلیل کوهی)، بادیان، فلفل قرمز، زردچوبه، برگ بو، هل، کرفس، شبدر، گشنیز، زنجبیل، مرزنگوش، سماق، نعناع، ریحان و اشاره نمود (پاندیت و شلف ۱۹۹٤، لمبرت و همکاران ۲۰۰۱، اوسالاه و همکاران ۲۰۰۷، برومند و همکاران ۲۰۰۸، هازیت و همکاران ۲۰۰۹).

گیاه خلفه *Portulaca Oleracea* به عنوان یکی از پرکاربرد ترین گیاهان دارویی در سازمان بهداشت جهانی مطرح است (لیم و قو ۲۰۰۷). خلفه یک گیاه گرمسیری یک ساله است که در کشورهای مدیترانه، مرکز اروپا و بسیاری از کشورهای آسیایی کشت می شود (سیمپولوس ۲۰۰٤، مالک و همکاران ۲۰۰٦). تحقیقات اخیر نشان داده است که خلفه به عنوان یک منبع غنی از اسیدهای چرب امگا۳، نقش مهمی در جلوگیری از حملات قلبی و تقویت سیستم ایمنی بدن دارد (سیمپولوس ۲۰۰٤). موارد استفاده متعددی برای گیاه خلفه ذکر شده است؛ از آن جمله می‌توان به کاربرد این گیاه به عنوان داروی ضد عفونی کننده، ضدانقباض و تشنج و موثر در برابر بیماری های ناشی از کمبود ویتامین ث در کشورهای عربی؛ یک عامل ضدباکتریایی و ضدویروسی و نیز تسکین دهنده درد اشاره نمود (چان و همکاران ۲۰۰۰، ژانگ و همکاران ۲۰۰۲) . مطالعات بیشتر در خصوص اثرات ضدمیکروبی این گیاه، می تواند آن را به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای جایگزین شدن با انواع سنتزی مطرح نماید، اما باید توجه داشت که فعالیت ضدمیکروبی روغن‌های اساسی در واقع به گروهی از ترپنوئیدهای کوچک و ترکیبات فنولی نسبت داده می شود که با وجود قرار گرفتن در گروه مواد ایمن و مجاز (GRAS)[1] مصرف آنها معمولاً از نظر ارگانولپتیکی محدودیت ایجاد می کند به همین دلیل تعیین کمترین غلظت بازدارنده (MIC)[2] و کمترین غلظت کشنده (MBC)[3] رشد باکتری‌های پاتوژن که تأثیری بر کیفیت حسی غذا نداشته باشد ضروری است (هالی و پتل ۲۰۰۵، اوسالاه و همکاران ۲۰۰۷).

بر این اساس هدف از پژوهش فوق، ارزیابی و بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره و اسانس استخراج شده از

[1] - Generally Recognized As Safe
[2] - Minimum Inhibitory Concentration
[3] - Minimum Bactericidal Concentration

برگ گیاه خلفه بر استافیلوکوکوس اورئوس در محصول سوسیس و مقایسه آن با نمونه شاهد به منظور تقلیل بار میکروبی و به طور خاص کنترل میکروارگانیسم مذکور است که می‌تواند به عنوان یک راه جایگزین در کاهش میزان مصرفی نیترات در فرآورده‌های گوشتی نظیر سوسیس به کار گرفته شود و در نهایت شرایطی را ایجاد کند که با مصرف سوسیس، ایمنی و سلامت مصرف کننده تضمین شود.

مواد و روش ها

گیاه خلفه از دشت های غربی شهرستان گناباد جمع-آوری و بلافاصله در زیر نور خورشید خشک و سپس به کمک آسیاب برقی (Feller مدل EG 850) پودر شد (حبیبی و همکاران ۲۰۰۰). سویه میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس استاندارد ATCC-29737 مورد نیاز، بصورت آمپول لیوفیلیزه از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. جهت انجام آزمایش‌ها از محیط‌های کشت مایع سلنایت براث و جامد مانیتول سالت آگار ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. برگ پودر شده توسط حلال متانول (۱:۱۰ حجمی/وزنی) با استفاده از دستگاه گرمخانه همزن‌دار (فراز طب تجهیز، ایران) و در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز عصاره-گیری شد. عصاره حاصل، فیلتر شده و مراحل عصاره-گیری با حلال تازه تحت همان شرایط، برای رسوب مرحله اول تکرار گردید. پس از اختلاط عصاره‌های صاف شده مرحله اول و دوم، مخلوط حاصل توسط کربن فعال (۱:۵، وزن برگ/ وزن زغال) رنگبری شد. در مرحله بعد عصاره رنگبری شده به کمک قیف بوخنر صاف و سپس حلال آن در دستگاه تبخیر کننده دورانی[4](Heidolph vv1) تحت خلاء جدا و در گرمخانه ٤٥ درجه سانتیگراد تحت خلا ، تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. پس از حذف کامل حلال، عصاره خشک شده برگ خلفه به شکل پودر به دست آمد (حبیبی و همکاران ۲۰۰۰). .جهت تهیه اسانس، برگ پودر شده به نسبت ۱:۱۰ حجمی/وزنی با آب مقطر مخلوط و به روش تقطیر با بخار توسط سیستم کلونوجر به مدت ٥ ساعت اسانس گیری شد (لمبرت و همکاران ۲۰۰۱). غلظت های مختلف اسانس با امولسیون کردن مقدار معین (برای به دست آوردن رقت های ذکر شده) هر یک از آنها با آب و به کمک توئین ۸۰°به میزان ۳۰ درصد وزن اسانس با استفاده از یک میکسر هموژنایزر (digital ultra turax – IKA T25) به مدت یک دقیقه در پانزده هزار دور در دقیقه تهیه شد (کامانزی و همکاران۲۰۰۲). اسانس و عصاره توسط کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگارجرمی (GC-MS) آنالیزگردید (لمبرت و همکاران۲۰۰۱). دستگاهGC-MS مورداستفاده ازنوع Finnigan Thermoquest با ستون موئینه به طول۳۰ سانتی‌متر و قطر داخلی۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦٥ درجه سانتیگراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲٦٥ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتیگراد، سرعت گاز هلیوم ۱/۵ میلیمتر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون شناسگر EI ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتیگراد بود.

۰/۳ تا ۰/٤ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع استریل تریپتون سویا براث (Merck) به ماده خشک موجود در آمپول لیوفلیزه حاوی استافیلوکوکوس اورئوس اضافه و پس از یکنواخت شدن، سوسپانسیون میکروبی حاصل شد. سوسپانسیون حاصل توسط آنس استریل مخلوط شده و مقداری از آن جهت تهیه کشت مادر[6] روی محیط نوترینت آگار (Difco,Laboratories,Detroit, MI) منتقل و کشت انجام گردید. سپس برای رشد

[4] - Rotary Evaporator

[5] -Tween 80

[6]- Master culture

استافیلوکوکوس اورئوس، محیط‌های کشت حاوی میکروب به مدت ٢٤ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند (بایی ٢٠٠٤).
با افزودن محلول نرمال سالین به محیط های حاوی کلنی رشد یافته، سوسپانسیونی تهیه گردید که در مقایسه با محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند، میزان جذب سوسپانسیون در طول موج ۵۳۰ نانومتر اسپکتروفوتومتر(UA-160,SHIMADZU) با میزان جذب (کدورت) محلول ۰/۵ مک فارلند برابر گردد. برای به دست آوردن مقدار ۳×۱۰^{۵} میکروارگانیسم بر میلی لیتر تحت شرایط استریل به نسبت ۱:۵۰۰ با محیط کشت سلنایت براث مخلوط شد. با توجه به پژوهش‌های پیشین (لمبرت و همکاران ۲۰۰۱، سارتوناتو و همکاران ٢٠٠٤، مالک و همکاران ٢٠٠٦، اوسالاه و همکاران ۲۰۰۷) و برای جلوگیری از هرگونه اثر نامطلوب در خصوصیات ارگانولپتیکی در عین اثرگذاری بر میکروارگانیسم هدف، چهار سطح از هر یک از عصاره و اسانس خلفه شامل ۵۰۰، ۱۰۰۰ ،۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی. پی. ام در نظر گرفته شد. برطبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۳، بیشینه میزان نیتریت سدیم (میلی گرم در کیلوگرم) در فرآورده‌های گوشتی سوسیس و کالباس برابر ٦٠ است. لذا با توجه به هدف این مطالعه مبنی بر کاهش میزان مصرف نیترات، محلول ۵۰ پی. پی. ام نیترات تهیه گردید. مخلوط سوسیس بدون افزودنی ترکیبات نیتراتی از یک کارخانه تولیدی در مشهد تهیه شد و به آزمایشگاه انتقال یافت و سپس بلافاصله مقدار ۱۰۰۰ گرم سوسیس با ٤ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی استافیلوکوکوس اورئوس مخلوط گردید. از مخلوط آلوده فوق نیز به منظور کنترل غلظت استافیلوکوکوس در محیط‌های فوق به عنوان شاهد، کشت بعمل آمد. در مرحله بعد تحت شرایط استریل، نمونه ۲۰ گرمی از مخلوط حاصل درون ظروف پلاستیکی استریل توزین شده و پس از افزودن ۱ میلی لیتر محلول نیترات به نمونه ها، بعنوان نمونه بدون اسانس و عصاره انتخاب گردیدند. سپس برای هر نمونه از مخلوط سوسیس آلوده به میزان ۲۰ گرم توزین و علاوه بر ۱ میلی لیتر نیترات ، به آن ۱۰میلی گرم پودر عصاره خلفه، یا ۱۰ میلی لیتر اسانس اضافه و به طور کامل مخلوط گردیدو سپس به فریزر ۱۲- درجه سانتیگراد انتقال یافت. سایر تیمارها نیز به همین ترتیب با افزودن به ترتیب ۲۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ گرم پودر عصاره و اسانس به آن‌ها آماده شده و پس از توزین در اندازه نمونه های ۲۰ گرمی، در ظروف پلاستیکی مورد نظر پر و به همان فریزر انتقال داده شدند. در دوره های زمانی صفر (روز اول انجام کار و پس از تلقیح)، ۱۵، ۳۰ و ٤٥ روز از هر تیمار نمونه‌گیری شد و به منظور اندازه‌گیری رشد استافیلوکوکوس اورئوس، در محیط مانیتول سالت آگار کشت سطحی انجام گردید و سپس به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور شمارش میکروارگانیسم از کلنی کانتر مدل Funke-Gerbe استفاده شد. تیمارهای مختلف با علائم شرح داده شده طبق جدول ۱، مشخص گردیده‌اند.

جدول۱- تیمارها و علایم اختصاری آنها

علامت اختصاری	نوع تیمار
Control	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بدون اسانس یا عصاره و نیترات
N	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس حاوی نیترات بدون افزودن اسانس یا عصاره
T_1	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات + ۵۰۰ اسانس
T_2	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۱۰۰۰ ppm اسانس
T_3	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۵۰۰۰ ppm اسانس
T_4	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۱۰۰۰۰ ppm اسانس
K_1	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۵۰۰ ppm عصاره
K_2	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۱۰۰۰ ppm عصاره
K_3	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۵۰۰۰ ppm عصاره
K_4	سوسیس آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس + ۵۰ ppm نیترات +۱۰۰۰۰ ppm عصاره

نتایج و بحث

نتیجه ترکیبات شیمیایی عصاره متانولی و اسانس برگ گیاه خلفه در جدول ۲ گزارش شده است.

براساس نتایج به دست آمده، به ترتیب ۸۳ ٪ و ۹۳/٤٪ از ترکیبات عصاره متانولی و اسانس برگ خلفه را مشتقات فنولی و فلاوونوئیدی تشکیل داده است.

خاصیت ضد میکروبی ترکیبات فنولی، فلاوونوئیدی و ترپنوئیدهای مختلف در مطالعات متعددی که بر روی گیاهان دارویی انجام شده است، به اثبات رسیده است (باکالی و همکاران ۲۰۰۸ ،گوتیرز و همکاران۲۰۰۸، برت۲۰۰٤).

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی عصاره متانولی و اسانس برگ گیاه خلفه

ترکیبات	شاخص ماند(RI)	اسانس	عصاره متانولی
میزان چربی (٪ حجمی/وزنی)		٤/٤	
α - تیوژن	۹۲٦	۰/۸	۰/۷
α- پینن	۹۳۳	۰/٦	۰/٥
کامفن	۹٤۸	۰/٤	۰/۳
β- پینن	۹۷٥	۱/٤	۰/٦
میرسن	۹۸۷	۰/٥	۱/۸
α- تریپاینن	۱۰۱۳	۱/٤	٥/٦
ρ- سایمن	۱۰۲۲	۱۳/۳	٦/۹
لیمونن	۱۰۲۷	۲/۲	۱/٥
γ- ترپاینن	۱۰٥۸	۱٦/۲	۱۷/۰
لینالول	۱۰۹۳	٥/٥	۲/٦
کامفور	۱۱۳۷	۰/۸	۰/۸
برنئول	۱۱٦۲	۱/۰	۰/۹
لینالیل استات	۱۲٤۸	-	-
تیمول	۱۲۸۹	۹/٦	۷/۱
کارواکرول	۱۲۹۹	۳۸/٦	۳۳/٥
β- کاریوفیلن	۱٤۱۸	۱/۱	۳/۲
میزان کل		۹۳/٤	۸۳/.

RI= Retention Index

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد بیشترین ترکیب شناخته شده در عصاره متانولی برگ خلفه را کارواکرول (۳۳/۵ ٪) و γ- ترپاینن (۱۷٪) تشکیل می-دهند در حالیکه اسانس برگ خلفه با ۹۳/٤٪ دارای میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی بیشتری در مقایسه با عصاره متانولی بود و ترکیبات غالب در آن به ترتیب کارواکرول (۳۸٪/٦)، γ- ترپاینن (۱٦٪/۲)، ρ- سایمن (۱۳٪/۳) و تیمول (۹٪/٦) تعیین گردید.

خواص ضدمیکروبی ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدها از سوی دانشمندان مختلف مورد تأیید قرار گرفته است. سنعا یعقوب و همکاران در سال ۲۰۰۵ فعالیت ضدمیکروبی عصاره حاصل از استخراج با متانول بذر خلفه را در مقابل استافیلوکوکوس اورئوس به حضور ترکیباتی نظیر کومارین، فلاوونوئیدها و ساپونین نسبت دادند (سنعا یعقوب و همکاران ۲۰۰٦). لمبرت و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که ارتباط بسیار قوی بین میزان فعالیت آنتی‌باکتریال اسانس و غلظت ترکیبات فنولی موجود در آن وجود دارد، به‌طوریکه هرچه غلظت این ترکیبات بیشتر باشد، فعالیت و قدرت ضدمیکروبی اسانس نیز بیشتر خواهد شد. ایشان نشان دادند که اوژنول، کارواکرول و تیمول ترکیبات فنولی هستند که علیه چهار باکتری پاتوژن از جمله استافیلوکوکوس اورئوس بسیار مؤثرند. ساختار شیمیایی ترکیبات فنولی بر مکانیسم ضدمیکروبی آنها اثرگذار بوده و گروه‌های هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنولی اثر مهمی در خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارد. وجود گروه هیدروکسی فنولیک فعال باعث شده است که این ترکیبات بتواند به آسانی با جایگاه-های فعال آنزیم‌ها، باند هیدروژنی تشکیل دهد (تاجکریم و همکاران۲۰۱۰ ، برت۲۰۰٤). این ترکیبات معمولاً موجب اختلال در غشا سیتوپلاسمی، شکستن و از هم گسیختن نیروی حرکتی پروتون، جریان الکترونی و انتقال فعال شده و سبب انعقاد و کوآگولاسیون محتویات سلولی می‌شود (برت ۲۰۰٤). با توجه به نتایج حاصل و مطالعات پیشین دانشمندان،خلفه یک گیاه غنی از ترکیبات فنولی است و معمولاً ترکیبات فنولیک بر عملکرد غشای سیتوپلاسمی شامل نیروی برانگیختن پروتون‌ها و انتقال فعال اثر می گذارد (اکلاند و همکاران ۱۹۸۵). در حقیقت، اثر ضدمیکروبی این ترکیبات در نتیجه واکنش آنها با پروتئین‌ها در غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌هاست که سبب تغییر در قابلیت نفوذ پذیری غشا و ایجاد منفذهای احتمال شده و در نهایت بر نیروی محرکه پروتون‌ها تأثیر می گذارد (جوون و همکاران ۱۹۹٤).

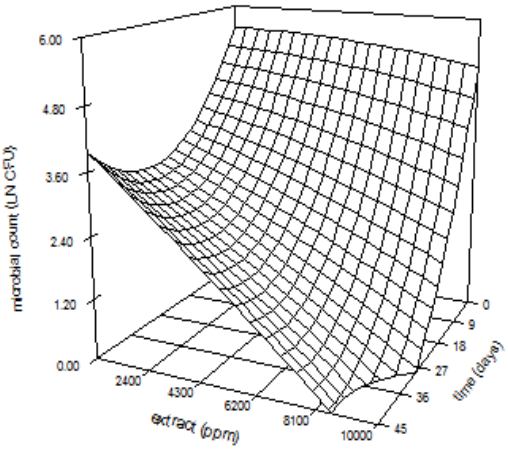
پس از مشاهده پلیت های کشت داده شده از نمونه های حاوی غلظت های مختلف اسانس و عصاره گیاه خلفه و همچنین نمونه حاوی نیترات بدون افزودن اسانس یا عصاره و شاهد، نتایج جدول های ۳ و ٤ به دست آمد. همانگونه که در جدول‌ها مشخص است، نیترات مصرفی در سطح مورد آزمایش هیچ اثر بازدارندگی بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس نداشته و با نمونه شاهد در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۳- شمارش کلی استافیلوکوکوس اورئوس در سوسیس آلوده حاوی اسانس خلفه

زمان شمارش (روز)	۰	۱۵	۳۰	۴۵
Control	٥/٤٨^{Aa}	٥/٨٩^{Aa}	٦/٠٠^{Aa}	٦/٠٠^{Aa}
N	٥/٤٨^{Aa}	٥/٨٥^{Aa}	٥/٩٧^{Aa}	٥/٩٩^{Aa}
T_1	٥/٤٨^{Aa}	٤/١٨^{Bb}	٣/٨٠^{Bb}	٣/٧٥^{Bb}
T_2	٥/٤٨^{Aa}	٣/٩٠^{Bbcd}	٣/٧٠^{Bcd}	٣/٤٨^{Bd}
T_3	٥/٤٨^{Aa}	٢/٠٤^{Cbc}	١/٤٥^{Cc}	١/٢٠^{Cc}
T_4	٥/٤٨^{Aa}	١/٠٠^{Db}	٠/٠٠^{Dc}	٠/٠٠^{Dc}

*کمیت های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ٥درصد تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند.حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف در میان سطرها و حروف کوچک نشان دهنده اختلاف در میان ستون‌ها می‌باشند.

اثر بازدارندگی و کشندگی اسانس در غلظت‌های مختلف متفاوت است؛ به این ترتیب که تمامی غلظت های اسانس مورد استفاده دارای اثر بازدارندگی بر رشد جمعیت میکروبی نمونه‌ها بوده و غلظت ۱۰۰۰۰ پی پی ام با دارا بودن کمترین تعداد استافیلوکوکوس اورئوس شمارش شده طی تمام نمونه‌های کشت داده شده، از روز سی‌ام به بعد اثر کشندگی نیز از خود نشان داد (شکل ۱). این نشان می دهد MIC و MBC اسانس در مخلوط سوسیس به ترتیب شامل ۵۰۰ و ۱۰۰۰۰ پی پی ام بود، که البته به دلیل فاکتورهای مختلف موجود در مخلوط سوسیس که ممکن است بر روی عملکرد ترکیبات ضدباکتریایی اثر تقویت کنندگی یا بازدارندگی داشته باشد، این مقادیر در محیط کشت و یا سایر مواد غذایی متفاوت است.



شکل ۱ - رویه حاصل از اثر متقابل میزان اسانس و زمان گرمخانه‌گذاری بر تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

اسانس‌های روغنی اصولا مخلوط متغیری از ترپنوئیدها و تنوعی از هیدروکربن های آلیفاتیک با وزن مولکولی کم، اسیدها، الکل‌ها، آلدهیدها، استرهای آسیلی یا لاکتون و به استثنای ترکیبات حاوی N و S ، کومارین‌ها و هومولوگ‌های فنیل پروپانوئیدها می‌باشند (دورمن و دینز ۲۰۰۰) که برخلاف نامشان، روغن واقعی (یعنی لیپید) نیستند و معمولا از ترکیبات ایجاد کننده رایحه و عطر مشتق شده از گیاهان هستند. بسیاری از اسانس-های گیاهی حاوی ترکیبات فنلی از قبیل تیمول، کارواکرول، γ-ترپاینن و ρ-سایمن هستند که مشخص گردیده است که این ترکیبات دارای خاصیت ضدمیکروبی مشخصی می‌باشند (شهنیا و خاکسار، ۱۳۹۱). اعتقاد بر این است که اکثر اسانس‌ها فعالیت های ضد میکروبی خود را از طریق تعامل با فرآیندهای مرتبط با غشای سلولی باکتری‌ها، از جمله انتقال الکترون، شیب یونی، جابجایی پروتئین، فسفوریلاسیون و سایر واکنشهای وابسته به آنزیم، اعمال می-کنند(دورمن و دینز ۲۰۰۰). اسانس‌ها به علت طبیعت آبگریز خود تمایل زیادی برای پیوند با لیپیدهای غشای سلول باکتری دارند، و خواص ضد باکتریایی آنها بطور آشکار به خاصیت چربی‌دوستی آنها مربوط است. برت در سال ۲۰۰٤ پیشنهاد نمود که باکتری های گرم مثبت حساسیت بیشتری به خواص ضد باکتریایی ترکیبات اسانس گیاهی نسبت به باکتری های گرم منفی دارند. ممکن است انتظار برود که باکتری های گرم منفی دارای یک لایه خارجی در اطراف دیواره سلولی خود باشند که به عنوان یک سد نفوذپذیر عمل نموده و دسترسی ترکیبات آبگریز را محدود می‌نماید. با این حال، هلاندر و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که تیمول های فنولیک و کارواکرول رشد باکتری های گرم منفی را نیز با تخریب غشاء بیرونی سلول، مهار می‌نمایند. به نظر می-

رسد که وزن مولکولی کم اسانس اجازه می‌دهد تا آنها به غشای داخلی باکتریهای گرم منفی نفوذ نمایند.
همچنین خلفه گیاهی با میزان بالایی از اسیدهای چرب امگا-۳ است که خاصیت ضدمیکروبی این ترکیبات به اثبات رسیده است. بنا بر مطالعات مختلف، اسیدهای چرب امگا-۳ با اثر بر باکتری‌ها آنها را از رشد باز می‌دارد که هنوز مکانیسم دقیق این ممانعت کنندگی مشخص نیست ولی احتمالاً اولین تأثیر آنها بر تخریب غشای پلاسمایی باکتری است که منجر به صدمات سلولی و نهایتاً مرگ می‌شود. همچنین مشخص شده است که حساسیت باکتری های گرم مثبت نسبت به بازدارندگی اسیدهای چرب بیش از باکتری های گرم منفی است که دلیل آن تفاوت بین دیواره سلولی این دو گروه از باکتری هاست (کانوسپاسیا و همکاران ۲۰۱۲).

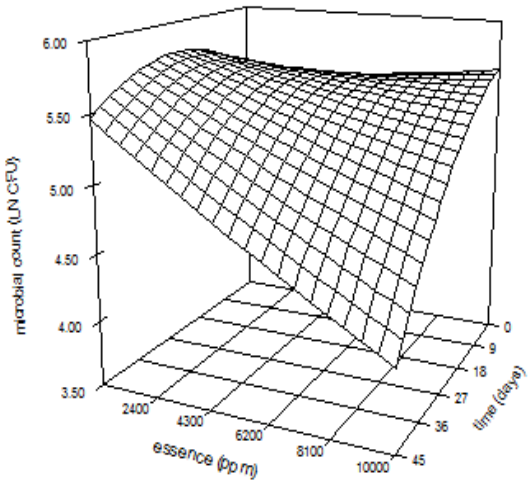
جدول ۴- شمارش کلی استافیلوکوکوس اورئوس در سوسیس آلوده حاوی عصاره خلفه

زمان شمارش(روز)	۰	۱۵	۳۰	٤٥
control	٥/٤٨^{Ab}	٥/٨٩^{Aa}	٦/٠٠^{Aa}	٦/٠٤^{Aa}
N	٥/٤٨^{Ab}	٥/٨٥^{Aa}	٥/٩٧^{Aa}	٥/٩٩^{Aa}
K1	٥/٤٨^{Ab}	٥/٨١^{Aa}	٥/٧١^{ABa}	٥/٥٠^{Bb}
K2	٥/٤٨^{Ab}	٥/٧٢^{Ba}	٥/٥٦^{Bab}	٤/٤٧^{Bb}
K3	٥/٤٨^{Ab}	٥/٦٧^{Ca}	٥/١٠^{Bab}	٤/٨٠^{Cbc}
K4	٥/٤٨^{Aa}	٥/٦٢^{Ca}	٤/٨٠^{Cb}	٤/١٤^{Dc}

*کمیت‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ٥درصد تفاوت معناداری با یکدیگر ندارند.حروف بزرگ نشان دهنده اختلاف در میان سطرها و حروف کوچک نشان دهنده اختلاف در میان ستون‌ها می‌باشند

گزارش شده است که خلفه منبع غنی از ترکیباتی نظیر کومارین، فلاوونوئیدها و ساپونین هستند که اثر ضدمیکروبی ساپونین به تأثیر آن بر روی استرول های غشایی برمی‌گردد. بنابراین باکتریهایی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس که غشای سلولی آن حاوی مقادیر بالایی از استرول‌هاست، به این ترکیب حساسیت نشان می‌دهد. همچنین اخیراً گزارش شده است که ترکیب اسید های چرب غبشا نیز همانند استرول‌ها نسبت به ساپونین حساس است (سنعا یعقوب و همکاران ۲۰۰٦).
با توجه به نتایج در جدول ٤، محیط های کشت حاوی ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام عصاره خلفه و محیط حاوی نیترات به تنهایی (بر اساس سطح مورد استفاده در فرآورده های گوشتی)، در تمامی روزهای مورد بررسی فاقد هرگونه اثر معنادار روی تعداد استافیلوکوکوس های مورد شمارش بود. بجز در غلظت ۱۰۰۰۰ پی پی ام عصاره خلفه، در سایر غلظت های مورد استفاده هیچگونه اثر معناداری بین شمارش تعداد استافیلوکوکوس‌ها طی روزهای مختلف کشت مشاهده نگردید. بنابراین عصاره متانولی برگ گیاه خلفه تنها در غلظت ۱۰۰۰۰ پی پی ام دارای اثر باکتریواستاتیکی بوده و سبب کاهش معنادار تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس شد. لذا میزان MIC برای عصاره خلفه در مخلوط سوسیس۱۰۰۰۰ پی پی ام گزارش شد در حالیکه عصاره در سطوح به کار رفته هیچ اثر بازدارندگی نداشت. با توجه به نوع و میزان ترکیبات گزارش شده در خلفه، اثر باکتریواستاتیکی عصاره متانولی برگ خلفه را می‌توان به حضور ترکیبات کارواکرول و γ- ترپاینن نسبت داد. مطالعات نشان می‌دهد که کارواکرول با غشا سلولی واکنش داده و فسفولیپیدها را حل نموده و زنجیره های اسیدهای چرب را در یک ردیف قرار می‌دهد. از شکل انداختن ساختمان فیزیکی، موجب کشیدگی و عدم ثبات غشای سلولی می‌شود که سیالیت و روانی غشا را افزایش داده و موجب افزایش نفوذپذیری سلول می‌شود (گالوچی و همکاران ۲۰۰۹).
عدم قدرت بازدارندگی عصاره را می‌توان به طبیعت هیدروفیلیک عصاره نسبت داد چرا که مقاومت سلول-

های میکروبی بستگی به سرعت و میزان حل شدن مواد ضدمیکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی دارد، همچنین اختلاف در آبگریزی سطح سلول به عنوان عامل مؤثر دیگر پیشنهاد گردیده است (های و همکاران ۲۰۰٤، لنسیوتی و همکاران ۲۰۰۵). بنابراین میتوان عدم بازدارندگی عصاره در غلظت‌های به کار رفته را به نحوه چگونگی نفوذ و انتشار آن در محیط نسبت داد. ضمن آنکه همانطور که قبلاً اشاره شد، میزان ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی موجود در عصاره متانولی برگ خلفه (۸۳ ٪) نسبت به اسانس (۹۳٪/٤) کمتر است و برخی از ترکیبات مؤثر در بازدارندگی رشد باکتری‌ها در عصاره متانولی قابل بازیافت نیست و یا به نسبت کمتری از اسانس استخراج می‌شود. نکته قابل توجه در مورد اثر عصاره متانولی برگ خلفه بر باکتری‌های استافیلوکوکوس شمارش شده، افزایش تعداد آنها در ۱۵ روز ابتدایی تلقیح باکتری بود. با توجه به جدول ٤ و شکل ۲ در تمام سطوح غلظت عصاره افزوده شده به جز K_4 افزایش معناداری در سطح ۹۵٪ در تعداد باکتری‌های شمارش شده مشاهده شد که احتمالاً ناشی از اثر حمایتی ترکیبات موجود در سوسیس نظیر چربی‌ها، پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها ضد عملکرد ماده ضدمیکروبی می‌باشد (مهدویان مهر و همکاران ۲۰۱۰).



شکل۲- رویه حاصل از اثر متقابل میزان اسانس و زمان گرمخانه‌گذاری بر تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

نتیجه گیری

آنچه امروزه بسیار مورد توجه متخصصین علم غذا قرار دارد استفاده از ترکیبات طبیعی و غیر سنتزی به جای ترکیبات ضدمیکروبی مصنوعی و یا استفاده توأم این مواد در مقادیر کمتر تحت عنوان تکنولوژی هاردل [۷] است. بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق، می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که گیاه خلفه با دارا بودن مقادیر قابل توجه ترکیبات ضدمیکروبی، میتواند جایگزین بخشی از نیترات مورد استفاده در فرآورده‌های گوشتی باشد. همانطور که قبلاً ذکر شد، نیترات مصرفی در فرآورده‌های گوشتی علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی در رنگ و طعم محصول نیز مؤثر است لذا حذف کامل آن از لحظ کیفی به محصول صدمه می زند. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی مبنی بر خاصیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره برگ گیاه خلفه، می توان بخشی از نیترات را با آن جایگزین کرده و در عین حال خواص مفید مربوط به نیترات نیز حفظ شود.

[7] -Hurdle Technology

منابع مورد استفاده

شهنیا م و خاکسار ر،۱۳۹۱، بررسی اثرات ضدمیکروبی و روشهای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانسهای گیاهی برباکتری‌های پاتوژن. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۵ ،۹۵۵-۹۴۹.

کامکار الف، رکنی ن، چراغعلی ع، حسینی ه، رضایی م، بکایی س، نوروزیان الف، عبداله زاده ع، ۱۳۸۳، اندازه گیری میزان باقیمانده نیتریت در انواع فرآورده های گوشتی عرضه شده در ایران به وسیله روش اسپکتروفتومتریک. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،۵۹، ۱۸۲-۱۷۹.

Aussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M, 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. Coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control 18: 414– 420.

Bae J, 2004. Antimicrobial effect of *Portulacaoleracea*Exteract on Food-Borne Pathogens.Journal of Food Science and Nutrition 9: 306-311.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils- A review.Food Chemistry and Toxicology 46: 446–475.

Burt S, 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods:A review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.

Cenocepacia B, Mil-Homens D, Bernardes N and Fialho A, 2012.The antibacterial properties of docosahexaenoic omega-3 fatty acid against the cystic fibrosis multiresistant pathogen . Microbiology Letters 328 :61–69.

Chan K, Islam MW, Kamil M, Radhakrishnan R, Zakaria MN, Habibullah M and Attas A, 2000. The analgesic and antiinflammatoryeffects of Portulacaoleracea L. subsp. Sativa (Haw.) Celak.Journal of Ethnopharmacology 73:445-451.

Deans SG and Svodoba KP, 1989. Antibacterial activity of summer savory (Saturejahortensis L.) essential oil and its constituents.Journal of Horticultural Science 64: 205–210.

Dorman HJD and Deans SG, 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.Journal of Applied Microbiology 88: 308–316.

Eklund T, 1985. Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids andesters of *p*-hydroxybenzoic acid. International Journal of Food Microbiology 2:159.

Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J and Demo M, 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus*and *Bacillus cereus*. Flavour and Fragrance Journal 24, 348–354.

Gutierrez J, Barry-Ryan C and Bourke P, 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oilcombinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology 124: 91–97.

Habibi Z, Eftekhar F, Samiee K and Rustaiyan B, 2000. A Structure and antibacterial activity of new labdanediterpenoid from Salvia leriaefolia. Journal of Natural Products 63: 270–271.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol L, Smid EJ, Gorris LGM and von Wright A, 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria.Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 3590–3595.

Holley RA and Patl D, 2005. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, Journal of Food Microbiology 22:273-292.

Juven BJ, Kanner J, Schved F and Weisslowicz H, 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.Journal of Applied Bacteriology 76:626-631.

Kamanzi A, tindehou K, Kone M, Terreaux C, Traore D, Hostettmann K and Dosso M, 2002.Evaluation of the Antimicrobial Potential of Medicinal Plants from the Ivory Coast. Phytotherapy Research 16: 497–502.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P and Nychas GJE, 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol.Journal of Applied Microbiology 91: 453–462.

Lanciotti R, Gianatti A, Patrignani F, Belletti N, Guerzoni ME and Gardini F, 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. Journal of Food Science & Technology 15: 201-208.

Lim YY and Quah EPL, 2007. Antioxidant properties of different cultivars of Portulacaoleracea.Food Chemistry 734–740.

Malek F, Boskabady MH, Borushakiand MT and Tohidi M, 2006. Bronchodilatory effect of *Portulacaoleracea* in airways of asthmatic patients.Journal of ethnopharmacology 93:57-62.

Pandit VA and Shelef LA, 1994. Sensitivity of Listeria monocytogenes to rosemary (Rosmarinusofficinalis L.).Food Microbiology 11: 57– 63.

Reji MW and Den Aantrekker ED, 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. Food Microbiology 91:1-11.

Sartonatto A, Machado A L, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT and Rehder VLG, 2004. Composition and antimicrobial activity of assential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 35(4):256-280.

Simopoulos AP, 2004. Omega-3 fatty acids and antioxidants in edible wild plants.Biological Research 263–277.

Tajkarim MM, Ibrahim SA and Cliver DO, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food.Food Control 21:1199-18.

Yagoub S, Al Safi S, Ahmed B and El Magbol AZ, 2006. Antimicrobial activity of some medicinal plants against some Gram positive, Gram negative and fungi. Journal of Food Technology 3 (1): 35-40.

Zhang XJ, Ji YB, Qu ZhY, Xia JCh and Wang L, 2002. Experimentalstudies on antibiotic functions of Portulacaoleracea L.in vitro. Chinese journal of Microecology 14:277-280.

Investigation on the antimicrobial effects of *Portulaca oleracea* leaves essence and extract on *Staphylococcus aureus* to reduce nitrate used in meat products

Parnian Pezeshki*[1]

Received: January 18, 2015 Accepted: March 02, 2015
PhD Student, Food Microbiology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran And Instructor, Department of Nutrition, Varastegan Institute for Medical Sciences, Iran
*Corresponding author: E mail: Parnian.pezeshki85@gmail.com

Abstract
In this study , the antimicrobial effects of *Portulaca oleracea* leaves essence and extract on *Staphylococcus aureus* to reduce nitrate used in meat products is investigated. For this purpose, methanol extract and essential oil of *Portulaca Oleracea* leaves were prepared and chemical composition were determined. Antimicrobial activity of them were investigated with different concentrations (500, 1000, 5000 and 10000 ppm) and 50ppm nitrate solution on *Staphylococcus aureus* count in sausage at different time intervals: storage for 15, 30 and 45 day at -12°C.The results showed that 83% and 93.4% of main constituents of the extracts and essence were phenolic compounds and flavonoids , respectively, which exhibit significant bactericidal activity. The results also indicated that MIC of the extract was 10000 ppm and it did not show any bactericidal effect on *S. aureus.* While the MIC and MBC of essence were respectively 500 and 10000 ppm was considered. Also nitrate concentration used did not show inhibitory effects on the growth of *S. aureus.* These data indicate that *Portulaca Oleracea* leaves essence and extract can exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*; so it can be considered as an alternative natural preservative in food products.

Keywords: Antibacterial effects, nitrate, Portulaca Oleracea leaves essence and extract, Staphylococcus aureus