(مقاله پژوهشی)

ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریالی عصاره ریشه شیرین‌بیان در شکلات مایع

مینا میرزائی[۱]، سید علی یاسینی اردکانی[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم وصنایع غذایی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۹

چکیده

شیرین بیان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی است که به‌واسطه دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و آنتی باکتریالی عصاره ریشه شیرین بیان در شکلات مایع می‌باشد. پس از استخراج عصاره، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد ارزیابی گردید. اثر ضدمیکروبی عصاره بر رشد استافیلوکوس اورئوس و اشرشیاکلی با روش انتشار در چاهک بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها، از عصاره شیرین بیان در غلظت‌های ۰/۵٪ و ۱٪ در فرمولاسیون شکلات مایع استفاده شد. نمونه‌های حاوی عصاره به همراه نمونه شاهد در دمای ^{o}C ۳۰ قرار گرفتند و رشد میکروبی در فواصل زمانی ۱، ۱۵ و ۳۰ روز و ارزیابی حسی در روز اول پس از تولید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره شیرین بیان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۹/۵۳µg/ml، ۳۹/۶µg/ml و بر روی اشرشیاکلی به ترتیب۱۵۶/۲۵µg/ml و ۳۱۲/۵۰µg/ml مشاهده شد. نتایج آزمون میکروبی نشان داد استفاده از عصاره شیرین بیان باعث افزایش ماندگاری شکلات مایع طی ۳۰ روز می‌شود. افزودن عصاره شیرین بیان تا ۱٪ در فرمولاسیون شکلات مایع موجب افزایش پذیرش کلی در ارزیابی حسی می‌گردد. به‌طورکلی استفاده از ۱ درصد عصاره شیرین بیان در فرمولاسیون شکلات مایع می‌تواند موجب افزایش ماندگاری و بهبود خصوصیات حسی آن شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره شیرین بیان، DPPH، ویژگی‌های ارگانولپتیک، خواص آنتی‌اکسیدانی، خواص ضدمیکروبی.

*مسئول مکاتبات: a.yasini@iauyazd.ac.ir

۱- مقدمه

بیش از صد سال است که در بیشتر کشورها شکلات به دلیل ارزش غذایی بالا و طعم مطلوب، یکی از پرطرفدارترین مواد غذایی محسوب می‌شود (۲۶). طبق تعریف استاندارد ملی ایران شکلات فرآورده‌ای است که مواد اصلی آن خمیر کاکائو، پودر کاکائو، کره کاکائو، روغن‌های قابل جانشین با کره کاکائو، شکر یا سایر شیرین‌کننده‌ها، شیر خشک و مواد افزودنی مجاز خوراکی که طی فرآیند کامل و درست مخلوط و سپس به‌صورت یکنواخت‌تهیه‌می‌شود (۲). شکلات مایع از آب جوشیده سرد مخلوط با شکر، وانیل، پودر کاکائو تهیه می‌شود که پرکاربردترین موارد مصرف آن روی کیک، سس شکلاتی دونات و سس شکلات براونی بوده و در ترکیب شکلات مایع با برخی میوه‌ها مزه فوق‌العاده‌ای دارد. در چند دهه اخیر نگرش کلی جوامع در زمینه مواد غذایی دست‌خوش تغییرات قابل‌توجهی شده است. بدین معنا که مصرف‌کنندگان بیش از پیش به این باور رسیده‌اند که غذا به‌طور مستقیم بر سلامتی آن‌ها اثر دارد (۲۳). با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان نسبت به سالم بودن افزودنی‌های غذایی خصوصاً از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌ها سعی بر این است که از افزودنی‌های طبیعی که دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند به‌جای مواد شیمیایی ترکیبی در مواد غذایی استفاده شود (۵). شواهد بسیارزیادی‌وجوددارد‌که‌اثرات سوءتغذیه‌ای آنتی‌اکسیدان‌های تجاری اضافه شده به مواد غذایی را تأیید می‌کنند. علاوه بر این خطر آسیب کبدی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی از معایب استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های تجاری است(۴و۶).شیرین بیان با نام علمی *GlycyrrhizaGlabra* از خانواده *Legominosae* یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در ایران است (۲۰) که به‌واسطه دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حائز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار گرفته است. عصاره ریشه این گیاه چندین خواص دارویی مفید مانند فعالیت‌های ضدالتهابی، ضد سرطان و ضدمیکروبی را دارا می‌باشد (۲۴). حدود ۵۰۰ نوع ترکیب در شیرین بیان شناسایی شده است که به‌طور عمده فلاونوئیدها، استرول‌ها، پلی-ساکاریدها و ساپونین‌های تری پرپن چند مورد از این ترکیبات هستند (۲۱). فلاونوئیدهایی مانند لیکو کالکون A[1]، لیکوکالکون B[2]، آلیناتین[3]، گلیسی‌کومارین[4] و گلیورالین[5] در این گیاه دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌باشند (۱۵). امروزه شیرین بیان و مشتقات آن در انواع مواد غذایی به‌عنوان طعم‌دهنده، شیرین‌کننده طبیعی، تشدیدکننده طعم و عامل فعال سطحی به کار می‌روند و به‌واسطه حضور ترکیبات زیست فعال دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدالتهابی و غیره می‌توانند اثرات سلامت بخش داشته باشند (۱۳). در مطالعه Fu و همکاران (۲۰۱۳) گزارش گردید فلاونوئیدهای جداشده از ریشه شیرین بیان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بالایی می‌باشد (۱۵). در مطالعه Mousavi و Mousavi(۲۰۱۹) ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نوشیدنی تهیه شده از تخمیر عصاره شیرین بیان بالا بیان شد (۲۴). با توجه به اثرات سودمند شیرین بیان (ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی) و از آنجا که تاکنون در صنعت غذای ایران از شیرین بیان استفاده چندانی نشده است؛ بنابراین به‌منظور بهره‌گیری از اثرات مفید این گیاه و تولید محصولات متنوع و مغذی، در این تحقیق عصاره شیرین بیان استخراج و پس از ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی و میکروبی آن، به‌عنوان یک ترکیب نگهدارنده در فرمولاسیون شکلات مایع مورد بررسی قرار گرفت.

1- Licochalcone A
2 -Licochalcone B
3 -Alinatin
4- Glycine Coumarinc
5 -Gliuralin

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و آماده‌سازی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان

ریشه‌های تازه شیرین بیان در اردیبهشت‌ماه از منطقه انار در استان کرمان جمع‌آوری شدند. گیاه توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان یزد، *Glycyrrhizaglabra* L؛ و از تیره *Paoilionaceae* با شماره هرباریومی ۳۰۶۶ شناسایی گردید. ریشه‌های شیرین بیان تمیز شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته خشک (درصد رطوبت ۶/۴۵ درصد) و سپس با آسیاب (مدل پاناسونیک MX1061، ساخت ژاپن و ایران) پودر (مش ۲۰) شد. برای استخراج عصاره از روش سوکسله و حلال اتانول استفاده گردید. در عصاره گیری، نسبت الکل به آب ۱ به ۲ و نسبت الکل به نمونه ۱ به ۱۰ بود. پس از استخراج، عصاره‌ها با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تغلیظ شدند. عصاره‌های غلیظ شده نیز با استفاده از دستگاه آون غلیظ‌تر گردیدند (۲۸).

۲-۲- آزمون‌های عصاره شیرین بیان

۲-۲-۱- بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره

در این تحقیق از آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌عصاره‌شیرین بیان استفاده شد (۲۹). غلظتی از عصاره که ۵۰ درصد بازداری را نشان می‌دهد (IC50) بر اساس درصد بازداری در برابر غلظت عصاره به دست آمد. هر چه این غلظت کمتر باشد، نشان دهنده این است که عصاره شیرین بیان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد (۱۶).

۲-۲-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره

۲-۲-۲-۱-آماده‌سازی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

سویه میکروارگانیسم‌های اشرشیا کلی (ATCC 25922)، استافیلوکوکوس‌اورئوس(ATCC 25923) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. برای کشت اولیه میکروارگانیسم‌ها از محیط مایع تریپتیک سوی براث (TSB) استفاده شد.

۲-۲-۲-۲- تهیه سوسپانسیون میکروارگانیسم‌ها

بعداز رشد میکروارگانیسم‌هابرروی محیط‌کشت، از کلنی‌های تک برداشته و در محلول نمکی رینگر سوسپانسیونی معادل کدورت نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) تنظیم شد. چگالی صحیح کدورت استاندارد با اندازه‌گیری جذب در اسپکتروفوتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر مشخص شد (۲۷).

۲-۲-۲-۳-تعیین‌اثرضدمیکروبی‌عصاره‌دربرابرمیکروارگانیسم‌ها

به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره و قدرت تأثیر آن بر رشد میکروارگانیسم‌ها از روش انتشار در چاهک استفاده شد. ابتدا از نمونه‌های باکتری کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه کرده و با سوآپ در پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار گسترش داده شد. در سطح پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر و به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از همدیگر و ۲/۴ سانتی‌متر از لبه پلیت ایجاد گردید و در هر یک از چاهک‌ها غلظت $۱۰^{۸}$CFU/ml از سوسپانسیون میکروبی بر روی مولر هینتون آگار به‌صورت کشت داده شد. از عصاره تام شیرین بیان به میزان ۵۰ میکرولیتردرداخل چاهک‌ها با استفاده از میکروپیپت تزریق‌شد.به‌عنوان‌کنترل‌مثبت‌از۳۰µgآنتی‌بیوتیک تتراسایکلین استفاده گردید. پس از اتمام کار کشت باکتری‌ها تمامی محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباکتور قرار داده شدند. پس از گذشت این مدت کشت‌های باکتریایی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری و میانگین مربوطه ثبت شد (۲۵).

۲-۲-۲-٤-تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌هانسبت‌به‌عصاره شیرین بیان

با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC[1]) و حداقل غلظت‌کشندگی‌عصاره شیرین بیان (MBC[2]) تعیین گردید. برای تعیین MIC عصاره از پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده گردید.۰/۰۱ گرم از عصاره با ۱۰۰۰میکرولیترDMSOاستریل مخلوط شد (محلول استوک) و درتمامی چاهک‌های پلیت میکروتیتر مقدار ۱۰۰میکرو لیتر از محیط کشت مولر هینتون براث افزوده شد. پس از اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول استوک به اولین چاهک و مخلوط کردن، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته شد و به چاهک دوم اضافه شد و این فرآیند تا چاهک شماره ۱۰ ادامه یافت. مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک آخر برداشته شد و به بیرون ریخته شد. چاهک شماره ۱۱ به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون باکتری به‌علاوه محیط کشت)، چاهک شماره ۱۲ به‌عنوان کنترل منفی (حاوی عصاره به‌علاوه محیط کشت) بود. سپس به همه چاهک‌ها به‌استثنای چاهک کنترل منفی، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک فارلند که دارای $۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml باکتری بود، انتقال داده شد. رقت‌های سریالی به نسبت ۵۰ درصد از اولین چاهک با غلظت ۲۵۰۰µg/ml تا آخرین چاهک با غلظت ۴/۸۸ µg/ml تهیه شد. پس از آماده‌سازی پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پایین‌ترین غلظتی که هیچ‌گونه کدورتی درآن مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی تعیین‌گردید. برای مشخص نمودن حداقل غلظت میکروب‌کشی ازرقت‌هایی که کدورتی در آن‌ها مشاهده نشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌ها استفاده شد (۱۱).

۲-۳- آماده‌سازی شکلات مایع حاوی عصاره شیرین‌بیان

برای تهیه شکلات مایع، گلوکز با بریکس ۸۲٪ از شرکت گلوکزان قزوین، لستین از شرکت پاسیفیک، پودر کاکائو از شرکت آلکالیزد، وانیل از شرکت پولار، سیروپ شکر از کارخانه آب حیات گستر یزد و روغن هیدروژنه گیاهی از شرکت لادن تهیه شد. در مرحله اولسیروپ شکر (۳۰٪)، روغن هیدروژنه گیاهی (۵٪) و پودر کاکائو (۳/۸٪) با هم مخلوط گردید و در حین حرارت دادن بهروش بن ماری به‌صورت دستی هم زده شد. در مرحله دوم گلوکز (۶۱٪)، لستین (۰/۱٪) و وانیل (۰/۱٪) به شکلات مایع افزوده و پس از همگن شدن در دمای محیط سرد گردید. در نهایت عصاره شیرین بیان با غلظت‌های ۰/۵ و ۱٪ به نمونه‌های شکلات مایع افزوده شد. نمونه‌های فاقد عصاره شیرین بیان به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شدند.

۲-٤-آماده‌سازی‌شکلات‌مایع‌حاوی‌شیرین‌بیان‌بامیکروارگانیسم تلقیحی

برای اطمینان از عاری بودن نمونه‌های شکلات مایع و عصاره شیرین بیان از باکتری‌های اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس، آزمون شناسایی این دو باکتری بر روی شکلات مایع انجام شد. سپس به‌منظور بررسی اثر عصاره شیرین بیان بر ویژگی‌های‌ضدمیکروبی‌وافزایش‌زمان‌ماندگاری، سوسپانسیون میکروارگانیسم‌هاباغلظت$۱/۵\times۱۰^{۳}$CFU/gبه‌صورت جداگانه به هر یک از نمونه‌های شکلات شاهد و شکلات مایع حاوی دو غلظت عصاره تلقیح شدند. نمونه‌های حاوی میکروارگانیسم‌های تلقیحی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در طی روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ پس از تولید از نظر زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها مورد آزمون قرار گرفتند.

۲-۵- آزمون‌های شکلات مایع

۲-۵-۱- آزمون میکروبی نمونه‌های شکلات مایع

ابتدا ۱۰گرم از نمونه‌های شکلات مایع هموژن شده با ۹۰ میلی‌لیترمحلول‌رقیق کننده مخلوط شد و سپس از سوسپانسیون اولیه مقدار ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر

1-Minimum Bactericidal Concentration
2- Minimum Bactericidal Concentration

رقیق‌کننده استریل انتقال داده شد و رقت ۰/۰۱ تهیه شد. به همین ترتیب رقت‌های بالاتر برای آزمون تهیه شدند. برای شمارش استافیلوکوکوس اورئوس از محیط کشت بردپارکر آگار و برای شمارش اشرشیاکلی از محیط کشت VRB استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های محدب و گرد که رنگ مشکی براق دارای هاله شفاف اطراف به‌عنوان باکتری استافیلوکوس اورئوس و کلنی‌های قرمز یا ارغوانی همراه با هاله قرمز به‌عنوان باکتری اشرشیاکلی شمارش شدند.

۲-۵-۲- ارزیابی حسی

ارزیابی حسی نمونه‌های کدگذاری شده در روز بعد از تولید، به روش هدونیک (خیلی بد (۱) تا خیلی خوب (۵)) توسط ۱۰ نفر از دانشجویان تحصیلات تکمیلی رشته علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی یزد از لحاظ طعم (مزه و بو)، ظاهر (رنگ)، بافت غیردهانی، بافت دهانی (احساس دهانی) و پذیرش کلی ارزیابی شدند. برای افزایش دقت، به ارزیاب‌ها بین هر دو نمونه آب‌معدنی داده شد.

۲-۶- آنالیز آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.داده‌هابا استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$) مقایسه گردیدند. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS بود و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره

همان‌گونه در جدول ۱ آورده شده است با افزایش غلظت عصاره، میزان جذب رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد و این افزایش در بین غلظت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری را نشان داده است. غلظتی از عصاره شیرین بیان که در آن ۵۰٪ از رادیکال‌آزادDPPHاحیاءشد(IC50) معادل ۵۳۲/۸۷µg/ml است. در مطالعه منوری و همکاران (۱۳۸۷) نیز بیان گردید غلظت ۵۰۰µg/ml عصاره شیرین بیان دارای اثر مهارکنندگی می‌باشد (۷). بافت شیرین بیان دارای آنزیم‌های حذف‌کننده رادیکال‌های آزاد (کاتالاز و آسکورباتپراکسیداز و ...) و شبکه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم (ترکیبات فنلی، کاروتنوئیدها و ...) هستند (۳۰) که به ترتیب سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی گیاه را تشکیل می‌دهند. در واقع این آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال آزاد یا ممانعت از تشکیل آن‌ها، از سلول در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند (۱۷).برخی از اجزای شیمیایی شیرین‌بیان‌مانندفلاونوئیدهای‌پلی‌فنولیک به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند. این احتمال می‌رود که تأثیر سینرژیستیک فلاونوئیدها فوق سبب بروز اثرات آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه شود (۶ و ۳). Jiang و همکاران بیان کردند پودر عصاره شیرین بیان (۱٪) در گوشت‌های خوک نگهداری شده در یخچال توانست از اکسیداسیون گوشت‌ها در مقایسه با نمونه‌های شاهد جلوگیری کند (۱۹).

جدول ۱- درصد مهار DPPH توسط غلظت‌های مختلف عصاره شیرین بیان

غلظت (mg/l)				
۱۵۰۰	۱۰۰۰	۸۰۰	۵۰۰	۲۵۰
۷۶/۴۱ a ± ۸۲	۱۴/۲۴ b ± ۷۴	۵۱/۳۹ c ± ۶۵	۸۳/۲۸ d ± ۴۴	۰/۶۶ e ± ۲۵/۰۲

*حروف غیرمشترک نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

۳-۲- تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره

قطر هاله عدم رشد در باکتری استافیلوکوس اورئوس ۰/۱۵ ± ۳۳/۹۶ میلی‌متر و در باکتری اشرشیاکلی ۰/۲۵ ± ۲۲/۲۳ میلی‌متر تعیین گردید. نتایج آزمون T-test نشان داد تأثیر مهار رشد بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر بوده است ($p<۰/۰۵$). نتایج نشان داد اثر مهارکنندگی عصاره شیرین بیان بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۱۹/۵۳µg/ml و اثر کشندگی در غلظت ۳۹/۶µg/ml بوده است درحالی‌که بر روی اشرشیاکلی در غلظت ۱۵۶/۲۵µg/ml اثر بازدارندگی رشد و در غلظت ۳۱۲/۵۰µg/ml اثر باکتری کشی نشان داده است. تأثیر ترکیبات ضد میکروبی عصاره‌ها معمولاً نسبت به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از باکتری اشرشیاکلی است که به دلیل حضور غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی است که به دلیل ایجاد لایه حفاظتی، نفوذ ترکیبات هیدروفوب به غشای داخلی را محدود می‌کند (۱۰ و ۱۲). بیشتر فعالیت ضدمیکروبی عصاره شیرین بیان به علت اجزای ایزوفلاونوئید به‌ویژه هیسپا گلابریدین[1]، ۴- اُمتیل گلابریدین۲، گلابریدین۳، گلابریل۴ و ۳- هیدروکسی گلابرول۵ می‌باشد (۱۴، ۱۶ و ۱۸). به‌طور مشابه در مطالعه Malek و Ghazvini، Irani و همکاران و Ates و Turgay فعالیت ضد میکروبی شدید عصاره شیرین بیان علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی گزارش شده است (۹، ۱۸ و ۲۲).

۳-۳- خاصیت ضد میکروبی عصاره شیرین بیان در شکلات مایع

جدول ۲ تأثیر تیمارها بر تعداد باکتری‌های استافیلوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در طی دوره نگهداری را نشان می‌دهد. آزمون میکروبی ۲۴ ساعت بعد بر روی نمونه‌ها انجام شد. کاهش تعداد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی در نمونه‌های حاوی شیرین بیان ۰/۵٪ و ۱٪ در مقایسه با تیمار شاهد ($p<۰/۰۵$) نشان دهنده تأثیر ضدمیکروبی عصاره شیرین بیان از روز اول ارزیابی، می‌باشد. در روز پانزدهم روند افزایشی در تعداد میکروارگانیسم‌ها مشاهده شد. این روند افزایشی در تعداد باکتری اشرشیاکلی در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، بیشتر بود که به نظر می‌رسد با توجه به خاصیت ضد باکتریایی عصاره شیرین بیان و مشاهده تأثیر بیشتر عصاره بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی، این نتایج قابل قبول باشد. همچنین نمونه حاوی شیرین بیان ۰/۵٪ نسبت به نمونه شاهد تعداد میکروارگانیسم کمتری داشته است که البته این تفاوت در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس معنی‌دار نبوده است ($p>۰/۰۵$).در روز سی‌ام روند کاهش میکروارگانیسم‌ها در نمونه شاهد چندان مشهود نبود و اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد با روز پانزدهم مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در نمونه‌های حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اختلاف معنی‌داری بین روند کاهشی نمونه حاوی شیرین بیان ۰/۵٪ و ۱٪ مشاهده شد. بیشترین کاهش در نمونه حاوی شیرین بیان ۱٪ مشاهده شد به‌طوری‌که تعداد استافیلوکوکوس رشد یافته کمتر از میزان تلقیح شده در روز اول بوده است. برخلاف باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تعداد باکتری اشرشیاکلی در نمونه ۱٪ در پایان روز سی‌ام بالاتر از مقدار اولیه تلقیح شده بود. مقاومت بیشتر اشرشیاکلی در مقابل عوامل ضد میکروبی ناشی از ساختار دیواره و غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی است (۱۰ و ۱۲).

1-Hispaglabridin
2- 4'-O-Methylglabridin
3-glabridin
4-glabrin
5-3-Hydroxyglabrol

در مطالعه مشابهی رستم زاد و زکی پور و همکاران (۱۳۹۷) نیز گزارش کردند که استفاده از عصاره شیرین بیان در پوشش خوراکی کیتوزان موجب جلوگیری از افزایش بار باکتریایی فیله ماهی نگهداری شده در این پوشش می‌شود (۳). کرمی و همکاران (۱۳۹۱) نیز نشان دادند که عصاره شیرین بیان با خاصیت میکروبی خود توانست بار میکروبی نمونه‌های نوشابه‌های پرتقالی حاوی عصاره را با اندازه نمونه‌های شاهد حاوی بنزوات کاهش دهد (۵).

جدول ۲- شمارش میکروارگانیسم‌ها (logCFU) در شکلات حاوی عصاره شیرین بیان و شاهد در دوره نگهداری

میکروارگانیسم	تیمار	زمان نگهداری (روز)		
		۱	۱۵	۳۰
استافیلوکوکوس اورئوس	شاهد	۲/۹٤±۰/۰۳۲Ba	۵/۹±۰/۰۵۱Aa	٦/۳۵±۰/۰۲٤Aa
	حاوی ۰/۵٪ عصاره	۲/۸٦±۰/۰۲۰Cb	۵/٦٤±۰/۰۱٦Aa	۵/٤۲±۰/۰۲۲Bb
	حاوی ۱٪ عصاره	۲/٦۵±۰/۰٤۲Bc	٤/۹۰±۰/۰۲۹Ab	۲/۱٦±۰/۰۸۸Cc
اشرشیاکلی	شاهد	۲/۱۹±۰/۰۵۵Ca	٦/۹۲±۰/۰۵۵Aa	٦/۳۵±۰/۰۱۷Ba
	حاوی ۰/۵٪ عصاره	۲/۱۱±۰/۰۱۸Cb	٦/۷۱±۰/۰۳۷Aa	۵/٦۷±۰/۰٦۱Bb
	حاوی ۱٪ عصاره	۱/٦۹±۰/۰۸۸Cb	۳/۹۲±۰/۰۵۷Ac	۳/۰۱±۰/۰۷۷Bc

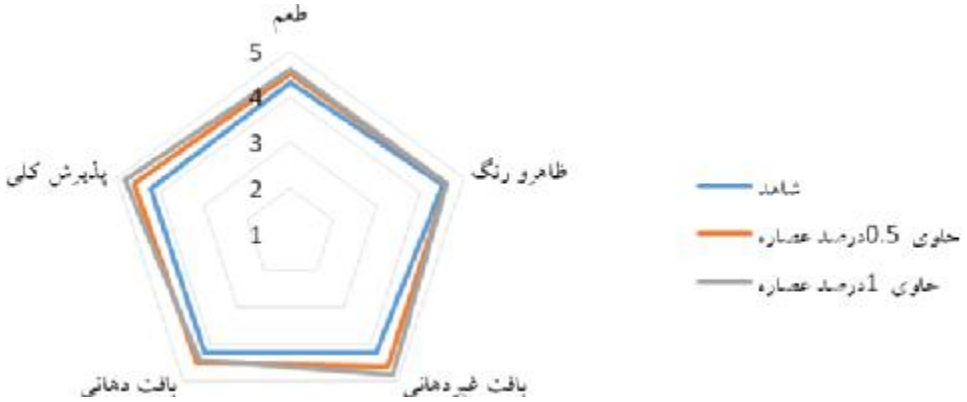
*حروف غیرمشترک نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است ($p<0.05$)

*در هر میکروارگانیسم، حروف بزرگ مقایسه بین یک ردیف و حروف کوچک مقایسه بین یک ستون را نشان می‌دهند.

۳-٤- ارزیابی‌حسی نمونه‌ها

شکل ۱ نشان می‌دهد که در تمامی ویژگی‌های مورد بررسی، افزودن عصاره شیرین بیان باعث افزایش پذیرش شکلات مایع نسبت به نمونه شاهد شده است. در بین ویژگی‌های حسی از نظر طعم، ظاهر و رنگ بین نمونه‌های شاهد و حاوی عصاره شیرین بیان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. ($p>۰/۰۵$). در بین سایر ویژگی‌ها با افزایش درصد عصاره از ۰/۵ به ۱٪ درصد مقبولیت نمونه‌های حاوی عصاره افزایش پیداکرد.از نظر پذیرش کلی افزایش عصاره شیرین بیان تا ۱٪ موجب افزایش سطح پذیرش شکلات غنی شده با شیرین بیان گردید. میرعمادی‌وهمکاران‌خاصیت تشدیدکنندگی طعم گلیسیریزیک اسید[1] موجود در عصاره شیرین بیان را موجب افزایش شیرینی و در نتیجه مقبولیت محصول بیان کردند (۸). در مطالعه اعظمی کاربرد نسبت ۶۵:۳۵ کاکائو به شیرین بیان و ۵ درصد شکر در فرمولاسیون شیرکاکائو، بیشترین امتیاز طعم و مزه و پذیرش کلی را کسب کرد (۱).

1-Glycyrrhizic Acid



شکل ۱-مقایسه ویژگی‌های حسی تیمار شاهد و تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف شیرین بیان

٤- نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر دو غلظت عصاره شیرین بیان (۰/۵ و ۱٪) بر خواص ضد میکروبی، فیزیکی و حسی شکلات مایع به‌منظور انتخاب بهترین غلظت به جهت افزایش ماندگاری شکلات مایع مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمون‌های بیان شده نشان دادند که بهترین خصوصیات کاربردی را نمونه‌های شکلات مایع حاوی ۱٪ عصاره شیرین بیان دارا بودند؛ بنابراین افزودن ۱٪ عصاره شیرین بیان می‌تواند جایگزین نگهدارنده‌های مصنوعی به‌منظور دستیابی به ماده غذایی با کیفیت بالا گردد.

٥- منابع

۱. اعظمی، ط. ۱۳۹۳. فرمولاسیون، تهیه و بررسی خواص فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی‌و حسی شیر حاوی شیرین بیان و پودر آن (جایگزینی پودر کاکائو). پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی صنایع‌غذایی، شیمی مواد غذایی، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی.

۲. رستم‌زاد، هـ و زکی پور، ا. ۱۳۹۷. تولید و ارزیابی فیلم زیست تخریب پذیر کیتوزان حاوی عصاره شیرین بیان (Glycyrrhiza glabra) به‌منظور بسته‌بندی‌فیله‌ماهی‌فیتوفاگ (Hypophthalmichthys molitrix). *نشریه نوآوری در علوم و فناوری صنایع غذایی*، شماره ۳، ۹۵-۷۹.

۳. سلاحورزیان، ا.، بداله پور، ف.، اسماعیلی، ا.، سپهوند، ف. و آزادپور، م. ۱۳۹٤. فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی دو نوع عسل حاصل از تغییر در جیره غذایی زنبور در مقایسه با دیگر عسل‌های تولیدی منطقه آبستان شهرستان خرم‌آباد. *فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان*، شماره۳، ۱۲۵-۱۱۵.

٤. کرمی، ز.، میرزایی، ح.ا.، امام جمعه، ز.، صادقی ماهونک، ع. و خمیری، م. ۱۳۹۱. ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی شیرین بیان در نوشابه پرتقالی. *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد ۸، شماره۲، ۲٦۱-۲۵۱.

۵. مرتضی‌سمنانی، ک.، سعیدی، و. و شهنوا، ب. ۱۳۸۲. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره شیرین‌بیان با آنتی‌اکسیدان‌های تجاری در کرم هیدروکینون ۲ درصد. *مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران*، جلد۱۳، ۱۰-۱.

٦. منوری، ح.ر.، شمسی شهرآبادی، م. و مرتاض‌کار، پ.۱۳۸۷. بررسی اثرات ضدویروسی عصاره شیرین‌بیان‌بر روی هرپس سیمپلکس ویروس‌تاپ یک. *فصلنامه گیاهان دارویی*، دوره ٤، ٨٦-٨١.

٧. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۹۵. شکلات- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد ملی ایران شماره ٦٠٨.

٨. میرعمادی، پ.، عزت پناه، ح.، لاریجانی، ک.، عزیزی‌نژاد، ح. و متقیان، پ. ۱۳۸۸. مقایسه روش‌های‌مختلف‌استخراج‌اسید گلیسریزیک‌ازپودرعصاره شیرین بیان. *مجله علوم و صنایع غذایی و تغذیه*، شماره ۱، ۲۸-۲۱.

9. Ateş, D. A. and Turgay, Ö. 2003. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 27(3):157-162.
10. Benhammou, N., Bekkara, F. A. and Panovska, T. K. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 022-028.
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 2015. Available at: https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf.
12. Dorman, H. D. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2): 308-316.
13. Fenwick, G. R. Lutomski, J. and Nieman, C. 1990. Liquorice, Glycyrrhiza glabra L. Composition, uses and analysis. *Food chemistry*, 38(2):119-143.
14. Field, J. A. and Lettinga, G. 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. *In Plant polyphenols*, 673-692.
15. Fu, Y.Chen, J. Li Y. J. Zheng, Y. F. and Li, P. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory activities of six flavonoids separated from licorice. *Food chemistry*, 141(2):1063-1071.
16. Hosseini, A. Rad, A. H. E. and Shahi, M. M. N. 2018. Extraction of antioxidant compounds of Anacyclus pyrethrum root extract and evaluation of its oxidative stability in sunflower oil. *Journal of Biochemical Technology*, 9(2): 48-52.
17. Hosseini, M. S. Samsampour, D. Ebrahimi, M. Abadía, J. and Khanahmadi, M. 2018. Effect of drought stress on growth parameters, osmolyte contents, antioxidant enzymes and glycyrrhizin synthesis in licorice (Glycyrrhiza glabra L.) grown in the field. *Phytochemistry*, (156): 124-134.
18. Irani, M. Sarmadi, M. and Bernard, F. 2010. Leaves antimicrobial activity of Glycyrrhiza glabra L. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 9(4): 425.
19. Jiang, J. Zhang, X. True, A. D. Zhou, L. and Xiong, Y.L. 2013. Inhibition of lipid oxidation and rancidity in precooked pork patties by radical-scavenging licorice (Glycyrrhiza glabra) extract. *Journal of food science*, 78(11): C1686-C1694.
20. Khoshnam, S.E.Farzaneh, M. and Bahaoddini, A. 2015. Review of the phytochemical, pharmacological and physiological properties of Licorice (Glycyrrhizaglabra*). Clinical Excellence*, 4(1): 71-56.
21. Li, Y. H., Qi, Y. R., Wu, Z. F., Wang, Y. Q., Wang, X. C., Wang, F. and Yang, M. 2017. Comparative study of microwave-vacuum and vacuum drying on the drying characteristics, dissolution, physicochemical properties, and antioxidant capacity of Scutellaria extract powder. *Powder technology*, (317):430-437.
22. Malek, J. M. and Ghazvini, K. 2007. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to licorice extract.*Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (1): 69-72.
23. Mollet, B. and Rowland, I. 2002. Functional foods: At the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(13): 483-485.
24. Mousavi, Z. E. and Mousavi, M. 2019. The effect of fermentation by Lactobacillus plantarum on the physicochemical and

functional properties of liquorice root extract. *LWT*, (105): 164-168.

25. Osés, S. M., Pascual-Mate, A. de la Fuente, D. de Pablo, A Fernandez-Muino, M. A. and Sancho, M. T. 2016. Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against Staphylococcus aureus. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, (78): 29-33.
26. Segall, S. D., Artz, W.E., Raslan, D. S., Ferraz, V. P. and Takahashi, J. A. 2005. Analysis of triacylglycerol isomers in Malaysian cocoa butter using HPLC–mass spectrometry. *Food research international*, 38(2): 167-174.
27. Thornsberry, C. and Mcdougal, L. K. 1983. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, 18(5): 1084-1091.
28. Wei, S. S., Yang, M., Chen, X., Wang, Q. R. and Cui, Y.J. 2015. Simultaneous determination and assignment of 13 major flavonoids and glycyrrhizic acid in licorices by HPLC-DAD and Orbirap mass spectrometry analyses. *Chinese Journal of Natural Medicines*, (13):232-240.
29. Zainoldin, K. H. and Baba, A. S. 2009. The effect of Hylocereus polyrhizus and Hylocereus undatus on physicochemical, proteolysis, and antioxidant activity in yogurt. World Academy of Science. *Engineering and Technology*, 60: 361-366.
30. Zhang, Y., Yang, F., Zhang, J., Sun, G., Wang, C., Guo, Y., Wen, R. and Sun, W. 2019. Quantitative fingerprint and quality control analysis of Compound Liquorice Tablet combined with antioxidant activities and chemometrics methods. *Phytomedicine*, (59): 152790.

(Original Research Paper)

Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Properties of Licorice Root Extract in Liquid Chocolate

Mina Mirzaei[1], Seyyed Ali Yassini Ardakani[2*]

1- MS.c Graduate of Food Science and Technology, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Scince and Technologyy, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

Received:26/10/2020 Accepted:27/02/2021

Abstract

Licorice is one of the most important medicinal plants that has been considered by the pharmaceutical, food and even tobacco industries due to its important medicinal and nutritional compounds in its roots and rhizomes. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antibacterial properties of licorice root extract in liquid chocolate. After extracting the extract, antioxidant activity was evaluated by free radical scavenging activity tests. The antimicrobial effect of the extract on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was investigated by well diffusion method and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration were determined. To control the growth of microorganisms, licorice extract was used in concentrations of 0.5% and 1% in liquid chocolate formulation. Samples containing the extract along with the control sample were exposed to 30 ℃ temperature and microbial growths were examined at 1, 15 and 30 days after treatments. Sensory evaluation of the samples was also performed. The results showed that licorice extract has high antioxidant properties. Minimum Inhibitory Concentration and the Minimum Bactericidal Concentration were observed on *Staphylococcus aureus* 19.53 µg/ml, 39.6 µg/ml and on *Escherichia coli* 156.25 µg/ml and 312.50 µg/ml, respectively. The results of microbial test showed that the use of licorice extract increases the shelf life of liquid chocolate for 30 days. Adding licorice extract up to 1% in liquid chocolate formulation increases overall acceptance in sensory evaluation. In general, the use of 1% licorice extract in liquid chocolate formulation can increase its shelf life and improve its sensory properties.

Keywords: Extract of Licorice Root, DPPH, Organoleptic Characteristics, Antioxidant Properties, Antimicrobial Properties.

[*]**Corresponding Author:**a.yasini@iauyazd.ac.ir