

بررسی نقش پروبیوتیک ها (مخمر ساکاروماایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم) در تخمیر آب شلغم به

عنوان محصول تخمیری

پدرام حیدری^{۱*}، هاله احمد پور^۲

۱. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحدخوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

چکیده

مقدمه: محصولات پروبیوتیک بدلیل نقش مهمی که در سلامتی انسان دارند امروزه نقش مهمی را در رژیم غذایی انسان ایفا میکنند. نوشیدنی تخمیری شلغم به رنگ قرمز و طعم ترش که در اثر تخمیر لاکتیکی که با مخلوط کردن شلغم با هویج سیاه و آرد بلغور و نمک و آب و پروبیوتیک ها تولید می شود. آب شلغم یک نوشیدنی مغذی به دلیل مواد معدنی بالا، ویتامین ها، اسیدهای آمینه و محتوای پلی فنولی و بویژه ترکیبات آنتوسیانینی است .

مواد و روش ها: این تحقیق به بررسی نقش میکروارگانیسم های پروبیوتیک (مخمرها و لاکتوباسیلوس ها) در تخمیر آب شلغم بعنوان محصول تخمیری پرداخته است. در تولید آب شلغم تخمیر با روش مستقیم انجام گرفته است برای این منظور سوسپانسیون مخمری (ساکاروماایسس سرویزیه) و همچنین سوسپانسیون باکتریایی (لاکتوباسیلوس پلانتاروم) با حجم ۰/۰، ۱/۲٪ و ۲٪ ۷/۷ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج مربوط به تخمیر الکلی (با مخمر ساکاروماایسس سرویزیه) نشان داد که میزان تولید الکل در نمونه های حاوی مخمر ساکاروماایسس سرویزیه در طی فرآیند تخمیر افزایش یافت. مقدار الکل در ۲۴ ساعت اول به ۰/۲٪ رسید، سپس در ۴۸ ساعت به ۰/۷٪ افزایش یافت و در ۷۲ ساعت مقدار آن به ۱/۳٪ رسید. بیشترین میزان تولید الکل در نمونه های دارای ۱/۲٪ مخمر مشاهده شد. همچنین، پس از رسیدن به اوج تخمیر، میزان الکل تثبیت شده و تغییر چندانی نداشت، نتایج مربوط به تخمیر لاکتیکی (باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم) نشان داد که میزان تولید اسید لاکتیک در نمونه های حاوی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز افزایش قابل توجهی داشت. مقدار اسید لاکتیک تولید شده در طی فرآیند تخمیر بین ۶/۳ تا ۷/۵ گرم بر لیتر متغیر بود. بالاترین میزان باکتری های اسید لاکتیک در روز دوم تخمیر مشاهده شد، در حالی که تعداد کل مخمرها و باکتری های مزوفیل هوازی در روز سوم تخمیر به بیشترین مقدار رسید. میزان اسیدیته در طول تخمیر کاهش یافت و در نهایت به مقدار ۳/۴۶ تا ۳/۵۴ رسید که نشان دهنده فعالیت مؤثر باکتری های لاکتیکی در فرایند تخمیر است.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که هر دو میکروارگانیسم پروبیوتیک (مخمیر و باکتری) توانایی تخمیر و تولید نوشیدنی تخمیری را دارند. با این حال، میزان تخمیر، تولید الکل، و پذیرش محصول در نمونه تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشتر از سایر نمونه ها بود. مطلوب ترین طعم و کیفیت در نمونه آب شلغم حاوی ۱/۲٪ پروبیوتیک مشاهده شد.

کلمات کلیدی: آب شلغم، تخمیر، ساکاروماایسس سرویزیه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم

The Survey of the role of probiotics Microorganisms (*Saccharomyces cerevisiae* & *Lactobacillus plantarum*) in the fermentation of turnip water (Shalgam Juice) as fermentation Products

Pedram heydari^{1*}, Haleh ahmadpoor²

1. Assistant professor, Department of food Science and Technology, Islamic Azad University, Khoy, Iran
2. Master student, Department of food Science and Technology, Islamic Azad University, Khoy, Iran

Abstract

Introduction: Probiotic products significantly contribute to human health and diets. Turnip fermented drink, characterized by its red color and sour taste, is produced by lactic fermentation using turnip, black carrot, semolina flour, salt, water, and probiotics. This drink is rich in minerals, vitamins, amino acids, and polyphenols, particularly anthocyanins. This research investigated the role of probiotic microorganisms in the fermentation of turnip juice as a fermented product.

Methods: This study examined the roles of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in fermenting turnip juice using a direct method. In the production of turnip juice, fermentation has been done by a direct method. Yeast and bacterial suspensions were tested at concentrations of 0%, 1.2%, and 2% v/v.

Results: Alcoholic Fermentation (*Saccharomyces cerevisiae*): Alcohol levels reached 0.2% at 24 hours, increasing to 0.7% at 48 hours, and peaking at 1.3% by 72 hours. Maximum alcohol production occurred with 1.2% yeast, after which levels stabilized. Lactic Fermentation (*Lactobacillus plantarum*): Lactic acid production ranged from 6.3 to 7.5 g/L, with peak lactic acid bacteria observed on day two. Aerobic mesophilic bacteria, and yeast, counts peaked on day three, then declined. Final pH values ranged from 3.46 to 3.54. Microbiological assessments showed significant lactic acid bacteria on the second day and reduced total bacteria by the end of fermentation.

Conclusion: Both microorganisms successfully fermented the drink; however, the product fermented with *Lactobacillus plantarum* had higher acceptability, alcohol, and fermentation levels. The best taste and quality were achieved with 1.2% turnip juice.

Keywords: Turnip juice, fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* & *Lactobacillus plantarum*

مقدمه

آشامیدنی های تخمیری آن دسته از محصولاتی هستند که در تولیدشان، فعالیت میکروارگانیسم ها دخالت داشته و موجب تغییرات بیوشیمیایی در آنها میشود که بسته به نوع میکروارگانیسم، فرایند تخمیر می تواند الکلی یا غیر الکلی باشد (۱). تخمیر یا fermentation یک فرایند متابولیکی است که قند طی آن توسط مخمر یا باکتری به اسید، گاز و یا الکل تبدیل می شود. به منظور اینکه تخمیر به طور موفق انجام شود باید ۳ عامل میکروب، منبع کربن و حرارت حضور داشته باشند. فرایند تخمیر علاوه بر اینکه سبب افزایش ماندگاری محصول می شود بلکه هضم آنرا در دستگاه گوارش تسهیل کرده و آرومای خاصی را در محصول تولید میکنند (۲). پروبیوتیک ها اگر بصورت متعادل در دستگاه گوارش و بدن انسان توزیع شوند و تعادل فلور میکروبی به سود آنها چرخش پیدا کند دارای اثرات سودمندی برای بدن آسان می باشند (۳و۴). مخمر *ساکارومایسز سرویزیه* هم توانایی رشد در حضور اکسیژن را داراست و هم در غیاب آن به خوبی رشد کرده و در محیط های خنثی تا کمی اسیدی میتواند با تخمیر قندهای نظیر گلوکز، مانوز، تrehalose و گالاکتوز و حتی تخمیر قندهای ۵ کربنه الکل تولید نماید (۵). *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* یکی دیگر از پروبیوتیک هاست که در غیاب اکسیژن از تخمیر قند میتواند اسیدهای آلی و الکل تولید کند و اگر تعداد آن در روده مناسب باشد میتواند ماندگاری بالایی در این محیط داشته باشد و در حضور نمک با غلظت بالا به رشد خود ادامه دهد (۶). این باکتری در آب انار نیز رشد کرده و میتواند از منابع مختلف کربنی برای رشد استفاده کند (۷).

نویسنده مسئول: استادیار، گروه علوم صنایع

غذایی، واحدخوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی،

ایران

آدرس الکترونیک:

Pe.HHeidari@iaui.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

برای انتخاب یک پروبیوتیک مناسب در محصول این باکتری باید دارای ویژگی های از قبیل تحمل تغییر اسیدیته، رقابت با سایر میکروارگانیسم ها در محیط، تحمل تغییرات منابع غذایی، نوع متابولیسم و قابلیت پذیرش سوپسترا باشد (۵). نوشیدنی شلغم به رنگ قرمز، ابری و طعم ترش که در اثر تخمیر لاکتیکی با مخلوط کردن ترب شلغم با هویج سیاه و آرد بلغور (گندم خرد شده) و نمک و آب و مخمر تولید می شود آن به طور گسترده در شهرهای آدانا هاتای و ایسل (مناطق مدیترانه ترکیه) مصرف می شود در سال های اخیر معمولاً در کلان شهرهایی مثل استانبول آنکارا و ازمیر استفاده می شود (۶). ترکیبات آب شلغم جداگانه که به شکل مجموع مواد خشک با (۰/۴-۰/۲) و پروتئین (۰/۰۹-۰/۰۱۸) و نمک (۰/۱۱-۰/۲۲) اسیدلاکتیک (۰/۵۷۸-۰/۰۵ گرم در لیتر) و خاکستر (۰/۴۶-۰/۲۰۶) و اتانول (۰/۷۹-۰/۴۱) گزارش شده است اسیدیته قابل تیتراسیون ۰/۰۶-۰/۱ گرم در لیتر و اسیدیته ۰/۱۵-۰/۲۵ می باشد (۸و۹). قند در طی تخمیر در آب شلغم وجود ندارد (۱۰) آب شلغم یک محصول خانگی است هرچند که اخیراً به شکل تجاری صنعتی تولید آن افزایش یافته است (۱۱). دو روش برای تولید تجاری وجود دارد یکی روش سنتی و دیگری روش مستقیم در روش سنتی دو مرحله مجزا وجود دارد تخمیر خمیر اولین تخمیر و تخمیر هویج دومین تخمیر از سوی دیگر در روش مستقیم فقط دومین تخمیر وجود دارد (۱۰،۱۲). در روش سنتی تخمیر خمیر با افزودن خمیر ترش نمک آب آرد بلغور انجام می شود خمیر ترش با استفاده از مخمر نانوائی خمیر در دمای اتاق به مدت چند ساعت یا طول شب تخمیر می شود (۱۰) مخلوط در دمای محیط به مدت ۳ تا ۵ روز قرار داده می شود بخش اصلی در تخمیر خمیر ترش افزایش یافتن تعداد باکتری های اسید لاکتیکی و مخمرهاست (۶) بعد از تخمیر اولیه مخلوط با آب عصاره گیری شده نمک و تکه های هویج سیاه و شلغم به عصاره حاصله جهت تخمیر ثانویه به تانک حاوی عصاره افزوده می شود این مخلوط بسته به دما ۳ تا ۱۰ روز تخمیر می شود بعد از تخمیر ثانویه آب شلغم به رنگ قرمز ابری و ترش حاصل می شود و بعد از فیلتراسیون در بطری ها و ظروف پلاستیکی بسته بندی می شود (۱۲).

در این مطالعه هدف تولید آشامیدنی تخمیری از شلغم (*Brassica rapa*) و هویج بنفش (*Daucus carota*) با استفاده از استارترهای پروبیوتیک ساکارومایسس سرویزیه و لاکتو باسیلوس پلانتاروم می باشد.

مواد و روش ها

مواد

در این پژوهش از مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5052) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران و لاکتو باسیلوس پلانتاروم (PTCC 1058) خریداری شده از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران استفاده گردید. نمونه های شلغم و آرد بلغور و نمک و شکر از بازار شهر خوی و هویج سیاه از سلماس تهیه گردیده است. از نظر زمان کشت و سویه ها دارای شرایط یکسانی بوده اند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و رطوبت ۸۰٪ یخچال نگهداری شدند.

روش کار

مقادیر استاندارد تلقیح باکتری در روش کار

در این مطالعه، مقادیر تلقیح باکتری لاکتو باسیلوس پلانتاروم (PTCC 1058) و مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5052) بر اساس استانداردهای علمی و میکروبیولوژیکی تعیین شده است.

روش تهیه و تلقیح سوسپانسیون میکروبی :

فعال سازی مخمر

سویه *Saccharomyces cerevisiae* تحت شرایط استریل به محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) منتقل شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. پس از رشد کامل، کلنی های مخمر به سرم فیزیولوژی منتقل شدند تا سوسپانسیون استاندارد تهیه گردد.

فعال سازی باکتری

سویه *Lactobacillus plantarum* در محیط کشت MRS Agar به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از رشد کامل، کلنی های باکتری در سرم فیزیولوژی حل شده و به روش اسپکتروفتومتری استاندارد سازی شدند.

استاندارد سازی میزان تلقیح

تعداد سلول های مخمر و باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد، طول موج استاندارد برای مخمر: ۵۲۴ نانومتر، طول موج استاندارد برای باکتری ۵۶۰-۶۲۰ نانومتر و تعداد سلول های میکروبی تنظیم شده در محلول سوسپانسیون به میزان $10^8 \times 10^1$ cfu/ml رسید (۱۴).

میزان تلقیح در محیط تخمیر

برای تخمیر الکلی، مقدار 10^1 cfu/ml از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به محیط تخمیر اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوباسیون شد. برای تخمیر لاکتیکی، مقدار 10^1 cfu/ml از باکتری *Lactobacillus plantarum* به محیط تخمیر افزوده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. این روش تلقیح استاندارد تضمین می کند که جمعیت میکروبی در محیط تخمیر به سطح مطلوب برای انجام واکنش های بیوشیمیایی برسد و باعث تولید بهینه الکل و اسید لاکتیک شود.

پاستوریزاسیون و تهیه آب شلغم

برای انجام آزمایشات ابتدا نمونه های آب شلغم مطابق دستورالعمل روش مستقیم تولید آب شلغم با نسبت های ۳٪ آرد بلغور و ۰/۲ سنگ نمک پودر شده و ۲۰٪ هویج بنفش سلماس و ۲٪ شلغم و به اندازه کافی آب آشامیدنی که حجم آن را به یک لیتر رسانده و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه پاستوریزه شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. (۱۵). برای تولید آب شلغم در این مطالعه از روش مستقیم استفاده شد که تخمیر خمیر ترش (تخمیر اول) انجام نمی گیرد (۱۶). کلیه آزمایشات دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی خوی

آزمایشگاه میکروبیولوژی و همچنین در آزمایشگاه کنترل کیفی کارخانه بهنوش انجام گرفته شده است.

مرحله تخمیر

تخمیر در این آزمایش در دو مرحله انجام گرفت: تخمیر الکلی و تخمیر لاکتیکی. در ابتدا به میزان 10^{10} cfu/ml از کلنی مخمر به ظرف حاوی آب شلغم اضافه کرده به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای انجام تخمیر الکلی قرار گرفت. همچنین مخمر به نسبت های ۰/۰ و ۱/۲ و ۲/۲ نیز به یکی از نمونه ها اضافه گردید. پس از این مرحله به میزان 10^{10} cfu/ml از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ظرف مورد نظر انتقال داده و برای انجام تخمیر لاکتیکی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون گردید (۱۱).

شمارش میکروبی

شمارش میکروبی بروش پور پلیت انجام گرفت برای شمارش مخمر از محیط کشت Yeast Extract Agar و برای شمارش لاکتوباسیل از محیط کشت MRS Agar استفاده گردید. و برای شمارش از فرمول زیر استفاده گردید (۱۷).

$$\text{تعداد در هر میلی لیتر} = \frac{\sum c}{(n1+0.1n2)d}$$

اندازه گیری pH و الکل

برای اندازه گیری هر یک از پارامترهای زیر مطابق روش ذکر شده در استاندارد ملی ایران عمل گردید. برای اندازه گیری pH از دستگاه pH متر مطابق استاندارد ۴۴۰۴ و برای اندازه گیری الکل از استاندارد ۲۶۸۵ میزان الکل در نوشیدنی محاسبه گردید (۱۸، ۱۹).

ارزیابی حسی محصول

ویژگی حسی محصول از قبیل رنگ، بو، طعم و میزان پذیرش کلی مصرف کننده مطابق هدونیک ۵ امتیازی توسط ده ارزیاب مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۵ میلی لیتر از محصول در اختیار این افراد در شرایط محیطی کاملاً یکسان قرار گرفت.

یافته ها

شمارش مخمر و باکتری لاکتوباسیل

تعداد مخمر و باکتری در سه زمان ۲۴، ۴۸، ۷۲ شمارش شدند. تعداد مخمر بعد از ۴۸ ساعت افزایش داشته ولی بعد از ۷۲ ساعت تعداد مخمر کاهش یافته بود، تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز از الگوی فوق تبعیت میکرد یعنی تا ۴۸ ساعت نخست افزایش داشته اما بعد از ۷۲ ساعت روند کاهشی را شاهد بوده ایم.

سنجش میزان الکل و pH

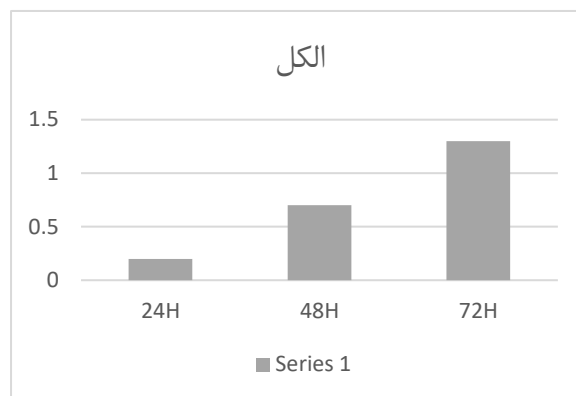
در این محصول مقدار الکل با گذشت زمان افزایش داشته است بطوریکه در ۲۴ ساعت اول میزان الکل به ۰/۲٪ و پس از ۴۸ ساعت به ۰/۷٪ و بعد از ۷۲ ساعت به ۱/۳٪ افزایش یافت (نمودار ۱). میزان pH نیز در سه زمان فوق در نمونه شاهد و نمونه مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نمونه شاهد و در روز صفر برابر ۶/۲ بود و در نمونه مورد آزمایش (لاکتوباسیل پلانتاروم) در روز اول ۵/۲ شد. در روز دوم pH روند کاهش داشته ۴/۲ و در روز سوم به ۳/۹ رسید (نمودار ۲).

نتایج ارزیابی حسی

نمونه های شماره گذاری شده بصورت رندوم در اختیار ده ارزیاب قرار گرفت و برای تغییر مزه دهان از آب و نان استفاده شد، شرایط محیطی یکسانی برای ارزیاب ها فراهم بود و نتایج به ترتیب از بیشترین پذیرش و مقبولیت تا کمترین امتیاز دهی شد.

نمودار ۱. در این نمودار مشاهده می‌کنید که در ۲۴ ساعت میزان الکل حدود ۰/۲٪، در ۴۸ ساعت به اوج یعنی ۰/۷٪ می‌رسد و در ۷۲ ساعت کاهش یافته و به تقریباً ۱/۳٪ می‌رسد

اسید لاکتیک (g/L)	۶/۳	۷/۵	۷/۵
pH	۳/۵۴	۳/۴۶	۳/۵۰
اسید استیک (g/L)	۰/۴۹	۰/۵۷	۰/۵۱
الکل اتیلیک (g/L)	۳/۷۴	۳/۵۸	۳/۳۸
قند کاهنده (mg/L)	۱۵/۲	۱۴/۰	۱۴/۵
ماده خشک (g/L)	۲۲/۶۶	۲۲/۵۶	۲۳/۱۰
خاکستر (g/L)	۱/۸۰	۲/۰۶	۱/۹۵
باکتری‌های لاکتیکی (log cfu/ml)	کمتر	بیشتر	متوسط
تعداد کل مخمر (log cfu/ml)	بیشتر	متوسط	کمتر
تعداد کلی فرم‌ها (بعد از روز سوم)	حذف شده	حذف شده	حذف شده



نمودار ۲. در این نمودار مشاهده می‌شود که مقدار اسید لاکتیک در ۲۴ ساعت حدود ۳/۶ گرم/لیتر، در ۴۸ ساعت به حداکثر یعنی ۷/۵ گرم/لیتر رسیده و در ۷۲ ساعت به حدود ۵/۷ گرم/لیتر می‌رسد



ترکیب	مخمر ۰٪	مخمر ۱.۲٪	مخمر ۲٪
-------	---------	-----------	---------

جدول ۱. ترکیبات کلی آب شلغم حاصل از افزودن ۰٪، ۱/۲٪ و ۲٪ مخمر ساکارومایسس سرویزیه

۱۱۱۴۹ TSE مقدار اسید دیته کل از جنس اسید لاکتیک بایستی از ۶ گرم در لیتر کمتر باشد (۲۰). در این تحقیق مقدار اسید لاکتیک حاصله در این نمونه‌ها بالاتر از این مقدار است مقدار اسید استیک در نمونه‌های آب شلغم در

ترکیبات کلی آب شلغم حاصل از افزودن ۰٪، ۱/۲٪ و ۲٪ مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جدول ۱ نشان داده شده است. در آب شلغم اسید کل با تیتراسیون اسیدی مشخص می‌شود مطابق با استاندارد آب شلغم ترکیه

نتیجه گیری

این تحقیق ۰/۴۹-۰/۵۷ بوده که بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ است در این پژوهش اسیدیتته نمونه‌ها در پایان تخمیر ۳/۴۶-۳/۵۴ می‌باشد جدول ۱ کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰/۲٪ و بیشترین مقدار اسیدیتته مربوط به نمونه ۰/۰٪ می‌باشد مطابق استاندارد آب شلغم ترکیه TSE ۱۱۱۴۹ بایستی ۳/۸-۳/۳ باشد (۲۰) که اسیدیتته نمونه‌های تحقیق با اسیدیتته استاندارد مطابقت دارد باکتری‌های اسیدلاکتیکی به دو دسته هموفرممنتاتیو و هتروفرمنتاتیو طبقه‌بندی می‌شود باکتری‌های هترو فرمنتاتیو در پایان تخمیر اسیده‌های فراری مثل اسید استیک و اسید پروپیونیک به وجود می‌آیند (۲۱) نتایج حاصل از ارزیابی اسیده‌های فرار بیشترین مقدار مربوط به اسیداستیک می‌باشد در این تحقیق مقدار اسیده‌های فرار از جنس اسیداستیک ۰/۷۹-۰/۹۶ گرم در لیتر می‌باشد جدول ۱ که بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰/۰٪ است در نمونه‌های آب شلغم مقدار الکل اتیلیک ۳/۳۸-۳/۷۴ گرم در لیتر می‌باشد جدول ۱ بیشترین مقدار الکل اتیلیک مربوط به نمونه ۰/۰٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۰/۲٪ است در ترکیبات کلی آب شلغم حاصل از افزودن ۰٪، ۱/۲٪ و ۲٪ مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جدول ۱ نشان داده شده است در آب شلغم اسید کل با تیتراسیون اسیدی مشخص می‌شود مطابق با استاندارد آب شلغم ترکیه TSE ۱۱۱۴۹ مقدار اسیدیتته کل از جنس اسیدلاکتیک بایستی از ۶ گرم در لیتر کمتر باشد (۲۰) در این تحقیق مقدار اسید لاکتیک حاصله در این نمونه‌ها بالاتر از این مقدار است مقدار اسیداستیک در نمونه‌های آب شلغم در این تحقیق ۰/۴۹-۰/۵۷ بوده که بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ است در این پژوهش اسدیتته نمونه‌ها در پایان تخمیر ۳/۴۶-۳/۵۴ می‌باشد جدول ۱ کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰/۲٪ و بیشترین مقدار pH مربوط به نمونه ۰/۰٪ می‌باشد مطابق استاندارد آب شلغم ترکیه TSE ۱۱۱۴۹ بایستی ۳/۸-۳/۳ باشد (۲۰) که اسیدیتته نمونه‌های تحقیق با اسیدیتته استاندارد مطابقت دارد باکتری‌های اسیدلاکتیکی به دو دسته هموفرممنتاتیو و هتروفرمنتاتیو طبقه‌بندی می‌شود باکتری‌های هترو فرمنتاتیو در پایان تخمیر اسیده‌های فراری مثل اسید استیک و اسید پروپیونیک به وجود می‌آیند (۲۱) نتایج حاصل از ارزیابی اسیده‌های فرار بیشترین مقدار مربوط به

اسیداستیک می‌باشد در این تحقیق مقدار اسیده‌های فرار از جنس اسیداستیک ۰/۷۹-۰/۹۶ گرم در لیتر می‌باشد جدول ۱ که بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰/۰٪ است در نمونه‌های آب شلغم مقدار الکل اتیلیک ۳/۳۸-۳/۷۴ گرم در لیتر می‌باشد جدول ۱ بیشترین مقدار الکل اتیلیک مربوط به نمونه ۰/۰٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۰/۲٪ است در طی پژوهشی که جان باش و دریا اولو در سال ۱۹۹۳ انجام دادند مقدار الکل اتیلیک را ۱/۳۲-۷/۳۰ گرم در لیتر ثبت کرده‌اند گونش در ۲۰۰۸ در آب شلغم‌های تولیدی مقدار الکل اتیلیک را ۳/۲۹-۴/۱۲ گرم در لیتر مشخص کرده است در نمونه‌های آب شلغم در این تحقیق قند کل ۸۰-۳۰۰ میلی گرم در لیتر مشخص شده است جدول ۱ در تحقیق دریا اوغلی نمونه‌های آب شلغم تهیه شده از بازار را بدون قند اعلام کرده بود گونش در ۲۰۰۸ مقدار قند را ۲۵۵ تا ۲۸۸ تعیین کرده بود پایین بودن قند کاهنده نشانگر به اتمام رسیدن موفق تخمیر لاکتیکی است مقدار قند کاهنده در نمونه‌ها ۱۴-۱۵/۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد جدول ۱ بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰/۰٪ است اوزلر در ۱۹۹۵ مقدار قند کاهنده را ۱۰ تا ۶۰ میلی گرم در لیتر مشخص کرده است و گونش در ۲۰۰۸ مقدار قند کاهنده را ۱۱ تا ۱۳/۸ میلی گرم در لیتر مشخص کرده است وقتی که در آب شلغم آب و سایر مواد فرار تبخیر شوند مواد باقی مانده مجموع مواد خشک را تشکیل می‌دهند ماده خشک شامل اسیده‌های عالی، نمک، پروتئین، مواد رنگی و مواد معدنی می‌باشند (۲۲) در این نمونه‌های مورد آزمایش مقدار ماده خشک ۲۲/۶۶-۲۳/۵۶ می‌باشد جدول ۱ بیشترین مقدار ماده خشک مربوط به نمونه ۱/۲٪ کمترین آن مربوط به نمونه ۰/۰٪ می‌باشد در تحقیق دیگری که روی آب شلغم انجام شده بود مقدار آن ۱۶/۹-۳۳/۹ گرم در لیتر برآورد می‌شود (۶) مجموع مواد سوخته شده نشانگر مقدار خاکستر در آب شلغم است این مواد از لحاظ ساختار غیر آلی یون‌های آنیونی و کاتیونی هستند (۲۳) به علاوه نمکی که در تولید آب شلغم استفاده می‌شود از مواد خام و مواد معدنی موجود در آب تشکیل یافته است (۲۱) در خاکستر پتاسیم، سدیم، کلسیم، آلومینیوم، آهن، سرب، مس، روی، منیزیم، آرسنیک به عنوان یون‌های کاتیونی و فسفات‌ها، کربنات‌ها

و کلرورها به عنوان یون های آنیونی می باشند (۲۳) در آنالیز میکروبی انجام شده در روی آب شلغم نتایج زیر حاصل شد از شروع تخمیر تا روز سوم تخمیر در مجموع باکتری های مزوفیل آروبیکی افزایش و سپس کاهش مشاهده شد در دهمین روز تخمیر بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین مقدار مربوط به نمونه ۲٪ است مطابق موسسه استاندارد ترکیه بایستی تعداد باکتری های مزوفیل آروبیکی $10^4 \times 1/0 - 10^0 \times 1/0$ cfu/ml باشد (۲۰) گونش در ۲۰۰۸ در طی پژوهشی مجموعه باکتری های مزوفیل آروبیکی $8/1-7/6 \log \times \text{cfu/ml}$ مشخص کرده است در هر سه نمونه آب شلغم در این پژوهش تعداد باکتری های اسید لاکتیکی افزایش مشاهده شده است و بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۱/۲٪ و ۲٪ بوده و در نمونه های آب شلغم کاهش تا ۷ روز ادامه داشته که کمترین مقدار مربوط به نمونه صفر درصدی می باشد آریجی در ۲۰۰۱ و گونش در ۲۰۰۸ تعداد باکتری های اسید لاکتیکی را $8/95-7/60 \log \text{cfu/ml}$ مشخص کرده اند بیشترین تعداد باکتری های اسید لاکتیکی در هفته چهارم مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۲٪ است تعداد باکتری های اسید لاکتیکی با گذشت زمان در دو نمونه ۱/۲٪ و ۲٪ افزایش و در نمونه ۲٪ کاهش داشته است مجموع کل مخمر در نمونه های آب شلغم تا سه روز افزایش داشته که بیشترین آن مربوط به نمونه ۲٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۱/۲٪ است نزدیک به دهمین روز تخمیر مقدار کاهش داشته به طوری که کمترین مقدار مربوط به نمونه ۲٪ و بیشترین آن مربوط به نمونه ۱/۲٪ است در رابطه با سایر پژوهش هایی که در مورد آب شلغم صورت گرفته است مجموع تعداد مخمر را $10^5 \times 3/5 - 10^7 \times 1/1$ cfu/ml مشخص کرده اند (۲۴، ۲۵، ۲۶). همچنین گونش در ۲۰۰۳ در آب شلغم های تهیه شده تعداد مخمرها را $6/76 - 8/96 \log \text{cfu/ml}$ مشخص کرده است در ادامه آزمایشات

مجموع کل مخمر در هفته ۴ بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۲٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۰٪ می باشد در نمونه های آب شلغم در هر سه نمونه با گذشت زمان مجموعه کل مخمر کاهش یافته است طبق ارزیابی انجام شده بیشترین تعداد مخمر ساکارومایسس در شروع تخمیر مربوط به نمونه ۱/۲٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۲٪ بوده و تا سومین روز تخمیر در تعداد مخمرها افزایش وجود داشته است بعد از سومین روز تا پایان تخمیر کاهش مشاهده شده است بیشترین مقدار مربوط به نمونه ۲٪ و کمترین مقدار مربوط به نمونه ۰٪ است در رابطه با تغییر تعداد مخمر ساکارومایسس در تخمیر تحقیقی انجام نشده است در ادامه آزمایشات بیشترین مقدار مخمر ساکارومایسس در هفته چهارم مربوط به نمونه ۰٪ و کمترین آن مربوط به نمونه ۲٪ است در دو نمونه ۰٪ و ۱/۲٪ با گذشت زمان تعداد مخمر ساکارومایسس افزایش یافته است در حالی که در نمونه ۲٪ با گذشت زمان تعداد کاهش یافته است در نمونه های آب شلغم با گذشت زمان از تعداد باکتری کلی فرم کاسته می شود در نمونه های ۲٪ و ۱/۲٪ به ترتیب بعد از سومین روز و چهارمین روز و در نمونه های ۰٪ بعد از ۵ روز باکتری کلی فرم مشاهده نشد نیز گونش در ۲۰۰۸ در پژوهشی که انجام داده بود اظهار داشت که در نمونه های آب شلغم بعد از ۵ روز هیچ باکتری کلی فرم مشاهده نشد ینر در ۱۹۹۷ در مرسین در ۱۰ نمونه آب شلغم متفاوت از نظر باکتری های کلی فرم، فکال، سالمونلا و استافیلوکوکوس/ورئوس بیشتر نمونه ها را نامناسب نسبت به ارزش های استاندارد اعلام کرده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان میدهد که هر دو میکروارگانیسم پروبیوتیک قادر به تخمیر و تولید این آشامیدنی پروبیوتیکی بوده اما میزان الکل و تخمیر و مقدار مقبولیت محصول در محصول تخمیری حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتروم بیشتر از بقیه بود.

منابع

1. Anon. (2013). *Turkish Food Codex Regulation on Food Additives*. Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock: Ankara, Turkey. Available online: <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm> (accessed 10 April 2017).
2. Chojnacka, K. (2010). Fermentation products. *Chemical Engineering and Chemical Process Technology*, 5.
3. FAO/WHO. (2001). *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina.
4. Espinoza, Y.R., & Navarro, Y.G. (2010). Non-dairy probiotic products. *Journal of Food Microbiology*, 27, 1–11.
5. Karovicova, J., & Kohajdova, Z. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. *Hort. Sci. (Prague)*, 30(4), 152–158.
- 6 Tanguler, H., & Erten, H. (2012). Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of Shalgam. *Food Sci. Technol.*, 46, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.026>
7. Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). [Title missing].
8. Arici, M. (2004). Microbiological and chemical properties of a drink called shalgam. *Ernahrungs-Umschau*, 51(1), 10.
9. Canbaş, A., & Deryaoğlu. (1993). Salgam Suyuna üretim teknik ve bileşimi. *Doğa - Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 17, 119–129.
10. Erten, H., Tangüler, H., & Canbaş, A. (2008). A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: shalgam. *Food Reviews International*, 24, 352–359.
11. Canbaş, A., & Fenercioğlu, H.A. (1984). Research on Shalgam juice. *Gıda*, 95, 279–286.
12. Ergin Kaya, Z., & Hammer, W.P. (1992). Identification of lactic acid bacteria during shalgam fermentation. *Gıda*, 17, 311–314. (In Turkish)
13. Harrigan, W.F., & McCance, M.E. (1990). *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology* (8th ed.). Academic Press, London.
14. Ashrafi, F. (2006). *Practical Microbiology* (1st ed.). Ahsan Publishing.
15. Özler, N., & Kılıç, O. (1996). Research on the production of fermented turnip juices. *Gıda*, 21, 323–330.
16. İncedayı, B., Uylaşer, V., & Çopur, U.A. (2008). A traditional Turkish beverage Shalgam: Manufacturing technique and nutritional value. *J. Food, Agric. Environ.*, 6, 31–34.
17. Vinderola, C.G., & Reinheimer, J.A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of other lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 10(4), 271–275.
18. Iranian National Standard (1376). Measurement of pH in fruit and vegetable products. Standard No. 4404.
19. Iranian National Standard (1386). Test methods of fruit juices. Standard No. 2685.
20. Turkish Standards Institute (TSE). (2003). TSI 1149: *Salgam Suyuna Standardized*. Ankara, Turkey.
21. Deryaoğlu, A. (1990). *A study on the production and composition of Shalgam juice* (Master's thesis). ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
22. Yener, D. (1997). *A study on physicochemical and microbiological*

properties of Shalgam juice samples in Mersin (Master's thesis). Trakya Üniversitesi.

23. Cabaroğlu, T. (1991). *Technological research on grapes from Nevşehir Ürgüp region* (Master's thesis). CÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

24. Arıcı, M. (2004). Microbiological and chemical properties of drink called shalgam. *Ernährungs-Umschau*, 51(1), 10.

25. Aydar, A. (2003). *Effects of Lactobacillus plantarum addition on quality of Shalgam production* (Master's thesis). Trakya University, Tekirdağ.

26. Özhan, N. (2000). *Survival time of Escherichia coli in Shalgam juice* (Master's thesis). Mersin University, Mersin.

تاثیر پودر دارچین^۱ بر خصوصیات میکروبی و شیمیایی همبرگر در شرایط یخچالی

فرناز خوشبخت نژاد^۱، سارامتینی^{۲*}

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

چکیده

سابقه و هدف : همبرگر از جمله پرطرفدارترین محصولات تولید شده از فراورده های گوشتی است که از نظر ارزش غذایی و طعم و شیوه ساده مصرف و همچنین فراوری سالم و ساده، از جمله محصولات مورد توجه می باشد. بنابراین گسترش روش هایی که بتواند ماندگاری و کیفیت همبرگر را بالا ببرد، مورد توجه پژوهش های نوین است. در مطالعه حاضر به بررسی امکان استفاده از پودر دارچین به عنوان یک نگهدارنده طبیعی ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی برای همبرگر پرداخته شد.

مواد و روش ها : بدین منظور از مقادیر مختلف پودر دارچین خشک (۰/۵٪، ۱٪ و ۱/۵٪) در تهیه همبرگر استفاده شد. سپس نمونه های تهیه شده در کیسه های پلی اتیلنی بسته بندی شدند و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. فاکتورهای کیفی نمونه ها در فواصل زمانی اول، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز ارزیابی شد.

یافته ها : نتایج نشان داد تیمارهای پودر دارچین در همبرگر به خصوص تیمار ۱/۵٪ از پودر دارچین توانست رشد تعداد کل باکتری ها، باکتری های سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس و کلی فرم ها را به طور معنی داری کاهش دهد. همچنین استفاده از پودر دارچین در همبرگر سبب کاهش میزان شاخص پراکسید (PV) و میزان اسید تیوباریتوریک (TBA) در همبرگر در طی چهل و پنج روز شود ($P<0.05$). همچنین میزان ترکیبات فنولی و شاخص نیتروژن فرار (TVN-B) پس از تیمار همبرگر با پودر دارچین به طور معنی داری به خصوص در تیمار ۱/۵٪ پودر دارچین افزایش یافت ($P<0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج ارزیابی کیفی و میکروبی، استفاده از پودر دارچین در فرمولاسیون همبرگر می تواند سبب افزایش ماندگاری و خواص کیفی این محصول شود.

کلمات کلیدی: همبرگر، دارچین، نگهدارنده طبیعی، خواص ضد میکروبی، خواص آنتی اکسیدانی

^۱Cinnamomum verum

The effect of cinnamon powder on the microbial and chemical properties of hamburger under refrigerated conditions

Khoshbakht Nezhad, F¹. Matini, S^{2*}

1. Department of Food Science, Khoy.C., Islamic Azad University, Khoy, Iran

2. Department of Food Science, Khoy.C., Islamic Azad University, Khoy, Iran

Abstract

Introduction: Hamburger is one of the most popular products produced from meat products, which is among the products of interest in terms of nutritional value, taste and simple way of consumption, as well as healthy and simple processing. Therefore, the development of methods that can increase the shelf life and quality of hamburgers is the focus of modern researches. In the present study, the possibility of using cinnamon powder as a natural antimicrobial and antioxidant preservative for hamburger was investigated.

Materials: In this study, different amounts of dry cinnamon powder (0.5%, 1% and 1.5%) were used in the preparation of hamburgers. Then the prepared samples were packed in polyethylene bags and kept at 4 °C. The quality factors of the samples were evaluated at time intervals of 1, 15, 30 and 45 days.

Results: The results showed that the treatments of cinnamon powder in hamburgers, especially the treatment of 1.5% of cinnamon powder, could significantly reduce the growth of total bacteria, numbers, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* and coliforms. Also, the use of cinnamon powder in hamburgers can reduce the amount of peroxide index (PV) and thiobarbituric acid (TBA), volatile nitrogen index (TVN-B) in hamburgers during 45 days ($P<0.05$). Also, the amount of phenolic compounds increased significantly after the treatment of hamburger with cinnamon powder, especially in the treatment of 1.5% cinnamon powder ($P<0.05$).

Conclusion: According to the quality and microbial evaluation results, the use of cinnamon powder in the hamburger formulation can increase the durability and quality properties of this product.

Keywords: hamburger, cinnamon, natural preservative, antimicrobial properties, antioxidant properties

مقدمه

طور موثری از رشد باکتری ها (گرم مثبت ها)، مخمرها و کپک ها را مهار می نماید. سینامالدهید و اوژنول از مهمترین ترکیبات موجود جهت غیرفعال کردن میکروب ها می باشد (6). از آن جایی که در سال های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده های طبیعی با منشا گیاهی به جای نگه دارنده های شیمیایی در محصولات خود نموده اند. این امر به دلیل تمایل زیاد مصرف کنندگان به استفاده از مواد غذایی فرآوری شده با نگهدارنده های طبیعی و از سوی دیگر توجه هر چه بیشتر متولیان بهداشتی به این موضوع می باشد (7).

مواد و روش ها

تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی

محل انجام آزمایش

فراواری همبرگر با درصد های مختلف دارچین و همچنین آزمایش های مورد بررسی در این مطالعه در آزمایشگاه آزاد اسلامی واحد خوی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه پودر دارچین

چوب دارچین از بازار شهرستان خوی خریداری شده و سپس با استفاده از آسیاب برقی پودر شد و سپس با استفاده از دستگاه UV استریل شده.

تهیه نمونه همبرگر و تهیه مخلوط همبرگر و دارچین

نمونه های همبرگر بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۴ در شرایط آزمایشگاهی تولید شد و مواد اولیه از فروشگاه های عرضه مواد غذایی شهرستان خوی تهیه و اقدام به فرمولاسیون نمونه ها گردید. به این ترتیب که گوشت چرخ شده گوسفندی خریداری شده و در مجاورت یخ و در شرایط استریل با پیازهای رنده شده مخلوط گردید. نمک به همراه آرد با نسبت مشخصی با گوشت و پیاز به مخلوط اضافه شد. سپس غلظت های مختلف (شاهد، ۰/۵٪، ۱٪، ۱/۵٪) از پودر های دارچین استریل شده به همبرگر اضافه شد سپس همبرگرها در بسته های پلی اتیلنی در دمای یخچال به مدت ۴۵ روز نگهداری گردید. تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نمونه برداری در فواصل ۱۵ روزه انجام شد (شکل ۲).

گوشت و فراورده های آن یکی از منابع پر ارزش پروتئینی در ارتباط با تغذیه بشر محسوب می شود. در کشور ایران، صنایع وابسته به گوشت یکی از مهم ترین شاخه های صنایع غذایی می باشد که بدون داشتن آگاهی و عدم دانش کافی در زمینه گوشت و علوم وابسته به آن و تکنولوژی تهیه فراورده های آن، محصول با کیفیت و سالمی روانه بازار نخواهد شد. تغییرات حسی، میکروبی و شیمیایی مواد غذایی به خصوص فراورده های گوشتی از جمله عواملی می باشند که علاوه بر ایجاد مخاطره برای سلامت مصرف کنندگان از جنبه اقتصادی نیز برای تولید کنندگان مورد توجه می باشند (۱). مطالعات زیادی در رابطه با امکان تغییر ماهیت گوشت و فراورده های گوشتی از یک محصول تجاری به یک محصول مورد قبول از لحاظ سلامتی صورت گرفته است و مانند افزودن سبزیجات، پودرها، فیبر و... همچنین حذف و یا کاهش افزودنی ها است (2). دارچین با نام علمی *Cinnamomum verum* J. Presl تیره برگ بو (*Lauraceae*) و جنس دارچین (*Cinnamomum*) و گونه *Cinnamomum zeylanicum verum* تعلق دارد که عاری از بافت چوب پنبه ای خارجی و پارانشیم زیر آن می باشد (3). که این درخت دارچین ۵ تا ۷ متر ارتفاع دارد و گیاهان همیشه سبز است و از تمام قسمت های آن بوی مطبوعی استشمام می شود (4). از برگ و شاخه های کوچک این درخت اسانس دارچین می گیرند و پوست شاخه های قطور را پس از کندن از درخت به صورت قطعات خشک لوله مانند و یا کوبیده در می آورند و این را تحت عنوان دارچین می شناسند (5). همچنین پوست دارچین از سینام آلدئید (۸۰-۶۵)٪، اوژنول و ترانس - اسید سینامیک (۱۰-۵)٪ تشکیل شده است (6). دارچین به

نویسنده مسئول: گروه علوم و صنایع غذایی،
واحدخوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

آدرس الکترونیک:

matinii.sara@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱



شکل ۱. نمونه تصویری از همبرگرهای تهیه شده در آزمایش که با درصد های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ پودر دارچین تهیه شدند

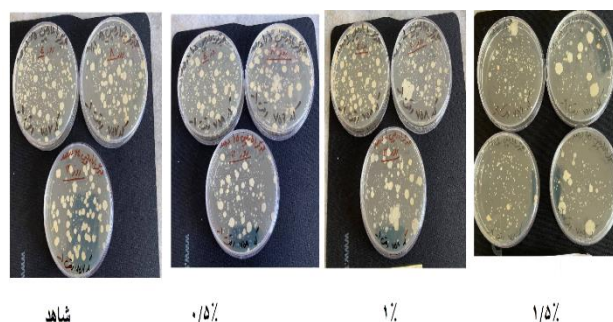
آزمون های میکروبی

آنالیزهای میکروبی برای نمونه های همبرگر

ابتدا مقدار ۲۵ گرم از هر نمونه همبرگر آماده شده از غلظت های مختلف پودر دارچین (شاهد، ۰/۵٪، ۱٪، ۱/۵٪) در روزهای اول (قبل از بسته بندی)، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به صورت آسپتیک گرفته شد، سپس با ۲۲۵ میلی لیتر آب پپتون ۱٪ W/V در کیسه های معده استریل مخلوط شد و با استفاده از یک بگ میکسر ۴۰۰ معده به مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس رقت های اعشاری مناسب به صورت سریالی در لوله بارگذاری شده با ۹ میلی لیتر آب پپتون ۱٪ W/V برای هر تیمار ارائه شد.

شمارش کلی باکتریایی و شمارش کلنی مخمر و کپک

برای شمارش کلی باکتریایی رقت های سریالی تهیه شده به صورت جداگانه به پلیت های حاوی کشت پلیت آگار منتقل شد. سپس به وسیله آنس استریل در سطح محیط کشت داده شده و در آخر پلیت ها به صورت وارونه به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از آن پلیت ها از نظر رشد کلنی ها بررسی شدند (شکل ۲). پس از شمارش کلنی ها در هر پلیت، تعداد شمارش شده در عکس رقت ضرب شده و میانگین تعداد کلنی های شمارش شده در رقت های مختلف به عنوان تعداد باکتری در هر گروه ثبت و گزارش شد (۸). برای شمارش مخمرها از محیط کشت عصاره مخمر با گلوکز و کلرامفنیل با کمک تکنیک کشت مخلوط (پورپلیت) استفاده شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۹).



شکل ۲. کلنی های شمارش شده در هر گروه تیمار همبرگر با پودر دارچین پس از ۱۶ روز

آزمون کشت سالمونلا

جهت مشخص نمودن آلودگی نمونه ها به سالمونلا، ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه همبرگر میکس شده با آب پپتون به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد (پیش غنی سازی). سپس مقدار ۰/۱ میلی لیتر از مایع را به ۹/۹ میلی لیتر محیط آبگوشت پاپورت واسیلیا دیس (RVS broth) اضافه کرده (نسبت ۱ به ۱۰۰) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (غنی سازی). سپس لوله ها را از انکوبه خارج کرده و حجم معینی از مایع

داخل لوله را به وسیله لوپ به پلیت های حاوی محیط کشت جامد انتخابی شامل مک کانی آگار و سالمونلا شینگلا آگار منتقل شد. سپس پلیت های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس از کلنی های بی رنگ یا بی رنگ با مرکز سیاه نمونه گرفته و در محیط کشت آگار برلینت گرین و محیط آگار رامباخ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. کلنی های

اضافه شد، درب آن را گذاشته، به مدت ۱ دقیقه در تاریکی استراحت داده شده و بعد مقدار ۰/۵ سی سی معرف نشاسته ۱٪ به آن افزوده می شود و درب ارلن را گذاشته، محلول به شدت تکان داده شده است. پد آزاد شده، باعث تغییر رنگ محلول شده که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال، تا بیرنگ شدن محلول یا ظهور رنگ شیری و شفاف شدن فاز بالایی روغن تیترا شده و در نهایت با استفاده از رابطه زیر، میزان پراکسید بر حسب میلی اکسی والان پراکسید در یک کیلوگرم چربی محاسبه گردید (10).

اندازه گیری TBA

برای اندازه گیری TBA ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از نمونه گوشت میکس شده همبرگر را، به بالن ۲۵ سی سی انتقال داده، و با ۱- بوتانول به حجم رسانده ۵ سی سی از این محلول را به لوله فالکون خشک دربدار انتقال داده سپس ۵ سی سی معرف TBA (که از انحلال ۲۰۰ میلی گرم پودر TBA در ۱۰۰ سی سی حلال ۱- بوتانول و صاف کردن بوسیله کاغذ صافی به دست آمده) به آن افزوده شده است. سپس لوله ها در بن ماری با دمای ۹۵°C، به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. و در دمای محیط سرد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب آنها (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان TBA (بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم از بافت همبرگر) مورد محاسبه قرار گرفت (11).

اندازه گیری TVN-B

ابتدا ۱۰ گرم از گوشت میکس شده ی همبرگر و ۲ گرم اکسید نیزیم در یک بالن کلدال توزین شد. سپس ۳۰۰ سی سی آب مقطر، ۲ قطره اکتانول (به عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه ای (یا سنگ جوش به منظور بهتر صورت گرفتن انتقال حرارت و به دام افتادن حباب های حاصل از عمل جوش در داخل فضای متخلخل و محبوس شده ی آن و جلوگیری از پریدن مایع) نیز به محتویات بالن افزوده شده است. سپس سیستم کلدال نصب شده و در زیر لوله خروجی سیستم، ارلنی ۵۰۰ سی سی حاوی ۲۵ سی سی اسیدبوریک ۲٪ دارای ۲-۳ قطره معرف متیل رد قرار گرفته به طوریکه سر لوله خروجی کاملاً درون محلول ارلن قرار گیرد. سپس گازهایی که معرف بازهای ازته فرار پس از برقرای جریان آب سرد و روشن شدن هیتر متصاعد شده، که به صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به زرد نمایان می گردد. که در نهایت این محلول با اسید

سالمونلا در محیط رامباخ به رنگ قرمز و در محیط برلینت آگار به رنگ صورتی دیده شد (۸).

آزمون کشت/استافیلوکوکوس اورئوس

ابتدا ۱ میلی لیتر از رقت تهیه شده از همبرگر به لوله درپيچدار حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کوکمیت اضافه خواهد شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. پس از این مدت ۰/۵ میلی لیتر از آن در سطح محیط کشت بردپاکر به مدت ۳۰ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. کلنی های سیاه براق با لبه های نازک سفید و هاله شفاف در اطراف آن مشخصه/استافیلوکوکوس اورئوس بود (۸).

آزمون کلی فرمها

ابتدا ۱۰ میلی لیتر از رقت تهیه شده همبرگر به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت لوریل سولفات تریتون برات با غلظت ۲ برابر اضافه شده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس در صورت تولید گاز در محیط، یک یا دو قطره از محلول محیط را به ۱۰ میلی لیتر محیط E.C برات با غلظت معمولی اضافه کرده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در بن ماری ۴۴ تا ۴۵ درجه انکوبه شد. در صورت تشکیل گاز، یک یا دو قطره از محیط به آب پیتون بدون امدول اضافه شده و مشاهده رنگ قرمز، یک تا ۲ قطره از محیط کشت را بر روی محیط کشت مک کانکی آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و سپس کلنی های ارغوانی رنگ جدا شده و در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد (۸).

آزمایش های شیمیایی

اندازه گیری PV

برای تعیین مقدار پراکسید ابتدا ۱۵ گرم از گوشت چرخ کرده مورد استفاده در همبرگر را که خوب میکس شده بود، در دکانتور ۵۰۰ سی سی قرار داده، سپس ۳۰ سی سی کلروفرم به آن افزوده و کمی تکان داده مجدداً، ۳۰ سی سی کلروفرم و بعد ۶۰ سی سی متانول به آن افزوده شد. پس از ۲۴-۱۲ ساعت، ۳۶ سی سی آب مقطر به نمونه افزوده شده به مدت ۱-۲ ساعت استراحت داده شده تا ۳ فاز تشکیل شود. با دقت، ۲۰ سی سی از فاز پایین، به ارلن مایر ۲۵۰ سی سی سر سمبادهای انتقال داده، ۲۵ سی سی اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۲:۳) به آن افزوده گردید. سپس ۰/۵ سی سی محلول یدور پتاسیم اشباع (که به صورت تازه آماده شده و در تاریکی قرار گرفته) و ۳۰ سی سی آب مقطر به محتویات ارلن

مطالعات کتابخانه ایی و آنالیزهای آماری در همه آزمایشات با سه تکرار انجام شد. از طرح آنالیز واریانس دو طرفه برای تحلیل نتایج استفاده و مقایسه میانگین ها با کمک آزمون دانکن انجام می شود. سطح معنی داری ۹۵٪ در نظر گرفته خواهد شد. تجزیه و تحلیل داده در نرم افزار SPSS ورژن ۲۱ و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell انجام شد.

نتایج و بحث

آزمون های میکروبی

شمارش کلی باکتری

نتایج حاصل آنالیز واریانس دو طرفه داده های شمارش کلی باکتری ها نشان داد که اختلاف معنی داری بین تعداد کلنی های شمارش شده در همبرگرها با درصد های مختلف پودر دارچین و همچنین بین روزهای مختلف تیمار وجود داشت ($P < 0.05$) (جدول ۱). بیشترین تعداد باکتری شمارش شده مربوط به شاهد روز ۴۵ و کمترین تعداد باکتری شمارش شده مربوط به همبرگر با دارچین ۱/۵٪ در روز ۱ بود (شکل ۱).

سولفوریک ۰/۱ نرمال تیترا شده تا محلول مجدداً ارغوانی شود و سپس با استفاده از رابطه زیر بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت محاسبه گردید (12).

$$\text{TVN-B} = \text{حجم اسید سولفوریک مصرفی} \times ۱۴$$

اندازه گیری مقدار فنول کل

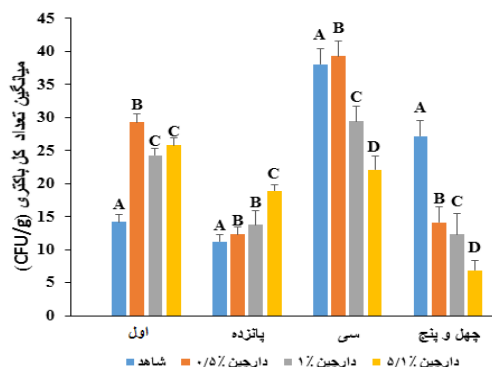
میزان ترکیبات فنولی کل در پودر دارچین با کمک روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد و نتایج به دست آمده بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم ارائه گردید. ابتدا مقدار ۱ میلی لیتر از عصاره پودر دارچین، ۱ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو ۱۰ برابر رقیق شد و به آن ۱ میلی لیتر محلول سدیم کربنات (۷/۵٪) و ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب مخلوط در دمای اتاق و طول موج ۷۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و محتوای فنول کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد (13).

آنالیز آماری

جدول ۱. جدول تغییرات شمارش کلی باکتری ها در طی زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
۱	aB ۱۸/۰±۲/۵	bB ۱۷/۰±۱/۰۲	bB ۱۷/۰±۱/۰۵	cB ۱۶/۲±۱/۵
۱۵	aC ۲۱/۰±۱/۰۲	bC ۲۰/۰±۵/۵	cB ۱۷/۰±۲/۰۷	cB ۱۷/۰±۴/۰۵
۳۰	aD ۳۹/۰±۳/۴	bD ۲۴/۱±۳/۱	cC ۲۲/۰±۳/۵	dC ۲۰/۱±۵/۳
۴۵	aE ۴۸/۳±۱/۵	bE ۳۶/۱±۴/۳	cD ۳۰/۰±۳/۸	dD ۲۵/۰±۱/۴

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۱. نمودار تغییرات شمارش کلی باکتری ها در طی زمان

شمارش کلنی مخمر و کپک

بررسی آنالیز واریانس دو طرفه داده‌های شمارش تعداد مخمر و کپک بیانگر اختلاف معنی داری بین تعداد کپک و مخمرهای شمارش شده درهمبرگرها با درصد های مختلف پودر دارچین و همچنین بین روزهای مختلف تیمار وجود داشت

($P < 0.05$) (جدول ۲). در روزهای پانزده، سی و چهل و پنجم هیچ گونه کپک و مخمری در همبرگرهای تیمار شده با ۱٪ و ۱/۵٪ پودر دارچین مشاهده نشد و بیشترین تعداد کپک و مخمر در تیمار شاهد روز ۴۵ مشاهده شد (شکل ۲).

جدول ۲. جدول تغییرات کپک و مخمر در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
روز				
۱	aB ۱/۰±۳/۴	aB ۱/۰±۳/۲	bA ۱/۰±۰/۱۰۱	bB ۱/۰±۰/۱۰۲
۱۵	aC ۱/۰±۱/۰۱	aC ۱/۰±۱/۰۵	.	.
۳۰	aB ۱/۰±۳/۴	aC ۱/۰±۲/۱	.	.
۴۵	aD ۱/۰±۵/۵	aD ۱/۰±۴/۳	.	.

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۲. نمودار تغییرات کپک و مخمر در طول زمان

شمارش تعداد باکتری سالمونلا

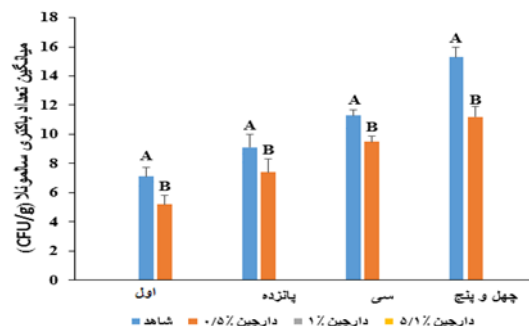
اختلاف معنی داری در تعداد باکتری‌های شمارش شده باکتری سالمونلا بین تیمارهای مختلف پودر دارچین در روزهای تیمار وجود نداشت ($P < 0.05$) (جدول ۳). در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰ و

۴۵ تیمار با دوزهای دارچین ۱٪ و ۱/۵٪ رشد هیچ باکتری سالمونلا مشاهده نشد (شکل ۳). بیشترین تعداد باکتری سالمونلا مربوط به گروه شاهد در روز ۴۵ بود.

جدول ۳. جدول تغییرات تعداد باکتری سالمونلا در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
روز				
۱	۷/۰±۱۲/۳۲ aB	۵/۰±۲/۳ bB	.	.
۱۵	۹/۰±۱/۰۵ aC	۷/۰±۴/۱ bC	.	.
۳۰	۱۱/۰±۳/۷ aD	۹/۰±۵/۶ bC	.	.
۴۵	۱۵/۱±۳/۳ aE	bD ۱۱/۰±۲/۱	.	.

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۳. نمودار تغییرات تعداد باکتری سالمونلا در طول زمان

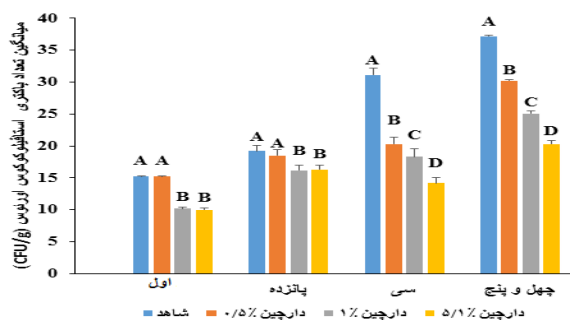
شمارش باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس

بر اساس نتایج اختلاف معنی داری بین روزهای مختلف تیمار همبرگر با پودر دارچین و تیمار دوزهای مختلف پودر دارچین در تعداد باکتری‌های رشد یافته باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۴). نتایج نشان داد که بیشترین تعداد کلنی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار شاهد روز ۴۵ (37 ± 11) و کمترین تعداد باکتری رشد یافته *استافیلوکوکوس اورئوس* در تیمار ۱/۵٪ دارچین روز اول (10 ± 0.5) بود (شکل ۴).

جدول ۴. جدول تغییرات تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
روز				
۱	aB 15.0 ± 3.2	aB 15.0 ± 3.17	bA 10.0 ± 2.3	bA 10.0 ± 0.5
۱۵	aC $19.0 \pm 2.1/6$	aC 18.0 ± 5.2	bB 16.0 ± 2.01	bB 16.0 ± 3.05
۳۰	aD 31.0 ± 1.7	bD 20.1 ± 3.1	cC 18.0 ± 3.1	dC 14.1 ± 2.1
۴۵	aE 37.1 ± 2.1	bE 30.0 ± 2.3	cD 25.0 ± 1.6	dD 20.0 ± 3.4

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۴. نمودار تغییرات تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در طول زمان

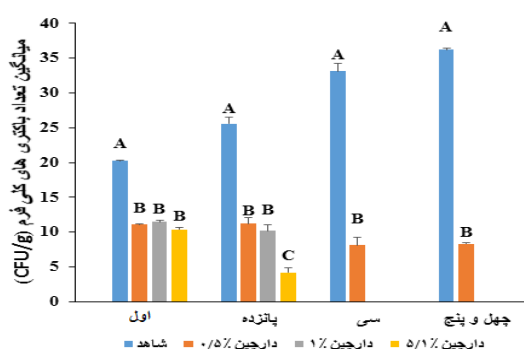
شمارش باکتری‌های کلی فرم

اختلاف معنی داری هم در روزهای تیمار و هم در دوزهای مختلف تیمار شده پودر دارچین در تعداد باکتری‌های کلی فرم در همبرگرها مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۵). تیمار پودر دارچین سبب کاهش معنی دار تعداد باکتری‌های شمارش شده کلی فرم در همبرگر شد ($P < 0.05$) (شکل ۵-۴). در ۳۰ و ۴۵ پس از تیمار همبرگرها با دوزهای ۱ و ۱/۵٪ دارچین تعداد باکتری‌های کلی فرم صفر بود. همچنین بیشترین تعداد کلنی کلی فرم در گروه شاهد روز ۴۵ مشاهده شد (شکل ۵).

جدول ۵. جدول تغییرات تعداد باکتری‌های کلی فرم در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
روز				
۱	۲۰/۱±۳/۳ aB	۱۱/۰±۱/۱۲ aA	۱۱/۰±۵/۲ bA	۱۰/۰±۴/۲ bA
۱۵	۲۵/۱±۶/۰ aC	۱۱/۰±۲/۱ bA	۱۰/۰±۲/۸ bA	۴/۰±۲/۵ cB
۳۰	۳۳/۰±۱/۹ aD	۸/۰±۱/۱ bB	.	.
۴۵	۳۶/۱±۲/۱ aE	۸/۰±۳/۳ bB	.	.

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۵. نمودار تغییرات تعداد باکتری‌های کلی فرم در طول زمان

(*cyminum*)، نفوذپذیری این باکتری‌ها را تغییر داده و منجر به آزاد شدن ترکیبات درون سلولی و مرگ سلولی گردیده است (19).

آزمون‌های شیمیایی

نتایج میزان PV

بررسی PV در همبرگرهای تیمار شده با درصدهای مختلف پودر دارچین در روزهای تیمار تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۳-۶). بیشترین PV مشاهده شده در گروه شاهد در روز چهل و پنج ($15/97 \pm 0/14$) و کمترین میزان PV مشاهده شده در گروه همبرگرهای تیمار شده با ۱٪ پودر

نظیر مشاهدات مطالعه حاضر، در مطالعه سهراب پور و همکاران (۲۰۲۰) عصاره دارچین اضافه شده به گوشت همبرگر پس از ۳۰ روز سبب کاهش معنی دار تعداد باکتری /*استافیلوکوکوس اورئوس* شد. در حالیکه در روزهای ۱ تا ۵ این کاهش تعداد کلنی معنی دار نبود (16). در مطالعه Al-Zubaidi و همکاران (۲۰۲۱) اضافه کردن نانو پودر دارچین و زردچوبه به گوشت گاو مورد استفاده در تهیه همبرگر سبب کاهش رشد باکتری /*استافیلوکوکوس اورئوس* در گروه های تیمار نسبت به گروه کنترل (۱۷).

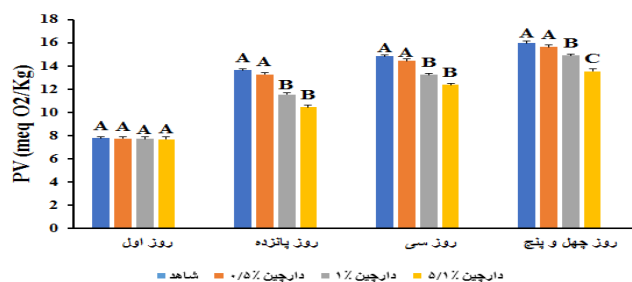
در مطالعه Stojanović و همکاران (۲۰۱۸) استفاده از پودر گیاه رزماری در همبرگر مرغ باعث کاهش کلی فرم، باکتری های هوازی، باکتری های اسید لاکتیک و باکتری های بی هوازی در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ روز در مقایسه با گروه همبرگر کنترل شد (18). در مطالعه دیگری بهبهانی و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که استفاده از اسانس زیره سبز در فراورده های گوشتی نظیر سوسیس و همبرگر سبب کاهش باکتری‌های کلی فرم نظیر /*شرشیاکلی* و /*لیستریا ایننوکوا* می‌شود. آنها بیان کردند که تغییر در ساختار و یکپارچگی غشای سلولی /*شرشیاکلی* و /*لیستریا ایننوکوا* به دلیل فعالیت ضد میکروبی اسانس زیره سبز (*Cuminum*)

دارچین در روز اول ($7/70 \pm 0/14$) مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۶).

جدول ۶. تغییرات میزان PV در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین % ۰/۵	دارچین % ۱	دارچین % ۱/۵
روز				
۱	aA $7/0 \pm 78/01$	aA $7/0 \pm 73/03$	aA $7/0 \pm 70/14$	aA $7/0 \pm 68/18$
۱۵	aB $13/0 \pm 63/20$	aB $13/0 \pm 28/07$	bA $11/0 \pm 55/21$	bA $10/0 \pm 45/3$
۳۰	aC $14/0 \pm 85/28$	aC $14/0 \pm 42/22$	bB $13/0 \pm 24/6$	bB $12/0 \pm 38/51$
۴۵	aD $15/0 \pm 97/14$	aD $15/0 \pm 63/2$	bC $14/0 \pm 9/2$	cB $13/0 \pm 54/10$

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۶. نمودار تغییرات میزان PV در طول زمان

نتایج میزان TBA

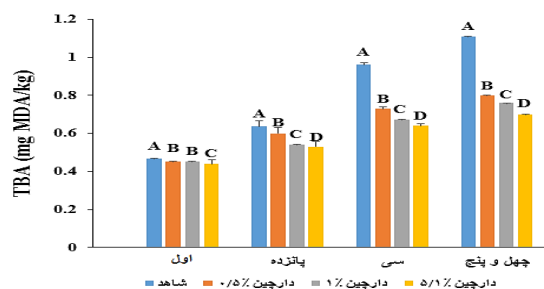
بررسی میزان TBA در همبرگرهای تیمار شده با دارچین نشان داد که تفاوت معنی داری بین روزهای مختلف تیمار و دوزهای مختلف دارچین از نظر میزان TBA وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۷-۳). تیمار دوزهای ۰/۵ تا ۱/۵ دارچین سبب کاهش معنی دار میزان TBA در همبرگر شد که کاملاً

وابسته به دوز استفاده شده دارچین بود ($P < 0.05$) (شکل ۹). بیشترین میزان TBA در تیمار شاهد در روز ۴۵ ($11/0 \pm 11/012$) و کمترین میزان TBA در تیمار ۱/۵ دارچین در روز ۱ ($0/440 \pm 0/002$) مشاهده شد (شکل ۷)

جدول ۷. تغییرات میانگین TBA در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین % ۰/۵	دارچین % ۱	دارچین % ۱/۵
روز				
۱	aB $0/0 \pm 467/003$	bB $0/0 \pm 451/01$	bB $0/0 \pm 451/01$	cB $0/0 \pm 440/002$
۱۵	aC $0/0 \pm 638/001$	bC $0/0 \pm 600/02$	cC $0/0 \pm 540/01$	dC $0/0 \pm 530/01$
۳۰	aD $0/0 \pm 961/006$	bD $0/0 \pm 730/01$	cD $0/0 \pm 671/02$	dD $0/0 \pm 640/01$
۴۵	aE $1/0 \pm 11/012$	bE $0/0 \pm 80/01$	cE $0/0 \pm 760/04$	dE $0/0 \pm 701/03$

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۷. نمودار تغییرات میانگین TBA در طول زمان

سبب کاهش TBA شد که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد (22). مختاریان و همکاران (۲۰۲۱) نیز در مطالعه تاثیر درصدهای مختلف عصاره گیاه بره موم در همبرگر ماهی مشاهده کردند که استفاده از عصاره گیاهی سبب کاهش شاخص های اکسیداسیون چربی PV و TBA در همبرگرها شد (23).

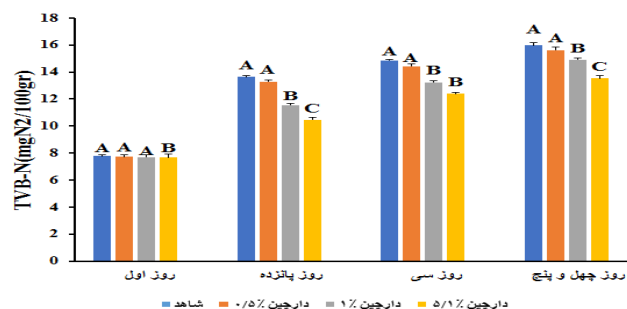
نتایج میزان TVN-B

نتایج حاصل از بررسی میزان TVN-B نشان داد که تیمار دوزهای متفاوت دارچین از روز ۱ تا ۴۵ سبب تغییر معنی دار میزان TVN-B در همبرگرها شد ($P < 0.05$) (جدول ۸). تیمار درصدهای ۰/۵ تا ۱/۵٪ از دارچین در همبرگرها سبب افزایش معنی داری در میزان TVN-B در همبرگر گردید ($P < 0.05$) (شکل ۸). بیشترین میزان TVN-B در تیمار شاهد روز ۴۵ ($15/97 \pm 0/14$) و کمترین میزان در تیمار ۱/۵٪ دارچین روز ۱ ($18/68 \pm 0/7$) مشاهده شد.

پایداری مواد غذایی و گسترش ماندگاری همبرگر در کیفیت این فراورده غذایی بسیار اهمیت دارد. از جمله مهم ترین عوامل کنترل کننده کیفیت مواد غذایی حاوی روغن بالا نظیر همبرگر، کنترل فرآیند اکسیداسیون چربی است تا پایداری اکسیداتیو و ماندگاری قابل قبولی طی دوره زمانی مشخص داشته باشند (20). با توجه به نتایج به دست آمده، کاهش میزان شاخص پراکسید PV و شاخص اسید تیوباربتوریک (TBA) در همبرگرها پس از اضافه کردن پودر دارچین بیانگر پایداری بهتر این محصول است. نظیر نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر، در مطالعه Ozogul و Uçar (۲۰۱۳) تاثیر غلظت های ۰/۳ و ۰/۶ پودر گیاهان آویشن، چای سبز، مریم گلی و برگ بود بر تغییرات اکسیداسیون همبرگر ماهی سبب کاهش معنی دار اکسیداسیون چربی ها شد. آنها وجود ترکیبات فنولی بالا را در این گیاهان یکی از علت های کاهش اکسیداسیون چربی ها عنوان کردند (21). در مطالعه Jooyandeh و Yademellat (۲۰۱۸) نیز تاثیر ضد میکروبی عصاره پوست انار بر همبرگر گوشت گاو نشان داد که ترکیبات فنولی موجود در پوست انداز

جدول ۸. تغییرات میانگین TVN-B در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
۱ روز	aA ۷/۸۷±۰/۰۱	aA ۷/۷۳±۰/۰۳	aA ۷/۷۰±۰/۰۱۴	bB ۷/۶۸±۰/۰۱۸
۱۵ روز	aC ۱۳/۶۳±۰/۰۲۰	aC ۱۳/۲۸±۰/۰۰۷	bB ۱۱/۵۵±۰/۰۲۱	cB ۱۰/۴۵±۰/۰۰۳
۳۰ روز	aD ۱۴/۸۵±۰/۰۲۸	aA ۱۴/۴۲±۰/۰۲۲	bC ۱۳/۲۴±۰/۰۰۶	bB ۱۳/۳۸±۰/۰۰۵۱
۴۵ روز	aE ۱۵/۹۷±۰/۰۱۴	aE ۱۵/۶۳±۰/۰۰۲	bD ۱۴/۹۰±۰/۰۰۲	bC ۱۳/۵۴±۰/۰۰۱۰
*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است. *حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است				



شکل ۸. نمودار تغییرات میانگین TVN-B در طول زمان

ارزیابی شاخص نیتروژن فرار کل (TVN-B) نشان داد که پودر دارچین می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی سبب افزایش این شاخص شود. در مطالعه مختاریان و همکاران (۲۰۲۱) نیز درصدهای مختلف عصاره گیاه بره موم در همبرگر ماهی سبب افزایش میانگین شاخص TVN-B در همبرگرها شد (23).

نتایج میزان فنول کل

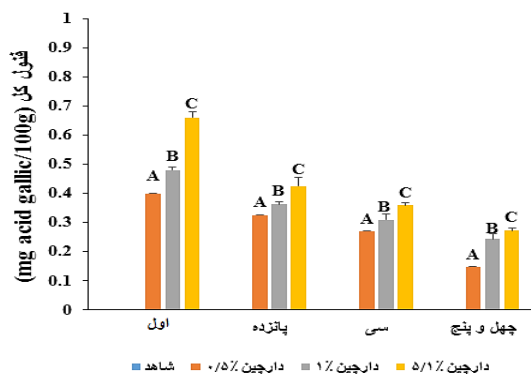
بررسی نتایج ترکیبات فنولی کل نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان این ترکیبات در همبرگرها پس از تیمار با درصد

های مختلف پودر دارچین وجود داشت ($P < 0.05$) (جدول ۳-۹). میزان ترکیبات فنولی در گروه شاهد در همه روزهای تیمار صفر بود و با افزایش درصد پودر دارچین، میزان ترکیبات فنولی به طور معنی داری در گروه های مختلف تیمار همبرگر افزایش نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۹). بیشترین میزان ترکیبات فنولی در همبرگرها روز اول تیمار ۱/۵٪ پودر دارچین (۰/۱۱±۰/۶۶) مشاهده شد (شکل ۹)

جدول ۹. تغییرات میزان فنول کل در طول زمان

تیمار	شاهد	دارچین ۰/۵٪	دارچین ۱٪	دارچین ۱/۵٪
روز ۱	۰	aB ۰/۰±۴۰/۰۲	bB ۰/۰±۴۸۱/۰۲	cB ۰/۰±۶۶۱/۰۱
۱۵	۰	aC ۰/۰±۳۲۵/۰۱	bC ۰/۰±۳۶۳/۰۳	cC ۰/۰±۴۲۵/۰۲
۳۰	۰	۰/۰±۲۷۱/۰۳aD	bD ۰/۰±۳۱۰/۰۲	cD ۰/۰±۳۶۰/۰۲
۴۵	۰	aE ۰/۰±۱۴۸/۰۱	bE ۰/۰±۲۴۳/۰۱	cE ۰/۰±۲۷۳/۰۲

*حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد بین تیمارها است.
*حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد در طول زمان است



شکل ۹. شکل تغییرات میزان فنول کل در طول زمان

نتیجه گیری

ترکیبات زیست فعال فنولی گروهی از ترکیبات شیمیایی هستند که خواص دارویی و تغذیه ای فراوانی دارند و در ارتقا زمان نگهداری و ویژگی های غذایی نقش زیادی دارند. این ترکیبات قادرند تا با روبش رادیکال های آزاد شاخص های اکسیداسیون را کاهش داده و به نگهداری با کیفیت تر مواد غذایی کمک کنند (۲۴). در مطالعه سهراب پور و همکاران (۲۰۲۰) نیز اضافه کردن عصاره دارچین به همبرگر گوشت گاو سبب افزایش معنی دار ترکیبات فنولی در همبرگر شد (۲۵). در مطالعه Rounds و همکاران (۲۰۱۳) اضافه کردن پودر پیاز به همبرگر گوشت گاو سبب افزایش معنی دار ترکیبات فنولی موجود در همبرگر و کاهش معنی دار شاخص های اکسیداسیون چربی شد (۲۶). در مطالعه حاضر از درصدهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ پودر دارچین برای نگهداری ۴۵ روزه همبرگر استفاده شد. نتایج نشان داد که پودر دارچین به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی و ضد قارچی بالا می تواند مانع از رشد باکتری های پاتوژن نظیر باکتری های سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس و کلی فرم ها در همبرگر شود. همچنین مانع از رشد مخمری و کپکی نیز می گردد. مقدار تیمار ۱/۵٪ بیشترین تاثیر ضد میکروبی و ضد قارچی را نشان داد.

نتایج تجزیه و تحلیل شیمیایی همبرگرهای تیمار شده با پودر دارچین نشان داد که میزان شاخص های اکسیداسیون چربی (PV و TBA و TVN-B) به صورت معنی داری کاهش یافت. در حالیکه میزان ترکیبات فنولی افزایش معنی داری داشت. این مشاهدات تایید می کند که اضافه کردن پودر دارچین به همبرگر سبب جذب رادیکال های آزاد، کاهش اکسیداسیون چربی و افزایش خواص آنتی اکسیدانی با اضافه شدن ترکیبات فنولی مفید، شده است. به طور کلی می توان نتیجه گرفت استفاده از پودر دارچین به عنوان یک نگهدارنده طبیعی به همبرگر می تواند علاوه بر ماندگاری بهتر به افزایش ارزش غذایی همبرگر کمک کند.

پیشنهادهات

بررسی پودر سایر عصاره های گیاهی نظیر پودر آویشن و زردچوبه به همبرگر و بررسی خواص میکروبی آنتی اکسیدانی همبرگر.

بررسی تاثیر استفاده از پودر دارچین در همبرگر بر خواص حسی و کیفی همبرگر.
مقایسه تاثیر آنتی میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره، پودر و اسانس دارچین در همبرگر.

منابع

1. T.L.C. de Oliveira, S.M. de Carvalho, R. de Araújo Soares, M.A. Andrade, M. das Graças Cardoso, E.M. Ramos, R.H. Piccoli, Antioxidant effects of Satureja montana L. essential oil on TBARS and color of mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite, LWT-Food Science and Technology 45(2) (2012) 204-212.
2. M. Koşar, F. Göger, K.H. Can Başer, In vitro antioxidant properties and phenolic composition of Salvia virgata Jacq. from Turkey, Journal of agricultural and food chemistry 56(7) (2008) 2369-2374.
3. K.V. Peter, Handbook of herbs and spices: volume 3, Woodhead publishing 2006.
4. S. Mohammadifar, The origin, history and trade route of Cinnamon, Journal for the History of Science 8(1) (2010) 37-51.
5. R. Hamidpour, M. Hamidpour, S. Hamidpour, M. Shahlari, Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaricidal, and repellent activities, Journal of

- traditional and complementary medicine 5(2) (2015) 66-70.
6. J. Yuste, D. Fung, Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A 49594 in apple juice supplemented with cinnamon, *Journal of Food Protection* 65(10) (2002) 1663-1666.
7. C.C. Tassou, G. Nychas, Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in Model Food System, *International biodeterioration & biodegradation* 36(3-4) (1995) 411-420.
8. G. Zohrian, M. Khajeamiri, F. Shahraz, *Laboratory Methods of Food Microbiology*, Tehran: Marze Danesh Publication.(2011)
9. M. Torbati, A. Javadi, H. Sadari Oskui, F. Tavakoli, Study of Microwave and frying process on hamburger microbial properties, *Food Hygiene* 1(3) (2011) 47-53.
10. H. Egan, H.E. Cox, D. Pearson, *Pearson's chemical analysis of foods*, Churchill livingstone 1981.
11. A. Natseba, I. Lwalinda, E. Kakura, C. Muyanja, J. Muyonga, Effect of pre-freezing icing duration on quality changes in frozen Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Research International* 38(4) (2005) 469-474.
12. Y.-J. Jeon, J.Y. Kamil, F. Shahidi, Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod, *Journal of agricultural and food chemistry* 50(18) (2002) 5167-5178.
13. M. Sengul, H. Yildiz, N. Gungor, B. Cetin, Z. Eser, S. Ercisli, Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 22(1)(2009)
14. C. Agrimonti, J.C. White, S. Tonetti, N. Marmioli, Antimicrobial activity of cellulosic pads amended with emulsions of essential oils of oregano, thyme and cinnamon against microorganisms in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology* 305 (2019) 108246.
15. C.H. Chen, J. Marchello, M. Friedman, S. Ravishankar, Plant Extracts and Essential Oils at Concentrations Acceptable to a Sensory Panel Inactivate *Salmonella Typhimurium* DT104 in Ground Pork, *Food and Nutrition Sciences* 12(02) (2021) 162.
16. S. Sohrabpour, R. Esmaeilzadeh Kenari, Z. Raftani Amiri, Effect of cinnamon ultrasound-assisted extract on chemical and microbial properties of hamburger meat under different temperatures and time conditions during storage, *Journal of Food Processing and Preservation* 44(11) (2020) e14881.
17. L. ahmed Al-Zubaidi, A.M. Al-Rubeei, A.S. Al-Salmany, Effect of Cinnamon and Turmeric Nanoparticles Extract on microorganisms of Fresh Ground Beef During Cold Storage, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, 2021, p. 012058.
18. Z. Stojanović-Radić, M. Pejčić, N. Joković, M. Jokanović, M. Ivić, B. Šojić, S. Škaljac, P. Stojanović, T. Mihajilov-Krstev, Inhibition of *Salmonella Enteritidis* growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination, *Food Control* 90 (2018) 332-343.
19. B.A. Behbahani, M. Noshad, F. Falah, Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy, *Microbial pathogenesis* 136 (2019) 103716.
20. M. Hu, C. Jacobsen, Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats, Elsevier 2016.

21. Y. Ozogul, Y. Uçar, The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers, Food and Bioprocess Technology 6(6) (2013) 1550-1560.
22. A. El-Lahamy, K. Khalil, S. El-Sherif, A. Mahmud, Changes in quality attributes of sand smelt (*Atherina hepsetus*) fish burger and finger during frozen storage, J Fish Res 2(2) (2018) 6-11.
23. M. Mokhtarian, M. Shabani, R. Kazempoor, Extending Oxidative Stability of Fish Burgers Using Propolis Ethanolic Extract during Storage, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 16(1) (2021) 109-122.
24. I.A.M. Ahmed, E.E. Babiker, F.Y. Al-Juhaimi, A.E.-D.A. Bekhit, Clove Polyphenolic Compounds Improve the Microbiological Status, Lipid Stability, and Sensory Attributes of Beef Burgers during Cold Storage, Antioxidants 11(7) (2022) 1354.
25. S. Sohrabpour, R. Esmaeilzadeh Kenari, Z. Raftani Amiri, Effect of cinnamon ultrasound-assisted extract on chemical and microbial properties of hamburger meat under different temperatures and time conditions during storage, Journal of Food Processing and Preservation 44(11) (2020) e14881.
26. L. Rounds, C.M. Havens, Y. Feinstein, M. Friedman, S. Ravishankar, Concentration-dependent inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and heterocyclic amines in heated ground beef patties by apple and olive extracts, onion powder and clove bud oil, Meat science 94(4) (2013) 461-467.

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی گیاه مامیران کبیر^۲

بر روی لاین سلول های سرطانی کلورکتال

سایه جعفری مرندی^{۱*}، شبیم آروین^۲

۱. دانشیار سلولی تکوینی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال

۲. دانشجوی دکترای زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: گیاه مامیران کبیراز خانواده خشخاش (*Papaveracea*) است و از زمان باستان به علت کاربردهای دارویی بر اثر حضور تعداد زیادی اجزای فعال زیستی از جمله آلکالوئیدها در پزشکی استفاده شده است. شیرابه ی خشک شده این گیاه به عنوان داروی گیاهی تجارت می شود و محصولات آن در داروخانه ها برای استفاده های داخلی و خارجی استفاده می شود. این پژوهش به بررسی آنتی اکسیدان های موجود در گیاه و اثرات ضدسرطانی آن بر روی لاین سلولی سرطان کلورکتال پرداخته است.

مواد و روش ها: غلظت های مختلفی از عصاره متانولی برگ و ساقه و عصاره متانولی ریشه گیاه مامیران کبیر تهیه شد و با استفاده از محلول DPPH فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها سنجش گردید. همچنین از کشت سلولی استفاده شد و از روش MTT برای محاسبه درصد زنده مانی سلول های سرطانی و سمیت سلولی گیاه بهره گرفته شد.

یافته ها: در هر ۳ تکرار از سنجش اثرات ضدسرطانی گیاه مامیران کبیر با افزایش مقدار عصاره درصد زنده مانی سلول ها کمتر و درصد سمیت آن بیشتر بود. همچنین در سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مامیران کبیر هر چه غلظت عصاره های موجود در لوله ها بیشتر شد. به علت فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه جذب کمتری از آن مشاهده شد و در نتیجه آن لوله فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را دارا بود.

نتیجه گیری: عصاره اندام هوایی و زمینی گیاه مامیران کبیر باعث کاهش رشد و تکثیر سلول های سرطانی کلورکتال شد و هر چه غلظت این عصاره بیشتر این کاهش در رشد سلول های سرطانی چشمگیرتر و سمیت سلولی عصاره بیشتر بود.

کلمات کلیدی: مامیران کبیر، سرطان کلورکتال، فعالیت آنتی اکسیدانی، سلول های سرطانی، خاصیت ضد سرطانی

^۲ *chelidonium majus*

The investigation of the antioxidant and anticancer properties of the plant *Chelidonium majus* on colorectal cancer cell lines

Sayeh Jafari marandi^{1*}, Shabnam Arvin²

1. Associate Professor of Plant developmental cell, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

2. Ph.D student in Cellular Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Introduction: *Chelidonium majus*, the greater celandine, belongs to the poppy family (Papaveraceae) and has had medical applications since ancient times due to many bioactive components, including alkaloids. The dried sap of this plant is traded as herbal medicine, and its products are found in pharmacies for internal and external use. This study investigated the antioxidants of this plant and its anticancer effects on colorectal cancer cell lines.

Methods: Different concentrations of methanolic extract from plants' leaves, stems, and roots were prepared, and the antioxidant activity of the extracts was measured using DPPH solution. Cell culture was also used, and the MTT method was used to calculate the percentage of cancer cell viability and plant cytotoxicity.

Results: In every three repetitions of measuring the anticancer effects of the plant, the higher the amount of extract, the lower the percentage of cell viability, and the higher the percentage of toxicity. Also, in measuring the antioxidant activity of the greater celandine, the higher the concentration of extracts in the tubes, the less the plant showed absorption, and, as a result, the antioxidant activity of the tube increased.

Conclusion: The extract of the aerial and terrestrial parts of the greater celandine reduced the growth and proliferation of colorectal cancer cells, and the higher the concentration of this extract, the more significant the reduction in cancer cell growth and the greater the cytotoxicity of the extract.

Keywords: *Chelidonium majus*, Colorectal cancer, Antioxidant activity, Cancer cells, Anticancer propertie

مقدمه

سرطان دستگاه گوارش چهارمین سرطان شایع در ایران و سومین سرطان شایع در دنیا است. در کشورمان ایران سالانه ۳۸۰۰ تا ۴۰۰۰ مورد جدید از سرطان کلورکتال تشخیص داده می شود که بیانگر روند روبه رشد این بیماری در ایران است (۱). مشکلات فعلی در استفاده از شیمی درمانی و پرتودرمانی و عوارض جانبی متعدد که در اثر استفاده از آن ها برای بیمار ایجاد می شود و همچنین مقاومت سلول های سرطانی به درمان های رایج باعث شده است که محققین رو به سمت داروهای جدید با اثر بیشتر و سمیت کمتر بیاورند (۲). یک مسئله ی مهم دیگر اینکه در بعضی بیماری ها داروهای گیاهی دارای اثرات بهتری هستند و همچنین برای برخی از بیماری ها در حال حاضر فقط داروهای گیاهی وجود دارند (۳)، گیاه *Chelidonium majus* از خانواده ی خشخاش (*Papaveraceae*) است (۴). و در بسیاری از مناطق جهان از جمله شمال آمریکا، اروپا و آسیا رشد می کند (۵)، مامیران کبیر یک گیاه چندساله قائم است. زمانی که گیاه آسیب می بیند یک شیرابه زرد یا نارنجی از آن خارج می شود (۶) شیرابه ی تازه گیاهان برای درمان زگیل، میخچه، عفونت های قارچی، اگزما و تومورهای پوست کارایی دارند (۷). از این گیاه به طور گسترده درمان زخم، سرطان، عفونت دهان، مشکلات کبدی، برونشیت مزمن و آسم استفاده می شود. همچنین این گیاه یک توانایی

ذاتی در بیوسنتز یک محدوده ی وسیعی از آنتی اکسیدان ها را دارد که آسیب های ناشی از فعالیت اکسیداتیو ROS را کاهش می دهد. آنتی اکسیدان ها ROS را جمع آوری می کنند و یک تعادل بین رادیکال های طبیعی تولید شده و وضعیت آنتی اکسیدان ها برقرار می کنند. آنتی اکسیدان های طبیعی آپاپتوز را در سلول های سرطانی برمی انگیزانند و موجب از بین رفتن سلول های سرطانی می شوند. تحقیقات محققانی از جمله Pantano و همکاران (۸) و خداینده و همکاران (۶)، به بررسی اثرات آنتی اکسیدانی این گیاه و همچنین ایجاد سمیت ها می پردازد و Krizhanovska و همکاران (۷) و Granica و همکاران (۹) به بررسی فعالیت سیتوتوکسیک و اثرات آلوئید های موجود در گیاه مامیران کبیر بر روی سلول های سرطانی پرداخته اند.

مواد و روش ها

در روز ۱۴ تیرماه سال ۱۴۰۱ از جنگل النگدره گرگان مقدار زیادی گیاه مامیران کبیر تهیه شد و سپس این گیاهان تازه به مدت ۲ هفته در سایه و در هوای آزاد خشک شده و در نهایت بخش هوایی و زیرزمینی به طور جداگانه آسیاب شد. سپس فرایند عصاره گیری انجام شد. ۱۰۰ میلی لیتر متانول را در ارلن ریخته و سپس با HCL ۱نرمال و توسط سمپلر قطره قطره متانول را اسیدی کرده و با کاغذ تورنسل pH آن سنجیده شد تا به ۲/۵ pH رسید. ۱ گرم از پودر ریشه و برگ گیاه مامیران کبیر به صورت جداگانه در دو ارلن جداریخته شد و ۳۰ می لیتر از متانول اسیدی به هر ارلن اضافه شد. سپس دو ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول ها در فالكون های ۵۰ میلی لیتر ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. روشنای را که کاملاً شفاف است از فالكون جدا کرده و در یک ظرف تمیز آب مقطر زده خشک شده ریخته شد. مجدداً به ته مانده های پودر گیاه ۳۰ میلی لیتر متانول اسیدی اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن سانتریفیوژ

نویسنده مسئول: دانشیار سلولی تکوینی

گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد واحد

تهران شمال

آدرس الکترونیک :

jafarisayeh@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

در تاریکی و دردمای اتاق گذاشته شد. بعد از پایان زمان مشخص شده هر کدام از نمونه ها به صورت جداگانه در کووت شیشه ای ریخته شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نوری هر کدام از لوله ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد. از متانول خالص نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Philter Scientific) جذب نوری گیاه بررسی شد. رده ی سلولی نیز با کد BRCC101 از مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران تهیه شد. سلول مورد استفاده شامل سلول های سرطانی کلورکتال رده ی سلولی HT29 بود. این رده در محیط کشت (DMEM (Dulbeccos Modified Eagle) HIGH GLUCOSE (Medium ۱۰٪ (FBS) و در حضور پنی سیلین - استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO₂ داخل انکوباتور قرار داده شد. پس از تیمار با عصاره هم ریشه و هم برگ و ساقه گیاه و برای هر کدام از عصاره ها در سه تکرار در زمان های مختلف (۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت) با تست MTT زنده ماننی سلول های سرطانی بررسی شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ریشه و عصاره برگ و ساقه گیاه مامیران کبیردر غلظت های مختلف و با تست DPPH در سه تکرار در جدول ۱ و ۲ به شرح زیر است: DPPH به تنهایی در دستگاه اسپکتروفتومتر به عنوان نمونه ی شاهد بیشترین جذب را نشان داد، چون در ترکیب با هیچ غلظتی از عصاره گیاه قرار نداشت. هر چه غلظت عصاره در لوله های حاوی نمونه به تدریج بیشتر شد به علت فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه، جذب کمتر و DPPH در ترکیب با عصاره ی گیاه زرد رنگ شد و به حالت احیا در آمد. در نهایت با توجه به اینکه نمونه ی شاهد ما (DPPH)، در حالت پلیدار بنفش رنگ بود پس هر چه نمونه ی ما از بنفش پررنگ به سمت زرد پررنگ رفت جذب نوری آن کمتر شد و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی آن بیشتر بود. لوله هایی باطیف بنفش رنگ نشان دهنده ی این

کرده و روشناور به ظرف تمیز انتقال داده شد و این کار تا ۳ مرتبه انجام گرفت ۹۰ میلی لیتر عصاره ی شفاف از هر دو اندام زیرزمینی و هوایی گیاه جمع آوری شد و در دستگاه evaporator (مدل DLAB) قرار گرفت و کاملاً تبخیر شد. ته مانده به صورت یک لایه ی کدر و چرب در ته ظرف باقی ماند که این همان عصاره ی گیاه بود. همچنین بر روی ۹۰ میلی لیتر از هر کدام از عصاره های متانولی به دست آمده از اندام هوایی و زیرزمینی گیاه مامیران کبیر ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی اضافه شد. در یک ارلن نیز به صورت جداگانه ۱۰۰ میلی لیتر متانول ساده اضافه شد و ۰/۰۴ گرم پودر DPPH به آن اضافه شد و در یخچال و در تاریکی قرار داده شد. سپس دوسری ۴ تایی لوله ی آزمایش برای هر کدام از عصاره های متانولی اندام هوایی و زیرزمینی عصاره گیاه با آب مقطر شستشو داده شد و بعد از اینکه کاملاً خشک شد شماره گذاری شد. در اولین لوله ی سری اول ۱ میلی لیتر محلول DPPH از قبل آماده شده ریخته شد و ۳ میلی لیتر متانول خالص نیز به آن اضافه شد. در سه لوله دیگر سری اول آزمایش به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر ۳۰۰، میکرولیتر و ۷۰۰ میکرولیتر از عصاره ی متانولی ریشه گیاه با سمپلر اضافه شد. در لوله ی اول با عصاره ۱۰۰ میکرولیتر، ۲/۹ میلی لیتر متانول خالص، در لوله ی دوم با عصاره ۳۰۰ میکرولیتر، ۲/۷ میلی لیتر متانول خالص و در لوله سوم با عصاره ۷۰۰ میکرولیتر، ۲/۳ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد و به هر کدام از سه لوله آزمایش ۱ میلی لیتر، DPPH نیز اضافه شد و سپس لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. در سری دوم لوله های آزمایش نیز مانند سری اول عمل شد. در لوله ی اول ۳ میلی لیتر محلول DPPH ۱ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد. در سه لوله ی دیگر به ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰ میکرولیتر و ۱۰۰۰ میکرولیتر از عصاره ی متانولی اندام هوایی گیاه اضافه شد. در لوله اول با عصاره ۲۵۰ میکرولیتر، ۲/۷۵ میلی لیتر متانول خالص، در لوله دوم با عصاره ۵۰۰ میکرولیتر، ۲/۵ میلی لیتر متانول خالص و در لوله سوم با عصاره ۱۰۰۰ میکرولیتر، ۲ میلی لیتر متانول خالص اضافه شد و در نهایت به هر کدام از سه لوله آزمایش ۱ میلی لیتر، محلول DPPH اضافه شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه لوله ها

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism و انجام تست آنالیز واریانس ANOVA و آزمون تعقیبی نشان داد که بین میزان مهار رادیکال‌های آزاد در گروه‌های تیمار شده با مقادیر متفاوت عصاره ریشه و برگ اختلاف معنی داری وجود دارد ($pvalue < 0.05$). در واقع هر چه مقدار عصاره ریشه بیشتر بود درصد مهار رادیکال‌های آزاد و همچنین اثر ضد سرطانی و فعالیت آنتی اکسیدانی نیز بیشتر بود. درباره عصاره برگ گیاه نیز این نتیجه گیری صدق می‌کند.

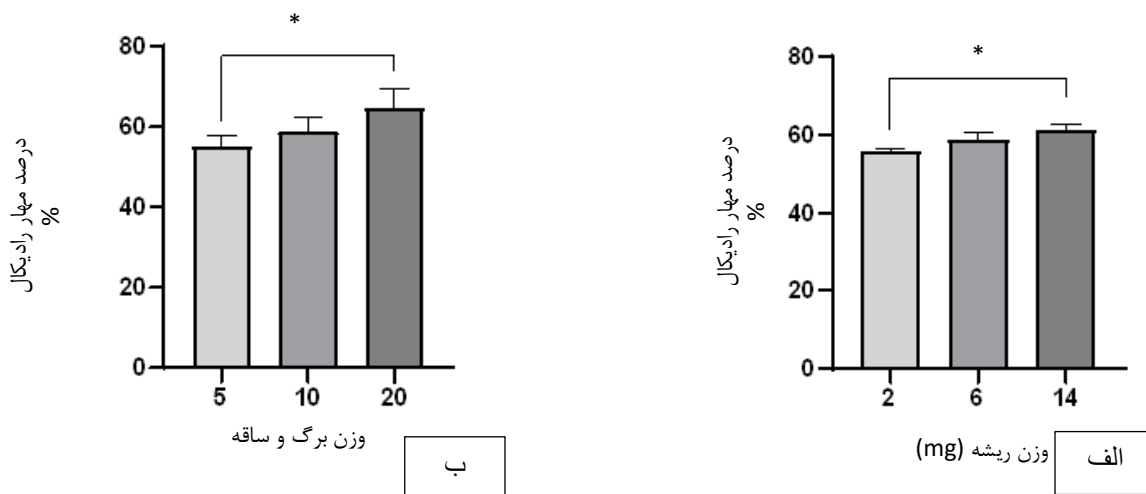
بودند که به علت کمتر بودن غلظت عصاره‌ی گیاه در آن‌ها درگیری DPPH با عصاره کمتر و در نتیجه DPPH حالت پایدار خود را حفظ کرده و احیا شدگی کمتر و جذب بیشتری از خود نشان داد. برعکس آن لوله‌هایی با طیف زرد رنگ به علت بالاتر بودن غلظت عصاره های گیاه و فعالیت آنتی اکسیدانی آن و درگیری بیشتر DPPH با عصاره به حالت احیا در آمد و زرد رنگ شد و در نتیجه جذب کمتری را نشان داد. همچنین با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ با افزایش وزن ریشه و وزن برگ و ساقه در هر عصاره به صورت جداگانه فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر شد.

جدول ۱. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ریشه گیاه مامیران کبیر

جذب در تکرار سوم	جذب در تکرار دوم	جذب در تکرار اول	وزن ریشه در عصاره	حجم های استفاده شده عصاره در ۳ تکرار
۰/۱۱۹	۰/۱۲۷	۰/۱۳۰	۲ میلی گرم	۰/۱ میلی لیتر
۰/۱۰۱	۰/۱۲۲	۰/۱۲۶	۶ میلی گرم	۰/۳ میلی لیتر
۰/۰۹۵	۰/۱۱۴	۰/۱۲۰	۱۴ میلی گرم	۰/۷ میلی لیتر
۰/۲۵۹	۰/۲۸۸	۰/۳۰۰	-	۱ میلی لیتر DPPH (شاهد)

جدول ۲. سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره برگ و ساقه گیاه مامیران کبیر

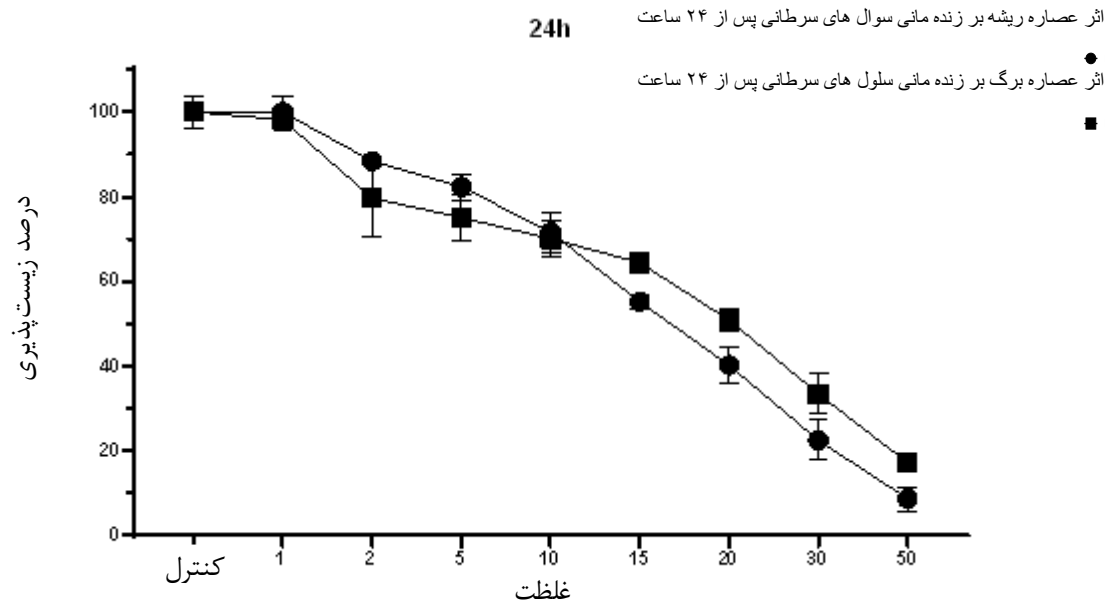
جذب در تکرار سوم	جذب در تکرار دوم	جذب در تکرار اول	وزن برگ و ساقه در عصاره	حجم های استفاده شده عصاره در ۳ تکرار
۰/۱۲۴	۰/۱۲۸	۰/۱۲۵	۵ میلی گرم	۰/۲۵ میلی لیتر
۰/۱۱۶	۰/۱۱۸	۰/۱۱۴	۱۰ میلی گرم	۰/۵ میلی لیتر
۰/۰۹۹	۰/۱۰۹	۰/۰۹۱	۲۰ میلی گرم	۱ میلی لیتر
۰/۲۵۹	۰/۲۸۸	۰/۳۰۰	-	۱ میلی لیتر DPPH (شاهد)



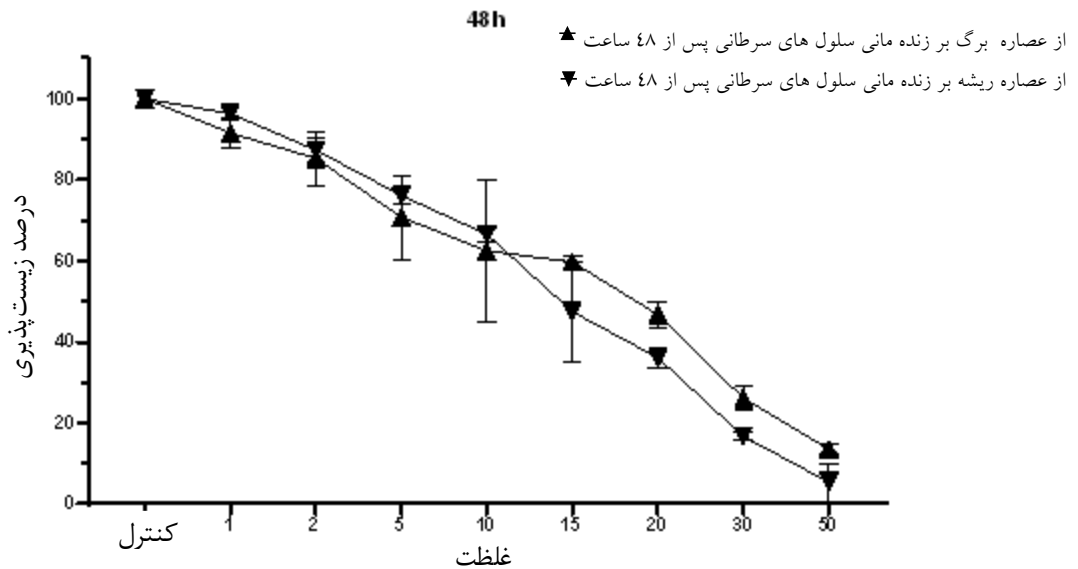
شکل الف. اثر عصاره ی ریشه ی گیاه *Chelidonium majus* بر مهار رادیکال های آزاد / **شکل ب.** اثر عصاره ی برگ گیاه *Chelidonium majus* بر مهار رادیکال های آزاد

تیمار شده با عصاره برگ نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی دار بودند و این غلظت ها منجر به کاهش معنی دار زنده مانی سلول های سرطانی کلورکتال کشت داده شده گردید. ($p\text{ value} < 0.05$) در هر سه زمان تعیین شده از عصاره برگ و ساقه بیشتر بود که این نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی بالادر ریشه گیاه نسبت به برگ و ساقه آن است اما به منظور بررسی اختلاف مشاهده شده بین دو گروه عصاره ریشه و برگ، تجزیه وتحلیل داده از طریق آزمون آنالیز واریانس ANOVA انجام شد. از آنجایی که مقدار Sig بیشتر از ۰/۰۵ محاسبه گردید، بین سمیت گروه های تیمار با عصاره برگ و ریشه گیاه *Chelidonium majus* پس از تیمار، ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت، اختلاف معنی دار وجود نداشت و این به این معنی است که قرارگیری مدت زمان بیشتر در معرض عصاره های هم ریشه و هم برگ و ساقه گیاه نتوانسته اثرات سمیت عصاره بخش هوایی و زمینی گیاه مامیران کبیر را از هم متمایز کند و سمیت هر دو بخش با گذر زمان تفاوت قابل توجهی با هم نداشته اند.

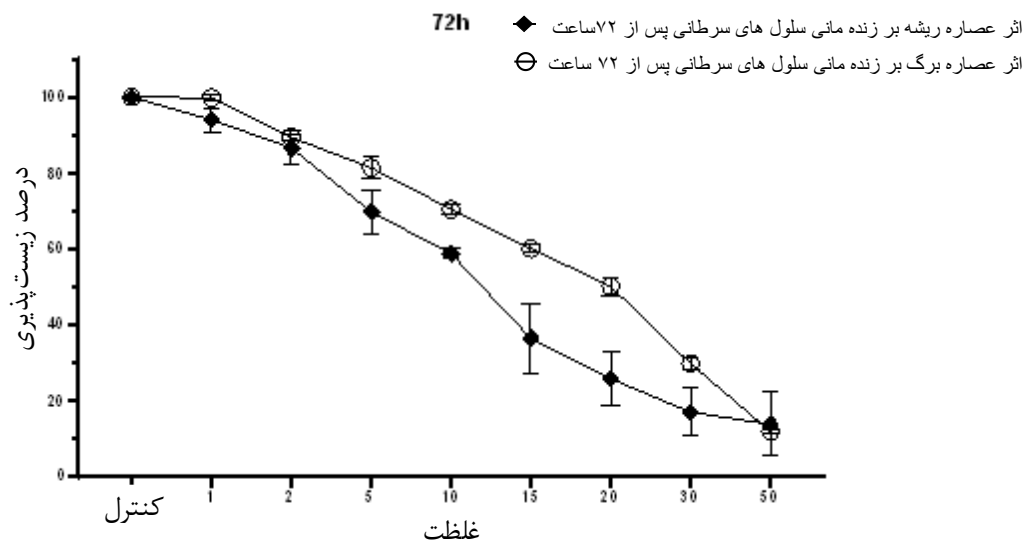
بررسی نتایج اثر عصاره گیاه مامیران کبیر در رشد سلول های سرطانی به این صورت است: با توجه به اینکه لاین سلول های سرطانی HT29 کلورکتال در کشت دوبعدی ۸ دوز ۲،۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم از عصاره گیاه در فواصل زمانی ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت روی آن ها اثر داده شد و این عمل ۳ بار تکرار شد دیده شد که به صورت کلی در هر سه نمودار، عصاره ریشه و عصاره برگ و ساقه گیاه مامیران کبیر بر روی سلول های سرطانی کلورکتال در زمان های تعیین شده ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت اثرکشنده داشت و هر چه غلظت دوز عصاره بیشتر شد درصد زنده مانی سلول های سرطانی کمتر و درصد سمیت عصاره بیشتر است و این نتایج در هر سه تکرار قابل مشاهده بود. درباره عصاره برگ و ساقه گیاه مامیران کبیر نیز همین نتایج حاصل آمد. همچنین این نتایج با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism و تست آنالیز واریانس ANOVA و آزمون تعقیبی آن نیز به دست آمد. باتوجه به نتایج تست پس از آنکوباسیون ۷۲،۴۸،۲۴ ساعت، غلظت ۵ میلی گرم و بیشتر در گروه های تیمار شده با عصاره ریشه و غلظت ۲ میلی گرم و بیشتر در گروه های



شکل ۱. اثر سمیت عصاره برگ و ریشه گیاه *Chelidonium majus* بر سلول های سرطانی کلورکتال کشت داده شده پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت



شکل ۲. اثر سمیت عصاره برگ و ریشه گیاه *Chelidonium majus* بر سلول های سرطانی کلورکتال کشت داده شده پس از انکوباسیون ۴۸ ساعت



شکل ۳. اثر سمیت عصاره برگ و ریشه گیاه *Chelidonium majus* بر سلول های سرطانی کلورکتال کشت داده شده پس از انکوباسیون ۷۲ ساعت

جدول ۳. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره ریشه نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	۹۵٪ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۹۹۹۹<	ns	خیر	۱۲/۶۸ - تا ۱۲/۸۳	۰/۰۷۷۸۸	Control vs. 1
۰/۱۰۲۸	ns	خیر	۲۴/۴۰ - تا ۱/۱۱۲	۱۱/۶۴	Control vs. 2
۰/۹۹۹۹	***	بله	۳۰/۴۳ تا ۴/۹۲۴	۱۷/۶۸	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۴۱/۱۴ تا ۱۵/۶۳	۲۸/۳۹	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۵۷/۵۴ تا ۳۲/۰۳	۴۴/۷۸	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۷۲/۵۳ تا ۴۷/۰۲	۵۹/۷۷	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۹۰/۲۹ تا ۶۴/۷۸	۷۷/۵۳	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۱۰۴/۱ تا ۷۸/۵۶	۹۱/۳۲	Control vs. 50

جدول ۴. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره ریشه نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	۹۵٪ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۴۸۹۱	ns	خیر	۲۱/۱۶ تا ۴/۳۵۵	۸/۴	Control vs. 1
۰/۰۱۱۳	*	بله	۲۷/۵۱ تا ۱/۹۹۵	۱۴/۷۵	Control vs. 2
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۴۲/۰۱ تا ۱۶/۴۹	۲۹/۲۵	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۵۰/۳۱ تا ۲۴/۷۹	۳۷/۵۵	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۵۲/۹۷ تا ۲۷/۴۵	۴۰/۲۱	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۶۶/۰۴ تا ۴۰/۵۲	۵۳/۲۸	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۸۶/۵۹ تا ۶۱/۰۷	۷۳/۸۳	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۹۹/۱۸ تا ۷۳/۶۶	۸۶/۴۲	Control vs. 50

جدول ۵. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره ریشه نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۷۲ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	۹۵.۰۰٪ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۸۵۹۴	ns	خیر	۱۸/۷۵ تا ۶/۷۶۵	۵/۹۹	Control vs. 1
۰/۰۳۱۵	*	بله	۲۶/۱۷ تا ۰/۶۵۴۵	۱۳/۴۱	Control vs. 2
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۴۲/۹۶ تا ۱۷/۴۴	۳۰/۲	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۵۴/۰۴ تا ۲۸/۵۲	۴۱/۲۸	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۷۶/۲۳ تا ۵۰/۸۱	۶۳/۵۷	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۸۶/۹۷ تا ۶۱/۴۵	۷۴/۲۱	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۹۵/۸۲ تا ۷۰/۳۰	۸۳/۰۶	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱<	****	بله	۹۹/۰۱ تا ۷۳/۴۹	۸۶/۲۵	Control vs. 50

جدول ۶. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره برگ نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	۹۵٪ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۹۹۹۹<	ns	خیر	۱۴/۶۳ تا ۱۰/۸۹	۱/۸۷	Control vs. 1
۰/۰۰۰۱>	****	خیر	۳۳/۰۵ تا ۷/۵۳۵	۲۰/۲۹	Control vs. 2
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۳۷/۷۶ تا ۱۲/۲۴	۲۵	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۴۲/۷۱ تا ۱۷/۱۹	۲۹/۹۵	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۴۸/۳۶ تا ۲۲/۸۴	۳۵/۶	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۶۱/۹۱ تا ۳۶/۳۹	۴۹/۱۵	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۷۹/۳۱ تا ۵۳/۷۹	۶۶/۵۵	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۹۵/۵۹ تا ۷۰/۰۷	۸۲/۸۳	Control vs. 50

جدول ۷. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره برگ نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۴۸ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	۹۵/۰۰٪ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۹۹۲۱	ns	خیر	۱۶/۴۲ تا ۹/۰۹۵	۳/۶۶	Control vs. 1
۰/۰۵۱۹	ns	خیر	۲۵/۴۶ تا ۰/۰۵۵۴۵	۱۲/۷	Control vs. 2
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۳۶/۶۲ تا ۱۱/۱۰	۲۳/۸۶	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۴۶/۱۸ تا ۲۰/۶۶	۳۳/۴۲	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۶۵/۲۶ تا ۳۹/۷۴	۵۲/۵	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۷۶/۶۶ تا ۵۱/۱۴	۶۳/۹	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۹۶/۰۱ تا ۷۰/۴۹	۸۳/۲۵	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۱۰۷/۳ تا ۸۱/۸۲	۹۴/۵۸	Control vs. 50

جدول ۸. اثر سمیت غلظت های مختلف عصاره برگ نسبت به کنترل متانول خالص پس از انکوباسیون ۷۲ ساعته

مقدار P تعدیل شده	خلاصه	کمتر از حد آستانه؟	% ۹۵.۰۰ اختلاف فاصله اطمینان (CI)	اختلاف میانگین	آزمون مقایسه های چندگانه Tukey
۰/۹۹۹۹<	ns	خیر	۱۲/۵۶ - تا ۱۲/۹۶	۰/۲	Control vs. 1
۰/۱۹۱۴	ns	خیر	۲۳/۳۱ - تا ۲/۲۰۵	۱۰/۵۵	Control vs. 2
۰/۰۰۰۳	***	بله	۳۱/۴۰ تا ۵/۸۸۵	۱۸/۶۴	Control vs. 5
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۴۲/۳۵ تا ۱۶/۸۳	۲۹/۵۹	Control vs. 10
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۵۲/۶۷ تا ۲۷/۱۵	۳۹/۹۱	Control vs. 15
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۶۲/۶۴ تا ۳۷/۱۲	۴۹/۸۸	Control vs. 20
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۸۲/۹۲ تا ۵۷/۴۰	۷۰/۱۶	Control vs. 30
۰/۰۰۰۱>	****	بله	۱۰۰/۹ تا ۷۵/۳۷	۸۸/۱۳	Control vs. 50

نتیجه گیری

اما این تفاوت چشمگیر نبود. همچنین از لحاظ رنگ ظاهری عصاره های حاوی ریشه گیاه نارنجی رنگ بودند و با افزایش مقدار و غلظت، شدت رنگ نارنجی این عصاره ها بیشتر شد و پررنگ تر شدند. در مورد عصاره های برگ و ساقه گیاه مامیران کبیر نیز این افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و بیشتر شدن شدت رنگ با افزایش غلظت و مقدار عصاره دیده شد. همچنین در مطالعه دیگری که بر روی خاصیت ضدسرطانی عصاره های اندام هوایی و زیر زمینی گیاه مامیران کبیر بر روی رده های سلول های سرطانی کشت داده شده (HT29) در زمان های مختلف و با غلظت های مختلف انجام شد. نتایج حاکی از این بود که عصاره های این گیاه خاصیت ضد سرطانی دارند و بر زنده مانی سلول های سرطانی و همچنین در فعالیت

در پژوهش حاضر با هدف استفاده از گیاهان دارویی در مطالعات بالینی و اثر گذاری این گیاهان بر رده سلول های سرطانی کلورکتال انجام شد. در این مطالعه سنجش آلکالوئیدهای کل گیاه مامیران کبیر در عصاره های متانولی حاصل از اندام هوایی و زیرزمینی گیاه مامیران کبیر شامل برگ و ساقه و ریشه در غلظت های مختلف جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد سرطانی بر روی لاین سلولی سرطان کلورکتال (HT29) انجام پذیرفت. مطابق با نتایج حاصل شده فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره ریشه گیاه مامیران کبیر اندکی از فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره برگ و ساقه آن بیشتر بود که این میتواند دلیلی بر تجمع بیشتر آلکالوئیدها و بیشتر بودن ماده موثره در ریشه این گیاه باشد

آپاتوزی نقش بسیار موثری دارند و با افزایش دوز این اثر بیشتر است. محققین و پژوهشگران زیادی درباره اثرات گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) و دیگر گیاهان خانواده خشخاش *Papaveracea* بر روی لاین سلول های سرطانی مختلف پژوهش و مطالعه کرده اند. مطالعه ای توسط Dejanin و همکارانش در سال ۲۰۱۶ درباره اثرات ضد سرطانی گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) بر روی پنج رده سلول های سرطانی HCT116، A549، H460، MDAMB231 و SW480 و از نظر تکثیر و زنده مانی سلول های سرطانی، چرخه سلولی و مهاجرت سلول ها انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که هر پنج رده سلولی افزایش فعالیت سیتوتوکسیک را وابسته به زمان و غلظت نشان دادند. همچنین عصاره باعث توقف چرخه سلولی و آپاتوز القایی شد. VN و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۱ اثرات عصاره آبی گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) را بر روی رده سلولی سرطانی MCF-7 بررسی کردند. نتایج، اثر مستقیم ذرات آلکالوئیدی عصاره را بر تکثیر سلول های سرطانی نشان داد *berberine* و *chelerythrine* بیشترین فعالیت ضد تکثیری را علیه رده سلول های سرطانی MCF-7 نشان دادند. Park و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر عصاره گیاه مامیران کبیر را بر رده ی سلول های سرطانی A431 بررسی کردند. این عصاره تکثیر را در رده سلولی A431 در فاز G1 کاهش داد. همچنین تیمار با عصاره گیاه باعث افزایش درصد آپاتوز سلول های A431 در چرخه ی سلولی شد. طبق مطالعات Khiao و همکاران در سال ۲۰۱۱ عصاره گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) حاوی اجزای مختلفی است که این اجزا برای فعالیت های ضد سرطانی ضروری هستند. در بررسی فعالیت ضد نوپلاستیک این تحقیق، نشان داده شد که آلکالوئید *sanguinarine* که یک عامل ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در گیاه مامیران کبیر است در رده های سلولی سرطانی، فعالیت آپاتوزی و ضد تکثیری را اعمال کرد. در مطالعه ی دیگری در این زمینه توسط Sarita و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی *Mexicana argemone* که یکی دیگر

از اعضای خانواده تیره *Papaveracea* است صورت گرفت که اولین مطالعه آلکالوئیدهای این گیاه بر روی رده ی سلولی سرطانی روده بزرگ انسان (SW480) بود. این مطالعه نشان داد که برخی از آلکالوئیدهای این گیاه به شدت از تکثیر سلولی در سلول های سرطانی روده بزرگ انسان جلوگیری میکنند و ممکن است به عنوان یک داروی شیمی درمانی قوی در آینده مورد استفاده قرار گیرند. پژوهش دیگری نیز توسط Stefanowski و همکاران در سال ۲۰۲۱ با محوریت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه مامیران کبیر انجام شد. در این پژوهش همچنین بیان شد که آنتی اکسیدان ها موادی هستند که می توانند مانع اکسیداسیون ترکیبات دیگر شوند. آنزیم های آنتی اکسیدانی شامل سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز هستند. آنزیم های آنتی اکسیدانی در برابر حملات اکسیداتیو فعال و بزرگ به علت توانایی تجزیه ROS ها اثرات محافظتی موثری دارند. این مجموعه از آنتی اکسیدان ها نقش مهمی در جلوگیری از بیماری ها دارند. کاتالاز مهم ترین آنزیم آنتی اکسیدانی در برابر پراکسید هیدروژن است. در این مطالعه که گیاه مامیران کبیر از دو منطقه شهری و روستایی جمع آوری شده بود مشخص شد که عصاره های ساقه جمع آوری شده گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) از مناطق شهری اثر بیشتری در افزایش فعالیت کاتالاز داشتند. عصاره های ریشه گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) نیز که از نواحی روستایی جمع آوری شده بودند به طور قابل توجهی سطح کاتالاز را افزایش دادند (۶۵٪) افزایش فعالیت کاتالاز باعث افزایش سطح (TAC ظرفیت آنتی اکسیدانی تام) شد. در سال ۲۰۱۲ Lee و همکاران مطالعه ای درباره ی اثر آپاتوزی *sanguinarine* گیاه *Sanguinari Canadensis* از خانواده *Papaveracea* بر روی رده ی سلولی سرطانی روده بزرگ انسان (HT29) انجام دادند. نتایج حاکی از این بود که *sanguinarine* باعث کاهش تکثیر و آپاتوز در سلول های سرطانی روده بزرگ شد. در سال ۲۰۲۲ پژوهش دیگری درباره اثرات عصاره گیاه *majus Chelidonium* بر روی لاین سلولی سرطان تخمدان توسط

سیگنالینگ مهم بیولوژیکی در آپاپتوز سلول های سرطانی تخمدان نقش دارد و باعث بهبود سرطان می شود.

هر دو عصاره اندام هوایی و اندام زیرزمینی افزایش یافت. عصاره های این گیاه خاصیت ضد سرطانی دارند و بر زنده مانی سلول های سرطانی و همچنین در فعالیت آپاپتوزی نقش بسیار موثری دارند. مطالعات دیگری توسط دانشمندان در ارتباط با این گیاه و سایر اعضای این خانواده و بررسی اثر آن ها بر سایر لاین های سلول های سرطانی نیز انجام پذیرفته که حاکی از اثربخشی این تیره در درمان سرطان بوده است هرچند که مطالعات بیشتر در این زمینه ادامه دارد و نیازمند بررسی های بیشتر است.

Shen و همکارانش انجام شد. گیاه مامیران کبیر (*chelidonium majus*) با تنظیم مسیره های

در پژوهش حاضر با هدف استفاده از گیاهان دارویی در مطالعات بالینی و اثر گذاری این گیاهان بر رده سلول های سرطانی کلورکتال انجام شد. مشکلات فعلی در استفاده از شیمی درمانی و پرتودرمانی و عوارض جانبی متعدد که در اثر استفاده از آن ها برای بیمار ایجاد می شود و همچنین مقاومت سلول های سرطانی به درمان های رایج باعث شده است که محققین روجه سمت داروهای جدید با اثربیشتر و سمیت کمتر بیاورند. عصاره های این گیاه در تمام غلظت ها و با هر بار تکرار فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی را از خود نشان دادند و با افزایش غلظت این عصاره ها میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در

منابع

1. Mohtareh Noei, Rostam Rezaiyan, Jalal Mohammadikhou Sharaj, Samaneh Sarafzadeh (2018). "Epidemiological Study of Colorectal Cancer in Iran and Worldwide."
2. Maliheh Abdollahi, Fatemeh Alimirzaei, Farzaneh Danakhah (2017). "The Effect of Medicinal Plants on Cancers in Iran."
3. Mohammadreza Heydari, Reza Noorazzadeh, Mohammad Abasi (2013). "Application of Herbal Medicines in Cardiovascular Diseases."
4. Daniel I. Hădărugă, Nicoleta G. Hădărugă-Antioxidant activity of *Chelidonium majus* L. extracts from the Banat county(2009)
5. S. Ioana cojocaru et al -Studies regarding the chromatographic separation of some *Chelidonium majus* L. alkaloids using different solvent system(2010)
6. Z.khodabande V.Jafarian ,R.sariri - Antioxidant activity of *Chelidonium majus* extract at phenological stages(2017)
7. V. krizhanovska, I. Sile ,A. Kronberga ,I. Nakurte ,L. Mezaka ,M. Dambrova ,O. Pugovics ,S.Grinberga-The cultivation of *Chelidonium majus* L. increased the total alkaloid content and cytotoxic activity compared whit those of wild-grown plants (2021)
8. F. Pantano1, G. Mannocchi1, E. Marinelli1, S. Gentili2, S. GrazianO2, F.P. Busardo1, N.M. Diluca3- Hepatotoxicity induced by greater celandine (*Chelidonium majus* L.) a review of the literature(2017)
9. M. Deljanin , M. Nikolic , D. Baskic , D. Todorovic , P.Djurdjevic , M. Zaric , M. Stankovic , M.Todorovic , D. Avramovic ,S. Popovic - *Chelidonium majus* crude extract inhibits migration and induces cell

- cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines(2016)
10. D. Vn ,M. Ry ,C. Vo ,A.Rebriev ,L. Ev ,L.Garmanchuk ,P. Ov-Influence of Chelidonium majus water extract on to cancer cells and platelets-(2018)
 11. A.Warowicka ,T.Popenda ,G.Bartkowiak ,O.Musidlak ,J.Litowczenko-Cybulska ,D.Kuzma ,R.Nawrot ,S.Jurga - Protoberberine compounds extracted from Chelidonium majus L. as novel natural photosensitizers for cancer therapy(2021)
 12. Nataniel Stefanowski, Halyna Tkachenko, Natalia Kurhaluk- Effects of extracts derived from roots and stems of Chelidonium majus L. on oxidative stress biomarkers in the model of equine plasma(2021)
 13. J.Lee ,W. Kyo Jung ,M.Ho Jeong , T. Rim Yoon ,H. Keyun Kim- Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway
 14. Cytotoxicity of alkaloids isolated from Argemone mexicana on SW411 human colon cancer cell line Sarita Singh, Mradul Verma , Meenakshi Malhotra, Satya Prakash, Tryambak Deo Singh(2015)
 15. L.Shen ,S.Lee ,J.Cheon Joo ,E. Hong ,Z.Yang Cui ,E.Jo ,S. Jang Park ,H. Jin Jang-Chelidonium majus Induces Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells via ATF3-Mediated Regulation of Foxo3a by Tip60(2022)
 16. Hendrik Rudolf,Anett Ullrich,Kaja Ludwig(2009), Toxicity caused by Chelidonium majus in primary human, canine, monkey, and rat hepatocytes
 17. 41. Radim Haveleka, Martina Seifrtovaa, Karel Kralovecb, Klara Habartovaa, Lucie Cahlikovac and Martina Rezacovaa (2017) Chelidonine and Homochelidonine Induce Cell Death through Cell Cycle Checkpoints and MAP Kinase Pathways
 18. Xinzhe Xiao, Zehui Chen, Zengrui Wu, Tianduanyi Wang, Weihua Li, Guixia Liu, Guixia Liu, Bo Zhang ,Yun Tang(2019) Insights into the antineoplastic mechanism of Chelidonium majus via systems pharmacology approach
 19. Y. H. Aljuraissy, N. Kh. Mahdi and M. N. J. Al-Darraji(2012) Cytotoxic effect of Chelidonium majus on cancer cell lines
 20. Z. Dragana Jakovljevic, S. Milan Stankovic, and D. Marina Topuzovic (2013) Seasonal variability of Chelidonium majus L. secondary metabolites content and antioxidant activity

تولید اقتصادی آنزیم زایلاناز از سبوس برنج توسط باسیلوس سرئوس جداسازی شده از رسوبات آبی دریای خزر

مهسا یوسفی نیارکی^۱، شکوفه غازی^{۲*}، سروناز فلسفی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: آنزیم زایلاناز که یکی از اجزاء ساختمانی دیواره سلولی گیاهان به شمار می‌رود. تولید این آنزیم توسط قارچها، باکتریها، جلبک‌های دریایی، گزارش شده است. در تولید کاغذ، صنایع نساجی، و مواد غذایی استفاده می‌شوند. هدف از این تحقیق، جداسازی بهترین گونه های جنس باسیلوس از رسوبات آبی دریای خزر و بهینه سازی تولید بیشترین مقدار آنزیم زایلاناز است.

مواد و روش ها: در این تحقیق، ۱۰ نمونه از رسوبات آبی دریای خزر در منطقه نوشهر جمع آوری شد. هر نمونه در محیط مایع لوریا برتانی کشت داده شد. سپس از تکنیک تیمار حرارتی استفاده گردید. رقت سازی سریالی و روش پورپلیت انجام شد. به منظور غربالگری اولیه روی محیط اختصاصی زایلان آگار به صورت نقطه ای کشت داده شد. به دنبال مشاهده هاله، روش چاهک گذاری انجام گردید. رنگ آمیزی گرم، اسپور و دیگر تست های بیوشیمیایی انجام شد. همچنین با نمونه منتخب، بهینه سازی میزان تولید آنزیم زایلاناز انجام شد.

یافته ها: در این تحقیق، از میان ۱۰۰ گونه باسیلوس، ۳۰ گونه در مرحله غربالگری اولیه ۱۰ گونه در مرحله ثانویه دارای بیشترین قطر هاله انتخاب شدند. یک گونه باسیلوس با قطر هاله ۲۴ میلی متر به عنوان بهترین تولید کننده آنزیم انتخاب گردید. نتایج سنجش میزان فعالیت آنزیمی به روش DNS این نمونه در دمای ۴۵ درجه ی سانتی گراد با اسیدیته ۹، بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز (۷۶/۶ IU/ml) را نشان داد. در بهینه سازی سبوس برنج فعالیت آنزیمی (۱۱۰/۵ IU/ml) را نشان داد. جدایه مجهول با ۹۹٪ تشابه مربوط به باسیلوس سرئوس است.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده جداسازی گونه های باسیلوس مولد آنزیم زایلاناز حاکی از آن است که زیست بوم دریای خزر قابلیت مناسب جهت دستیابی به جدایه های توانمند در تولید آنزیم زایلاناز را داراست که می توان از این جدایه ها طی فرایند بهینه سازی ارزان قیمت آنزیم به بهره اقتصادی دست یافت.

واژگان کلیدی: آنزیم زایلاناز، رسوبات آبی دریای خزر، باسیلوس، تکنیک دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)، باسیلوس سرئوس

Economic production of xylanase enzyme from rice bran by *Bacillus cereus* isolated from Caspian sea sediments

Mahsa Yousefiniaraki¹, Shokoofeh Ghazi^{2*}, Sarvnaz Falsafi³

1. Master student, Department of microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Department of microbiology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Xylanase enzyme is one of the structural components of the plant cell wall. The production of this enzyme by fungi, bacteria, and seaweed has been reported. They are used in paper production, the textile industry, and food. The purpose of this research is to isolate the best *Bacillus* species from the water sediments of the Caspian Sea and to optimize the production of the highest amount of xylanase enzyme.

Methods: this research aims, 10 samples of Caspian sea sediments were collected in Nowshahr region. Each sample was cultured in Luria-Bertani liquid medium. The heat treatment technique was used. Serial dilution and the pour plate method were performed. For initial screening, it was cultured on the special Xylan Agar medium. After observing the aura, the drilling method was performed. Gram staining, spores and other biochemical tests were performed. Also, with the selected sample, optimization of xylanase enzyme production was done.

Results: In this research, among 100 *Bacillus* species, 30 species were selected in the primary screening stage and 10 species in the secondary stage had the largest halo diameter. A *Bacillus* species with a halo diameter of 24 mm was selected as the best enzyme producer. The results of measuring the amount of enzyme activity by the DNS method of this sample showed the highest amount of xylanase enzyme production activity (76.6 IU/ml) at a temperature of 45°C with an acidity of 9. Enzyme activity (110.5 IU/ml) was improved in rice bran optimization. The unknown isolate is related to *Bacillus cereus* with 99% similarity.

Conclusion: The results of the isolation of *Bacillus* species producing xylanase enzyme indicate that the Caspian Sea ecosystem has the appropriate ability to obtain isolates capable of producing xylanase enzyme, which can be obtained from these isolates through a cheap optimization process. The enzyme achieved economic benefits.

Keywords: Xylanase enzyme, Caspian Sea sediments, *Bacillus*, Dinitrosalicylic acid technique(DNS), *Bacillus cereus*

مقدمه

زایلانازها جزو آنزیم های هیدرولیتیک همی سلولزی اند که زایلان و زایلو-الیگوساکاریدها را تجزیه کنند. زایلان، جزء اصلی همی سلولز در سلول های گیاهی، یکی از فراوان ترین منابع طبیعی زیست توده تجدید پذیر است و دومین پلی ساکارید طبیعی تجدیدپذیر موجود روی زمین است که ۳۳ درصد از کل زیست توده لیگنوسلولزی موجود در کره زمین را پوشش می دهد. امروزه زایلاناز نقش مهمی در بهبود کیفیت محصولات صنعتی، اعم از صنایع مواد غذایی، سفید شویی زیستی خمیر کاغذ، نرمتر کردن پارچه در صنایع نساجی، بهبود دهنده خوراک دام و از جمله فراورده های کاربردی در سوخت زیستی ایفا می کند. ترکیب زایلاناز با گلوکاناز، آمیلاز، سلولز و پکتیناز کاربردهای بالقوه ای در تولید انواع فراورده های نان های صنعتی حجیم و نیمه حجیم، بیسکویت و ... به لحاظ ایجاد ساختاری نرم و سبک، قابل هضم و با ماندگاری طولانی مدت تر را دارند. زایلانازها می توانند کارایی استفاده از لیگنوسلولز را افزایش دهند و آلودگی محیط زیست را کاهش دهند. طیف وسیعی از زایلانازهای تولید شده توسط میکروارگانیسم ها به گروه عمده ای از آنزیم های صنعتی تبدیل می شوند که قادر به تجزیه زایلان به سوخت های تجدید پذیر و مواد شیمیایی هستند. (۱، ۲، ۳). درمیان باکتری ها و

سیانوباکتری های محیط های دریایی نیز زایلاناز تولید می شوند (۵). اطلاعاتی نیز در مورد زایلاناز گیاهان وجود دارد که اندوکسیلاناز میوه های گلابی ژاپنی در طول دوره بلوغ است و حیوانات دیگری مانند نرم تنان نیز قادر به تولید زایلاناز هستند (۶). همچنین گزارش های مربوط به جداسازی زایلاناز از منابع مختلف دیگر مانند باکتری بی هوازی *کستریدیوم استوبوتیلیکوم*، بذر خیار نارس و جو جوانه زده وجود دارد (۷). لذا در تحقیق حاضر نشان دادن پتانسیل و توانمندی جدایه های بومی کشور در قابلیت تولید فراورده های ارزشمندی نظیر آنزیم زایلاناز از نقاط قوت این تحقیق به کار می رود اولاً با ارائه این کار بتوانیم به سویه های استاندارد دست یافته و در کشور ثبت کنیم و ثانیاً، از خروج ارز جلوگیری کنیم. همچنین محل جداسازی جدایه ها از زیست بوم جدید رسوبات آبی دریای خزر در منطقه ساحلی نوشهر انجام گرفت. در همین راستا هدف اصلی جداسازی بهترین جدایه های جنس *باسیلوس* از رسوبات دریای خزر جهت تولید آنزیم زایلاناز و بهینه سازی شرایط تولید آنزیم است.

مواد و روش ها

جداسازی جنس *باسیلوس*

به منظور جداسازی جنس *باسیلوس*، ۱۰ نمونه از رسوبات آبی (گل و لای) از کف دریای خزر در منطقه ساحلی نوشهر در شرایط استریل نمونه برداری انجام گردید. ابتدا ظروف فالكون در پیچ دار که از قبل استریل شده در داخل آب قرار داده در ظرف را داخل آب باز کرده و رسوبات آبی (گل و لای) همراه مقداری آب از عمق ۱۰-۱۵ سانتی متری برداشته شد. بلافاصله نمونه ها راتحت شرایط استریل در دما ۴ درجه سانتی گراد جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. ابتدا نمونه های آبی به صورت مجزا در محیط کشت مایع مغذی لوریا برتانی^۳ جهت رشد و تقویت به مدت ۴۸

نویسنده مسئول: استادیار، گروه

میکروبیولوژی، واحد علوم پزشکی تهران،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک:

shokoofeh.ghazi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

ساعت در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. سپس برای هر کدام نمونه ها رقت سریالی ۹ لوله ای به روش پورپلیت انجام شد. تیمار حرارتی برای اولین رقت در هر یک از نمونه های آبی به منظور از بین رفتن سلول های رویشی و باقی ماندن بقاء اسپور ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی گراد انجام شد. از هر لوله به اندازه ۱ سی سی با پپیت استریل وارد پلیت های استریل زیر هود میکروبیولوژیکی انجام گرفت. سپس محیط کشت مذاب پلیت کانت آگار اتوکلاو شده درون پلیت ها ریخته شد. به صورت عدد ۸ انگلیسی به منظور پخش شدن نمونه درون پلیت ها به طور یکنواخت چرخانده شد. و در دما ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد تا رشد کلنی ها حاصل شود. از هر کلنی کشت خالص تهیه شد. جهت تایید بیوشیمیایی اولیه جنس باسیلوس رنگ آمیزی گرم، اسپور، تست های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، ژلاتیناز، آمیلاز، لستیناز انجام شد.

غربالگری اولیه

در مرحله غربالگری اولیه، جدایه ها در کشت خالص در محیط اختصاصی زایلان آگار با ترکیبات موجود (beech wood xylan ۱۰ g/L, yeast ۵, pepton g/L ۵, extract g/L ۰/۲, MgSO4.7H2O g/L ۰/۲, Distilled water ۱۵ g/L, agar ۱۵ g/L, K2HPO4 ۱۵ g/L) به صورت کشت نقطه ای از کلنی ها داده شد. جدایه هایی که توانایی تولید آنزیم را داشتند با ظهور یک هاله شفاف شیری رنگ در اطراف کلنی روی محیط کشت بررسی شدند (۸).

غربالگری ثانویه (چاهک گذاری)

از تعداد جدایه هایی که در مرحله غربالگری اولیه بیشترین قطر هاله را داشتند کشت خالص تهیه و نگهداری شدند. سپس برای نتایج دقیق تر از روش چاهک گذاری استفاده شد. در این روش محیط اختصاصی زایلان آگار پس از

اتوکلاو تهیه شد. با انتهای پپیت پاستور استریل چاهک هایی در مرکز پلیت ها حفر شد. در ادامه جدایه هایی که از مرحله اول غربال شدند به صورت جدا در محیط زایلان برات پایه تولیدی با ترکیبات ذکر شده (beech wood yeast extract ۵, pepton g/L ۵, g/L ۱۰, xylan K2HPO4 ۱, MgSO4.7H2O ۰/۲ g/L, g/L ۱۵, Distilled water ۱۵ g/L) تلقیح گردید. در نهایت پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از اتوکلاو شیکردار بیرون آورده و نمونه گیری انجام شد. بدین صورت که، میزان ۱ تا ۲ سی سی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با ۹۰۰۰ rpm در ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ مایع رویی (سوپرناتانت) حاوی آنزیم خام به دست آمد. در ادامه از سوپرناتانت در چاهک های حفر شده بر روی محیط زایلان برات ریخته و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. جدایه هایی که توانایی مناسبی در تولید آنزیم داشتند هاله هایی در اطراف چاهک تشکیل دادند و قطر هاله اندازه گیری شد (۸).

سنجش کمی فعالیت آنزیمی جدایه های غربال شده

جهت سنجش کمی میزان تولید آنزیم زایلاناز، جدایه هایی که بالاترین میزان قطر هاله را داشتند انتخاب گردیدند. ابتدا سوسپانسیون تازه از باکتری ها تهیه شد. بعد از ۲۰ ساعت از انکوباتور شیکر دار بیرون آورده و بادستگاه اسپکتوفتومتری ۰/۵ مک فارلند اندازه گیری شد. سپس به

میزان (V/V) ۲٪ باکتری به محیط زایلان برات تلقیح شد. در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت جهت سنجش فعالیت کمی زایلاناز از روش استاندارد دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) طبق پروتکل Baily&millar استفاده شد. جهت سنجش میزان قند آزاد شده ضمن عملکرد آنزیم زایلاناز منحنی استاندارد قندی D_xylose

خالص انجام گرفت و کشت خالص باکتری جهت تعیین توانی به شرکت ژن ایران تحویل گردید تا مراحل مربوط به شناسایی دقیق جنس و گونه ی باکتریایی انجام گردد.

یافته ها

غربالگری اولیه

در این تحقیق بررسی روی ۱۰۰ جدایه باکتری های گرم مثبت هوازی اسپوردار و کاتالاز مثبت جداسازی شده از رسوبات دریای خزر انجام شد. با انجام مرحله غربالگری اولیه در محیط اختصاصی زایلان آگار، کشت نقطه ای برای هر ۱۰۰ جدایه انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ۳۰ جدایه توانایی تولید آنزیم زایلاناز را در محدوده ضعیف تا عالی با مشاهده بررسی و اندازه گیری قطر هاله دارا هستند. همانطور که در جدول (۱) اشاره شده، ۳۰ جدایه با نشان دادن محدوده ای از قطر هاله از (۱۰ تا ۲۴ میلی متر) از سایر کلنی ها غربال شدند. و در جدول (۱)، نتایج غربالگری اولیه جدایه هایی که بالاترین هاله ی تجزیه ی آنزیمی را از خود نشان دادند ضمن اندازه گیری قطر هاله به میلی متر ذکر شده اند. برای هر جدایه آزمایشات با ۳ تکرار انجام شد. جدول (۱)

طبق پروتکل رسم شد. میزان فعالیت آنزیمی با واحد استاندارد بین المللی IU/ml گزارش گردید (۹، ۱۰).

تولید اقتصادی آنزیم توسط جدایه شناسایی شده

بدین منظور جهت تولید اقتصادی و با صرفه آنزیم توسط باکتری شناسایی شده، از ضایعات کشاورزی ارزان قیمت جهت تولید آنزیم زایلاناز استفاده شد. به عنوان منبع کربن در تولید اقتصادی آنزیم از ضایعات کشاورزی، سبوس برنج، سبوس گندم، سبوس جو، ملاس استفاده شد. ضایعات کشاورزی استفاده شده جهت اتوکلاو هریک جداگانه وزن شده و به ترکیبات محیط کشت پایه تولیدی آنزیم که در قسمت ۲-۳ اشاره شده اضافه شدند. آزمایش با ۳ تکرار برای منبع کربن در ارلن های ۲۵۰ سی سی که حاوی ۵۰ سی سی محیط کشت پایه تولیدی بودند انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه برتر

به منظور شناسایی مولکولی جنس و گونه دقیق باکتری جداسازی شده و توانمند در تولید آنزیم زایلاناز پس از تکمیل فرایند غربالگری، از گونه برتر و مجهول کشت

جدول ۱- جدایه هایی که در مرحله غربالگری اولیه قطر هاله از (۱۰ تا ۲۴ میلی متر) داشتند

شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)
۱	۲۰	۷	۲۰	۱۳	۱۵	۱۹	۱۸	۲۵	۱۸
۲	۲۰	۸	۲۰	۱۴	۱۵	۲۰	۱۳	۲۶	۱۰
۳	۲۳	۹	۱۵	۱۵	۱۷	۲۱	۱۶	۲۷	۱۵

۴	۲۴	۱۰	۱۶	۱۶	۱۳	۲۲	۱۳	۲۸	۱۴
۵	۲۴	۱۱	۱۵	۱۷	۱۵	۲۳	۱۳	۲۹	۱۸
۶	۱۵	۱۲	۱۴	۱۸	۱۷	۲۴	۱۷	۳۰	۱۰

غربالگری ثانویه (چاهک گذاری)

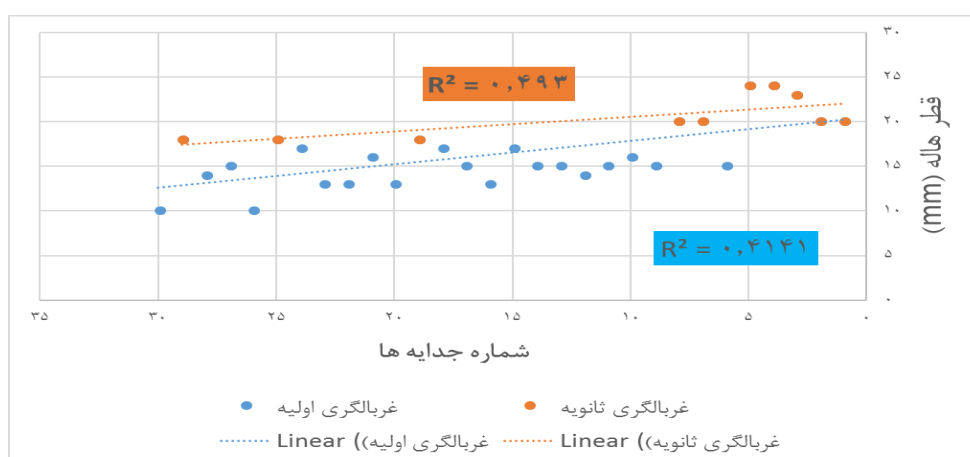
برای بررسی دقیق تر ۱۰ جدایه که قطر هاله بالاتر بین (۱۸ تا ۲۴ میلی متر) را نشان دادند در مرحله غربالگری ثانویه به روش چاهک گذاری انتخاب شد. همانگونه که در جدول (۲) نشان داده شده است، طی انجام مراحل غربالگری ثانویه سوپرناتانت شفاف حاوی آنزیم خام در انکوباسیون ۱۶۰ rpm در دما ۳۷ درجه

جدول ۲_ جدایه هایی منتخب در مرحله غربالگری ثانویه (چاهک گذاری) با قطر هاله (۱۸ تا ۲۴ میلی متر)

شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)	شماره جدایه های غربال شده	قطر هاله (میلی متر)
۱	۲۰	۷	۲۰
۲	۲۰	۸	۲۰
۳	۲۳	۱۹	۱۸
۴	۲۴	۲۵	۱۸
۵	۲۴	۲۹	۱۸

غربالگری اولیه و ثانویه (۰/۹۲۱) یعنی (۰/۹۲۰۱۱) گزارش شد و رگرسیون خطی رسم شد.

طبق نتایج آنالیز ضریب تعیین در شکل (۱) اندازه قطر هاله در غربالگری اولیه ($R^2 = 0/414$) و در غربالگری ثانویه ($R^2 = 0/493$) محاسبه شد. همچنین ضریب همبستگی در



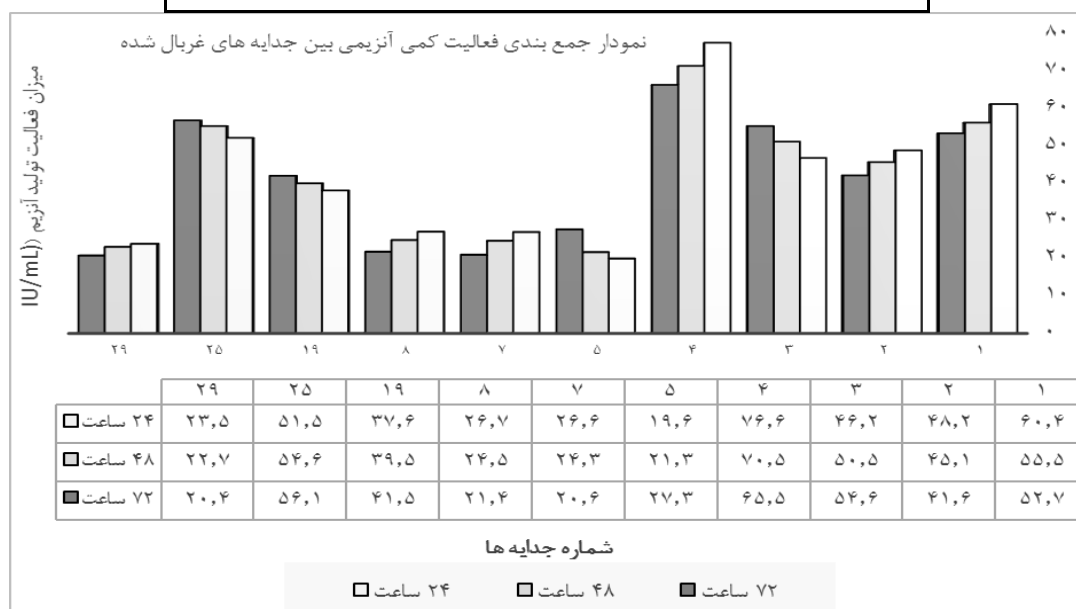
شکل ۱. نتایج آنالیز ضریب تعیین (R^2) اندازه قطر هاله غربالگری اولیه و ثانویه و رسم نمودار رگرسیون خطی

سنجش کمی فعالیت آنزیمی جدایه های غربال شده

کاهش نشان داد. همچنین با بررسی میزان تولید ۷۲ ساعته برای این جدایه نیز میزان تولید آنزیم با عددی معادل (۶۵/۵ IU/ml) روند نزولی داشت. لذا مشخص گردید سویه ی شماره ۴ بالاترین توانایی تولید آنزیم را در بازه ی زمانی معادل ۲۴ ساعت دارا است. در ادامه، جدایه های شماره (۱) و (۲۵) نیز با قدرت تولید آنزیمی معادل (IU/ml) ۶۰/۴ و (۵۶/۱ IU/ml) سویه های توانمندی جهت تولید آنزیم نیز به شمار می روند و تولید مناسبی در بازه ی زمانی به ترتیب ۲۴ ساعته و ۷۲ ساعته داشتند. بررسی نتایج برای هر جدایه با ۳ تکرار انجام شد. نمودار (۲)

نتایج حاصل از سنجش میزان تولید کمی آنزیم برای جدایه های غربال شده که در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت ساعت بررسی گردید. طبق نمودار (۲) همانگونه که نشان داده شده است طی نتایج کمی و کیفی به روش استاندارد دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)، جدایه (۴) در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و جذب نوری (OD: ۰/۱۲۷) بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز (ml) ۷۶/۶ IU/ در روز اول و یا به عبارتی پس از گذشت ۲۴ ساعت از فرایند تولید از خود نشان داد. در ادامه روند تولید آنزیم در ۴۸ ساعت با میزانی معادل (۷۰/۵ IU/ml) روند

Anova: Single Factor				
SUMMARY				
Variance	Average	Sum	Count	Groups
۱۰۳/۷۸۸۹	۱۰/۳	۱۰۳	۱۰	شماره جدایه
۳۳۵/۰۷۸۸	۴۱/۶۹	۴۱۶/۹	۱۰	۲۴ساعت
۲۹۴/۲۹۶۱	۴۰/۸۵	۴۰۸/۵	۱۰	۴۸ساعت
۲۸۴/۰۲۲۳	۴۰/۱۷	۴۰۱/۷	۱۰	۷۲ساعت
مقدار آلفا ۰.۰۵				



شکل ۲. نمودار جمع بندی فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

همبستگی در فواصل زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ در جدول (۴) نشان داده شده است.

نتایج حاصل از آنالیز آماری واریانس نشان داد مقدار $p_value: ۰/۰۰۰۱۱۶$ و مقدار آلفا $۰/۰۵$ است. اگر مقدار p_value از مقدار آلفا کمتر باشد رابطه معنی داری بین داده ها وجود دارد. در این آنالیز مقدار p_value کمتر از مقدار آلفا است در نتیجه رابطه معنی داری وجود دارد. بررسی نتایج آنالیز واریانس در جدول (۳) و نتایج ضریب

F crit	P-value	F	MS	df	SS	Source of Variation
۲.۸۶۶۲۶۶	۰.۰۰۰۰۱۱۶	۹.۲۲۲۵۹۹	۲۳۴۵.۲۷۵	۳	۷۰۳۵.۸۲۵	Between Groups
			۲۵۴.۲۹۶۵	۳۶	۹۱۵۴.۶۷۵	Within Groups
				۳۹	۱۶۱۹۰.۵	Total

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

همبستگی بین ساعت ۲۴ و ۴۸ ساعت	۰.۹۸۲۷۹۶۹۸۷	۹۸.۲۸
همبستگی بین ۲۴ و ۷۲ ساعت	۰.۹۲۳۶۶۶۲۶۱۵	۹۲.۳۷
همبستگی بین ۴۸ و ۷۲ ساعت	۰.۹۷۵۵۳۹۲۹	۹۷.۵۵

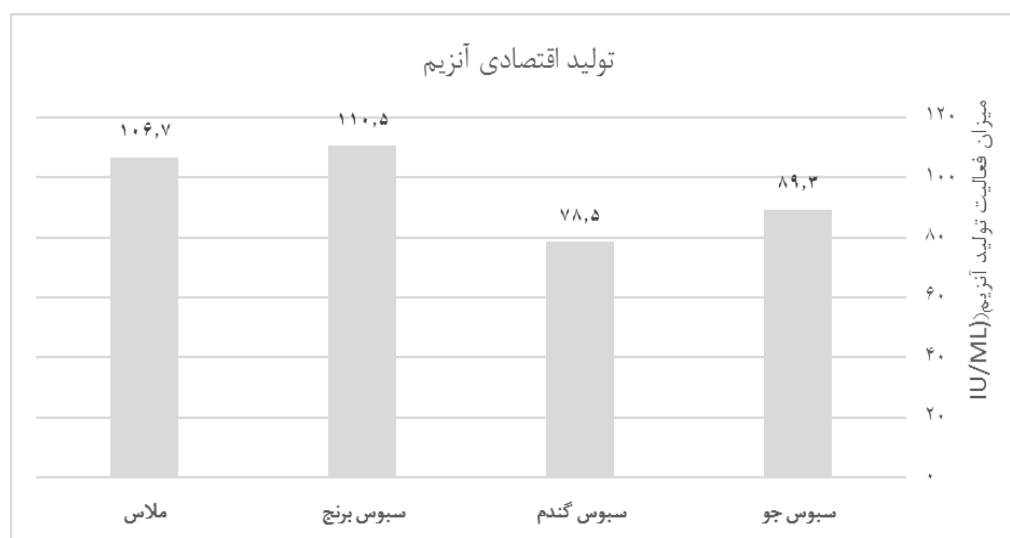
جدول ۴. نتایج همبستگی فعالیت کمی آنزیمی بین جدایه های غربال شده در بازه زمانی، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت

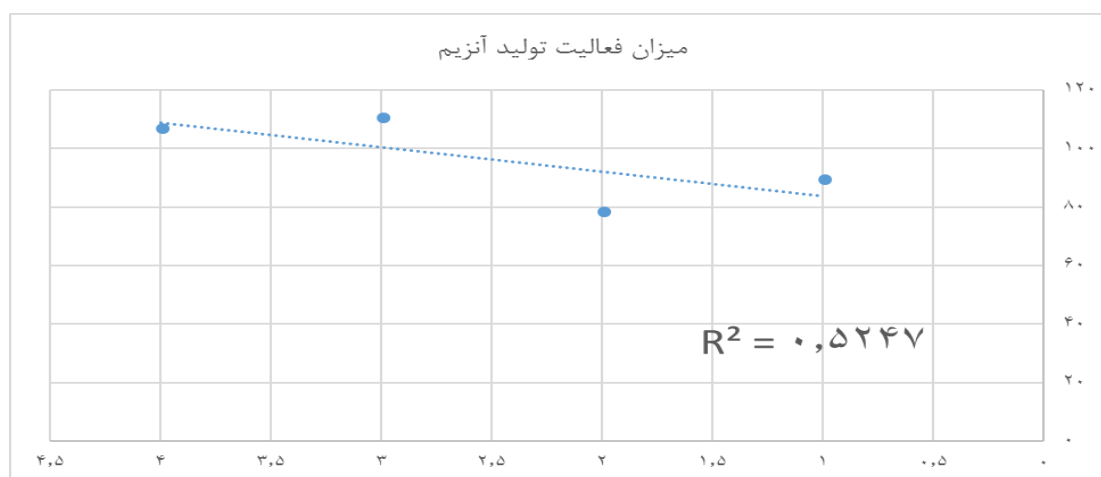
تولید اقتصادی آنزیم توسط جدایه شناسایی شده

همچنین بعد از آن ملاس با فعالیت آنزیمی معادل (۱۰۶/۷ IU/ml) تولید آنزیم بالاتر نشان داده شد. نتایج تولید اقتصادی آنزیم با ضریب تعیین ($R^2=0.5247$) محاسبه شد. رگرسیون خطی در شکل (۴) نشان داده شد.

نتایج حاصل از تولید اقتصادی جدایه شماره ۴ که بیشترین تولید آنزیم را در بازه زمانی ۲۴ ساعت از ضایعات کشاورزی، سبوس برنج، سبوس گندم، سبوس جو، ملاس استفاده شد طبق شکل (۳) نشان داده شده است. طی این نتایج با استفاده از سبوس برنج با فعالیت آنزیمی معادل (۱۱۰/۵ IU/ml) و

شکل ۳. تولید اقتصادی آنزیم در بازه زمانی ۲۴ ساعت





شکل ۴. رگرسیون خطی میزان فعالیت اقتصادی آنزیم

آزمون های بیوشیمیایی مربوط به جنس باسیلوس

نتایج حاصل جهت تایید بیوشیمیایی جنس باسیلوس
رنگ آمیزی گرم، اسپور، تست های کاتالاز، اکسیداز،
حرکت، ژلاتیناز، آمیلاز، لستیناز برای جدایه منتخب
شماره (۴) انجام شده به صورت جدول زیر است.
جدول (۵).

جدول ۵. تست های بیوشیمیایی

رنگ آمیزی گرم	اسپور	اکسیداز	کاتالاز	حرکت	ژلاتیناز	آمیلاز	لستیناز
+	+	-	+	+	+	+	+

شناسایی مولکولی جدایه برتر

بر طبق نتایج به دست آمده به دنبال توالی یابی ژنوم گونه
غربال شده نتایج در درگاه NCBI پس از بلاستینگ به
شرح زیر می باشد. بر طبق نتایج مشخص گردید که
جدایه ی مجهول با ۱۰۰٪ تشابه SrRNA ۱۶ مربوط به
جنس باسیلوس و گونه سرئوس تحت نام علمی
Bacillus cereus می باشد.

نتیجه گیری
تاکنون تحقیقات زیادی در ارتباط با انواع زایلانازها صورت
گرفته است. با توجه به اهمیت زایلاناز و کاربرد های صنعتی
آن دانشمندان و محققان همیشه درصدد تولید این آنزیم
بوده لذا جستجو برای منابع میکروبی تولید کننده آنزیم
اعم از باکتری ها و قارچ های توانمند در تولید آنزیم در

اولویت می باشد. همسو با تحقیقات انجام شده می توان
به مناطق جداسازی شده باکتری های توانمند در تولید
آنزیم اشاره داشت به عنوان مثال جداسازی از خاک مزارع
پنبه توسط اخوان سپهی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ انجام
شد و در ادامه با جداسازی سویه مناسب باسیلوس از خاک

۴۹

مزارع پنبه فرایند بهینه سازی تولید آنزیم را تکمیل نموده که در نهایت باسیلوس موجاونسسیس غربال شده را به عنوان سویه برتر جهت تولید زایلاناز در شرایط غیر بهینه با تولیدی معادل ($194/68 \text{ IU/ml}$) و میزان شرایط بهینه تولید آنزیم ($302/466 \text{ IU/ml}$) گزارش دادند (۸). سنتیل کومار و همکارانش در سال ۲۰۱۸ بر روی نمونه های مربوط به رسوبات دریایی از سواحل کوالام در کشور هند مطالعاتی انجام دادند. در مطالعات انجام شده به وسیله آن ها نمونه های جمع آوری شده ابتدا عمل جداسازی بر روی آن ها انجام شد و فعالیت آنزیم زایلاناز با روش DNS مورد سنجش قرار گرفت و در نتایج اعلام شده شرایط بهینه فعالیت و عملکرد آنزیم در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به صورت فعال گزارش شد (۱۱). خنده پاکار و بوهسله در سال ۲۰۰۶ جهت استخراج آنزیم که عمل سانتریفیوژ باعث رسوب مواد جامد و معلق موجود در محیط کشت می شود و در نتیجه عصاره شفاف رویی به عنوان منبع آنزیم زایلاناز خارج سلولی و خام جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده می شود (۱۲). در این راستا و همسو با پژوهش های قبلی انجام شده در این مطالعه جداسازی و غربالگری از رسوبات دریای خزر از یک اکوسیستم جدید و کمتر دیده شده انجام شد. به گونه ای که اکوسیستم های بکر و جدیدی در پژوهش انجام شده جدایه باسیلوس (شماره ۴) جداسازی شده از رسوبات آبی دریای خزر در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، میزان فعالیت آنزیم ($76/6 \text{ IU/ml}$) بالاترین میزان تولید آنزیم زایلاناز تحت شرایط آزمایشگاهی به دست آمد. توجه به تولید اقتصادی و ارزان قیمت آنزیم زایلاناز در حضور سوبسترای سبوس برنج با میزان تولیدی معادل ($110/5 \text{ IU/ml}$) از دیگر دستاورد های ارزشمند به عنوان پیش زمینه ای در جهت تولید اقتصادی آنزیم است. ضمن اینکه موضوع تولید آنزیم زایلاناز توسط گونه های بومی در کشور و طراحی و اجرای یک پروسه ی ارزان تر و مقرون به صرفه اقتصادی نسبت به سایر موضوعات با هزینه و امکانات مشابه در این رشته در اولویت است. به لحاظ گران بودن

مانند دریای خزر میتواند قابلیت های بیشتری را نه تنها برای گونه های میکروبی تولید کننده آنزیم زایلاناز داشته باشد بلکه قطعا برای سایر تولیدات میکروبی نیز اکوسیستم بکر و مستعدی است لذا نوید بخش است که منابع میکروبی تولیدکننده آنزیم های مختلف و سایر ترکیبات بیولوژیکی موثر در آن جست و جو شود. همچنین تکنیک غنی سازی اکوسیستم آبی به علت ضعیف بودن نمونه های آبی به صورت جدا نمونه ها در محیط کشت مایع مغذی لوریا برتانی به مدت ۴۸ ساعت تقویت و رشد داده شد سپس مراحل دیگر طبق پروتکل انجام شد. طی غربالگری ثانویه (چاهک گذاری) سوپرناتانت مایع رویی شفاف طی سانتریفیوژ در دور ۹۰۰۰ rpm در مدت ۱۰ دقیقه در دما ۴ درجه سانتی گراد باعث تولید آنزیم زایلاناز شد. همچنین همسو با مطالعات دیگر فعالیت آنزیم زایلاناز با روش DNS مورد سنجش قرار گرفت و شرایط بهینه فعالیت و عملکرد آنزیم در دما ۴۵ درجه سانتی گراد گزارش شد. سپس جذب نوری ($OD: 0/127$) و بیشترین میزان فعالیت تولید آنزیم زایلاناز ($76/6 \text{ IU/ml}$) را نشان داد. همچنین استفاده از سبوس برنج با فعالیت آنزیمی معادل ($110/5 \text{ IU/ml}$) تولید آنزیم بالاتر گزارش شد.

واردات آنزیم و برطرف کردن نیاز صنایع و کارخانجات تولید و غذایی کشور میتواند گره گشای بخشی از مشکلات مربوط به واردات آنزیم و خروج ارز از کشور را تا حدی برطرف سازد و در آینده با ادامه موضوعات مشابه و خالص سازی آنزیم در مقیاس صنعتی نیاز کشور را تا حدی بر طرف کند. پتانسیل توانمندی سویه های بومی کشور حاکی از این مطلب می باشد که اکوسیستم هایی که نادیده گرفته شده اند می توانند برای تولید آنزیم یا حتی سایر تولیدات و فراورده های میکروبی ارزشمند باشند تا بتوانیم با پژوهش های تکمیلی تر در آینده به فرآیند تولید آنزیم در مقیاس صنعتی و تجاری دست پیدا کنیم.

منابع

1. ChávezR, Bull P, Eyzaguirre J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of biotechnology*. (2006)Jun 10;123(4):413-33.
2. Collins T, Gerday C, Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*. (2005) Jan 1;29(1):3-23.
3. Polizeli MD, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DD. Xylanases from fungi:properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*.(2005)Jun;67:577-91.
4. Walia A, Guleria S, Mehta P, Chauhan A, Parkash J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech*. (2017)May;7:1-2.
5. Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated form marine environment.(2009)
6. Yamaura I, Koga T, Matsumoto T, Kato T. Purification and some properties of endo-1, 4-β-d-xylanase from a fresh-water mollusc, *Pomacea insularis* (de Ordigny). *Bioscience,biotechnology,and biochemistry*. (1997) Jan 1;61(4):615-20.
7. Sizova MV, Izquierdo JA, Panikov NS, Lynd LR. Cellulose-and xylan-degrading thermophilic anaerobic bacteria from biocompost. *Applied and environmental microbiology*.(2011)Apr 1;77(7):2282-91.
8. Akhavan Sepahi A, Ghazi Sh, Jafariagdam J, Akhavan Sepahi M. The Usage of Agricultural Lignicellulosic Wastes in cost effective production and optimization of Alkaline Xylanase, by an indigenous strain of *Bacillus Mojavensis* through submerged fermentation. *Journal of Biology* (2010) ,Volume 24 Number 3.
9. salem S. salem ,mamdouh S. Elgamal Amr fouda and essam H. Abdel-ahakour isolation, optimization and purification of thermostable xylanase from egyptlan anoxybacilus contaminans wh20 isolate .*Microbiology Al Azhar Bulletin of Science*, (2012) p.173_183.
10. Nagar S, Mittal A, Kumar D, Gupta VK. Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *International journal of biological macromolecules*. (2012) Mar 1;50(2):414-20.
11. Kumar PS, Yaashikaa PR, Saravanan A. Isolation, characterization and purification of xylanase producing bacteria from sea sediment. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. (2018)Jan 1;13:299-303.
12. Khandeparkar RD, Bhosle NB. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. (2006)Aug 2;39(4):732-42.

بررسی مقایسه مولکولی مقاومت به فلزات سنگین در سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس جدا شده از نمونه

غذایی و بالینی

فرزانه حسینی^{۱*}، مریم ذبیحی^۲، زهراشوقی^۳، فاطمه حیدری^۴، ساجده نوروزیان لنگرودی^۵

۱. استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانش آموزانه کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵. دانشجو کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: /ستافیلوکوکوس/ اورئوس از مهمترین عوامل مسمومیت غذایی و عفونت های بیمارستانی درجهان می باشد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی شیوع ژنهای *mecA* و *CzrC* در سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی، آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی آنها و تعیین حساسیت سویه ها به فلزات روی و کادمیوم به روش MIC می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق تعداد ۲۴ نمونه /ستافیلوکوکوس/ اورئوس جداسازی شده از مواد غذایی و نمونه های بالینی جمع آوری و در محیط های اختصاصی کشت داده و با آزمونهای بیوشیمیایی تایید شد. آزمون مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC علیه فلزات روی و کادمیوم انجام گردید. جهت شناسایی ژن های مقاومت *mecA* و *CzrC* از آزمون Multiplex PCR استفاده شد.

یافته ها: هر ۲۴ جدایه با استفاده از کشت و آزمونهای بیوشیمیایی به عنوان /ستافیلوکوکوس/ اورئوس تایید شدند. نتایج آنتی بیوگرام نمونه ها نشان داد بیشترین حساسیت در نمونه های غذایی نسبت به تیکوپلانتین (۱۰۰٪) و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک های کلیندامایسین و آزیترومایسین (۳/۳۳٪) بود. در نمونه های بالینی نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۷/۹۱٪) و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین (۳/۵۸٪) بدست آمد. فراوانی ژن مقاوم به متی سیلین و *CzrC* در نمونه های غذایی به ترتیب ۱۶/۶ و ۵۰٪ و در نمونه های بالینی به ترتیب ۵۰ و ۷۵٪ مشاهده شد. همچنین نتایج آزمون MIC نشان داد که کمترین غلظت تاثیر نمک کادمیوم بر روی نمونه های غذایی ۰/۶۲ ppm و در نمونه های انسانی ۰/۳ ppm بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ۰/۰۷ ppm حساس بوده اند.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بالای ژنهای *mecA* و *CzrC* در سویه های /ستافیلوکوکوس/ اورئوس جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی می باشد. به علاوه نشان داده شد میزان مقاومت آنتی بیوتیکی در این سویه ها نسبت بسیار زیاد می باشد که این امر هشدار جدی می باشد و تشخیص سریع جدایه های مقاوم جهت جلوگیری از گسترش مقاومت امری ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: /ستافیلوکوکوس/ اورئوس، مقاومت آنتی بیوتیکی، *mecA*، *CzrC*، Multiplex PCR

Molecular comparison of resistance to heavy metals in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples

Farzaneh Hoseini^{1*}, Maryam Zabihi², Zahra Shoghi³, Fatemeh Heydari⁴, Sajedeh Noruzian langroodi⁵

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
2. MS degree students, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
3. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
4. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University
5. MS student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Scinces, North Tehran Islamic Azad University

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* is one of the most important causes of food poisoning and nosocomical infections throughout the world. The aims of this study were to identify the prevalence of *czrC* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples, antibiotic susceptibility testing and determination of the sensivity of the isolates against Zinc and Cadmium by MIC method.

Methods: In this study, 24 *Staphylococcus aureus* isolated from food and clinical samples were collected and confirmed by culture in specific media and biochemical tests. Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion method and MIC test against Zinc and Cadmium was performed. Multiplex-PCR was carried out to identify *mecA* and *CrcZ* resistance genes.

Results: All of the 24 isolates were confirmed as *Staphylococcus aureus* by culture and biochemical tests. The results of Antibiogram showed the most sensivity in food samples was to teichoplanin (100%) and the most resistance was to clindamycin and azithromycin (33.3%). In clinical samples the most sensivity was to vancomycin (91.7%) and the most resistance was to methicillin (58.3%). The methicillin resistance gene and *czrC* in food samples were 16.6 and 50 percent and in clinical samples were 50 and 75 percent. MIC test results showed the minimum effect of Cadmium in food samples was 0.62 PPM and in clinical samples was 0.3 PPM. In Zinc sulphate results it was found that both food and clinical samples were sensitive to 0.07 PPM.

Conclusion: The present study shows the high prevalence of *mecA* and *czrC* in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. In addition it was shown that the antibiotic resistance in these strains is very high which is serious alarm and rapid and early diagnosis of resistant isolates is essential to prevent spread of resistance.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, *czrC*, *mecA*, Multiplex PCR

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) یک باکتری گرم مثبت است که بخشی از فلور طبیعی پوست و مجاری بینی می باشد و به عنوان دومین پاتوژن بیمارستانی محسوب می شود. این باکتری می تواند موجب طیف وسیعی از بیماری ها شامل عفونت های پوستی، مسمومیت غذایی، پنومونی، سپتی سمی، اندوکاردیت، آبسه های مغزی، انتروکولیت استافیلوکوکی و سندرم شوک سمی شود (۱). این باکتری از مهم ترین عوامل منتقله از مواد غذایی (Food Borne Diseases) می باشد که باعث ایجاد مسمومیت غذایی و گاسترو انتریت می گردد. وقوع بیماری های منتقله از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استانداردهای بالای بهداشتی نیز رو به افزایش است. تا به امروز ۲۵۰ بیماری مختلف منتقله از مواد غذایی تعریف شده و باکتری ها مسئول دو سوم شیوع این بیماریها هستند (۲). مسمومیت غذایی استافیلوکوکی در نتیجه مصرف غذای آلوده به انتروتوکسین استافیلوکوکی ایجاد می شود و اسهال و استفراغ از علائم معمول این مسمومیت هستند (۳). امروزه گسترش مقاومت

آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین مشکلات موجود در درمان این بیماری می باشد. مقاومت این باکتری به متی سیلین یک عامل نگران کننده است که در نتیجه مصرف بی رویه این آنتی بیوتیک ایجاد شده است. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*) اولین بار در یک عفونت بیمارستانی در دهه ۱۹۷۰ شناسایی شد و به سرعت در جهان گسترش یافت و امروزه یکی از معضلات عفونت های بیمارستانی می باشد. علت بروز این مقاومت وجود ژن *mecA* می باشد که وابسته به کروموزوم می باشد (۴ و ۵). کلرید روی و کادمیوم به عنوان افزودنی در مواد ضد عفونی کننده در بیمارستانها استفاده می شوند اما امروزه شیوع مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس به این دو فلز سنگین گزارش شده است. مقاومت به فلزات روی و کادمیوم توسط ژن *CZIC* کد می شود (۶). متاسفانه در مورد حضور این ژن مواد غذایی و بالینی بویژه در ایران مطالعات بسیار اندک بوده است. با توجه به گسترش روزافزون این باکتری باید به اهمیت جدا سازی آن از مواد غذایی و بالینی تاکید نمود و به این وسیله به دنبال راهکارهای جدید برای جلوگیری از شیوع، انتقال و گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و مواد ضد عفونی کننده بود. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی مقاومت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس نمونه های غذایی و بالینی به نمک های فلزات سنگین، بررسی شیوع ژنوتیپی آن از نظر حضور ژن مقاومت به کادمیوم و روی (*CZIC*) و مقاومت به متی سیلین (*mecA*) با استفاده از تکنیک PCR چندگانه، تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به روش دیسک دیفیوژن و بررسی مقاومت به فلزات سنگین به روش میکروداپلوشن MIC می باشد.

نویسنده مسئول: استادیار، گروه میکروب

شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک :

hosseinimicrobiology@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

مواد و روش ها

تعداد ۲۴ سویه/استافیلوکوکوس/اورئوس که ۱۲ نمونه مربوط به نمونه های بالینی و ۱۲ نمونه مربوط به نمونه های مواد غذایی بودند، از میان مجموع ۸۰ نمونه جمع آوری گردید. بعد از جمع آوری سویه ها، بر روی محیط های کشت بلاد آگار و مانیتول سالت آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید، سپس کلنی ها رنگ آمیزی و تست های DNase، کاتالاز، کوآگولاز انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه سویه های بالینی از بیمارانی جدا شده بود که در آنها استافیلوکوکوس/اورئوس عامل اصلی بیماری بود. آنتی بیوگرام برای جدایه های استافیلوکوکوس از طریق روش دیسک دیفوزیون بر اساس راهنمای استاندارد CSLI انجام شد (۷ و ۸). در این آزمایش حساسیت به آنتی بیوتیک های آزیترومایسین، کلیندامایسین، لینزولید، اوفلوکساسین، تیکوپلانیل، ونکومایسین، متی سیلین و دالفوپریستین/کوینوپریستین سنجیده شد. جهت بررسی اثر نمک های سولفات روی و کادمیوم با استفاده از روش تهیه رقت های سریالی (Micro dilution Broth) حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری MIC (Minimum Inhibitory Concentration) مشخص شده و سپس جهت تعیین (MBC) حداقل غلظت کشندگی باکتری (Minimum Bactericidal Concentration) علیه باکتری های مورد آزمایش از گوده های رشد یافته کشت انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری سیناژن مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط کیت انجام شد. جهت شناسایی ژنهای مقاومت به متی سیلین از پرایمر mec و مقاومت به فلزات روی و کادمیوم از پرایمر czrC استفاده شد. آزمایش در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱/۵mM کلرید منیزیم، ۲۵۰ μmol از dNTP، ۰/۴ μmol از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن های حدت و ۱/۵ واحد از Taq پلی

مراز و ۵ میکرولیتر DNA با غلظت (۱۰ نانو گرم) الگو انجام شد. شرایط سیکل حرارتی برای PCR بدین شرح بود: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل هرکدام شامل: واسرشت در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و نیز بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند، با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند و تحت نور UV مشاهده و مستند سازی شدند.

یافته ها

تمامی نمونه ها با استفاده از آزمایشات میکروبی و بیوشیمیایی به عنوان استافیلوکوکوس/اورئوس تایید گردیدند. نتایج آنتی بیوگرام نمونه ها نشان داد بیشترین حساسیت در نمونه های غذایی نسبت به تیکوپلانیل (۱۰۰٪) و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک کلیندامایسین و آزیترومایسین (۳/۳۳٪) بود. در نمونه های بالینی نیز بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ونکومایسین (۷/۹۱٪) و بیشترین مقاومت به آنتی بیوتیک متی سیلین (۳/۵۸٪) بدست آمد (جدول ۲). نتایج MIC نشان داد که کمترین غلظت تاثیر فلزات سنگین بر روی نمونه های غذایی نمک کادمیوم ppm ۰/۶۲ و در نمونه های بالینی ppm ۰/۳ بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ppm ۰/۷ حساس بوده و تفاوتی در نتایج مشاهده نشد. در مجموع میزان مقاومت به کادمیوم بیشتر از روی بوده است (جدول ۳). نتایج PCR نشان داد که میزان فراوانی ژن مقاومت به متی سیلین (mecA) در نمونه های غذایی ۱۶/۶٪ و در نمونه های بالینی ۵۰٪ بود. همچنین

میزان فراوانی ژن مقاومت به فلزات روی و کادمیوم (CzrC) در نمونه های غذایی ۵۰٪ و در نمونه های بالینی ۷۵٪ بود (شکل ۱ و ۲).

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

اندازه باند (bp)	توالی پرایمر	پرایمر	ژن
۶۶۵	5'- TAGCCACGATCATAGTCATG -3'	czrC-F	czrC
	5'- ATCCTTGTTTTCCTTAGTGACTT-3'	czrC-R	
۲۶۴	5'- GGTGAAGTAGAAATGACTGAACGT-3'	Mec-F	mecA
	5'- CAATATGTATGCTTTGGTCTTTCTGC-3'	Mec-R	

جدول ۲. میزان حساسیت سویه های استافیلوکوکس اورئوس به آنتی بیوتیکهای مختلف با روش دیسک دیفیوژن

آنتی بیوتیک	حساس (%)	حساسیت متوسط (%)	مقاوم (%)		
	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی	نمونه های بالینی
آزیترومایسین	۴۱/۷	۵۰	۲۵	۲۵	۲۵
کلیندامایسین	۵۳/۴	۵۳/۴	۸/۳	۸/۳	۳۳/۳
لینزولید	۷۵	۸۳/۴	-	-	۱۶/۶
اوفلوکساسین	۵۸/۴	۶۶/۶	۱۶/۶	-	۳۳/۳
تیکوپلانین	۱۰۰	۹۱/۷	-	۸/۳	-
ونکومایسین	۹۱/۷	۹۱/۷	۸/۳	-	-
متی سیلین	۸۳/۴	۳۳/۳	-	۸/۳	۵۸/۳
دالفوپریستین / کوینوپریستین	۶۶/۶	۶۶/۶	۱۶/۶	۲۵	۸/۳

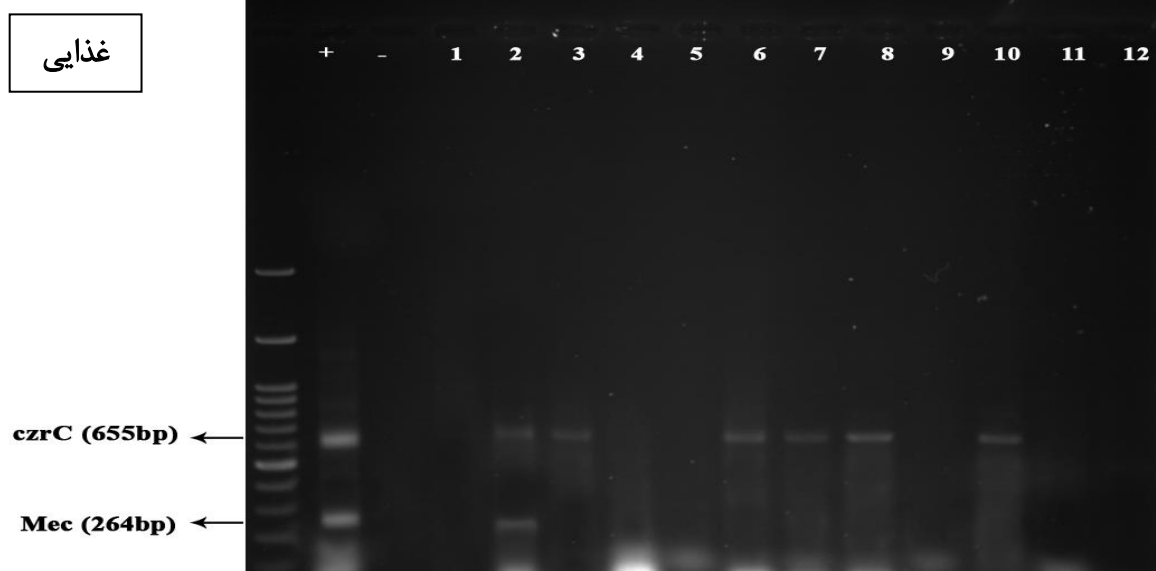
جدول ۳. نتیجه آزمون MIC نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نمک کادمیوم

شماره نمونه	میزان MIC (ppm)	میزان MBC (ppm)	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۲	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۳	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۴	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۵	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۶	۱/۲۵	۲/۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۷	۱/۲۵	۲/۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۸	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۹	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱۰	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱۱	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱۲	۰/۶۲	۱/۲۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی

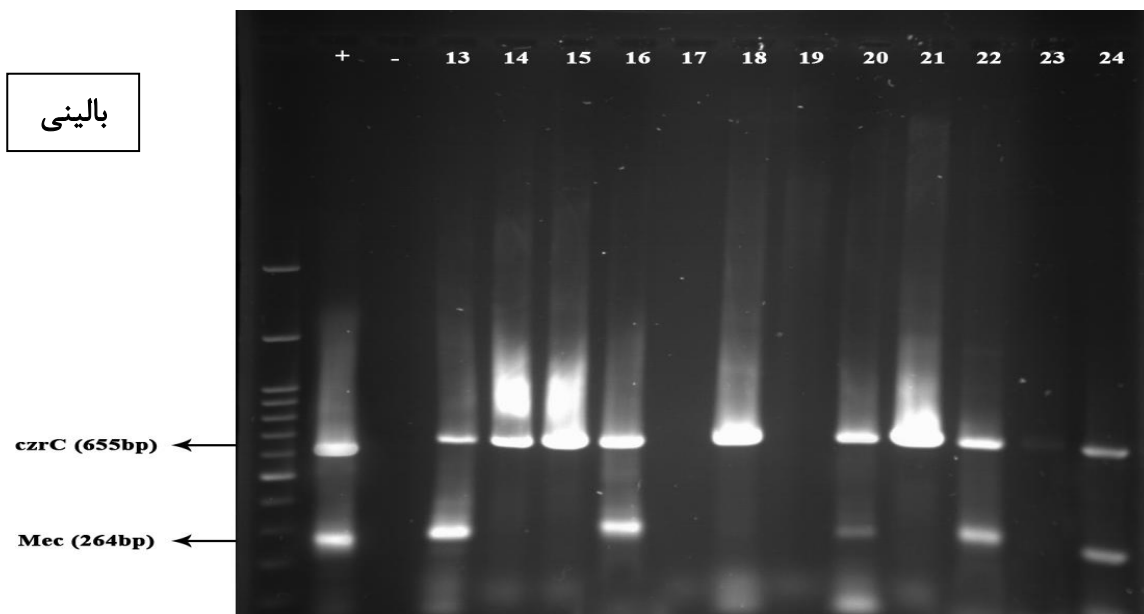
جدول ۴. نتیجه آزمون MIC نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نمک سولفات روی

شماره نمونه	میزان MIC (ppm)	میزان MBC (ppm)	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۱	۰/۰۷	۰/۱۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۲	۰/۰۷	۰/۱۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۳	۰/۱۵	۰/۳	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۴	۰/۱۵	۰/۳	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۵	۰/۰۷	۰/۱۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۶	۰/۰۷	۰/۱۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی
۷	۰/۰۷	۰/۱۵	نمونه های غذایی	نمونه های بالینی

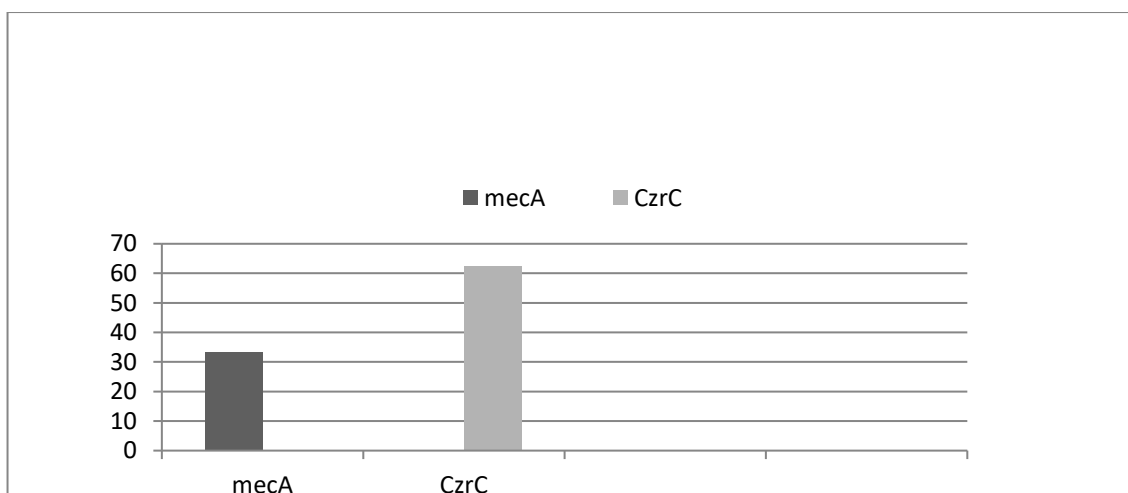
۰/۶۲	۰/۱۵	۰/۳	۰/۰۷	۸
۰/۱۵	۰/۳	۰/۰۷	۰/۱۵	۹
۰/۳	۰/۳	۰/۱۵	۰/۱۵	۱۰
۰/۳	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۷	۱۱
۰/۱۵	۰/۳	۰/۰۷	۰/۱۵	۱۲



شکل ۱. نتایج آزمون Multiplex PCR نمونه های غذایی: از سمت چپ به ترتیب Ladder 100 bp، سویه استاندارد کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه ۱ تا ۱۲ نمونه های غذایی که شماره ۲ واجد ژن *mecA* و شماره های ۲، ۳، ۶، ۷، ۸ و ۱۰ دارای ژن *CzrC* می باشند



شکل ۲. نتایج آزمون Multiplex PCR نمونه های بالینی: از سمت چپ به ترتیب Ladder 100 bp، سویه استاندارد کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه ۱۳ تا ۲۴ نمونه های انسانی که شماره ۱۳، ۱۶، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ واجد ژن *mecA* و شماره های ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۱ و ۲۴ دارای ژن *CzrC* می-باشند



شکل ۳. توزیع میانگین فراوانی ژن های *mecA* و *CzrC* در نمونه های انسانی و غذایی

نتیجه گیری

استافیلوکوکوس/اورئوس یکی از شایع ترین باکتری های جدا شده از نمونه های بالینی و مواد غذایی می باشد. مسمومیت غذایی *استافیلوکوکوس*، درصد زیادی از مسمومیت های غذایی باکتریایی را شامل می شود. طبق گزارشات، ۴۰-۱۴ درصد همه موارد بیماریهای منتقله از راه غذا را به این باکتری نسبت می دهند (۹). به جهت اهمیت حضور ژن مقاومت به متی سیلین در باکتری *استافیلوکوکوس/اورئوس* در جهت افزایش بیماریزایی و مقاومت به درمان و انتقال از راه غذا، این تحقیق با هدف شناسایی سریع ژن مقاومت به این آنتی بیوتیک و فلزات سنگین کادمیوم و روی و تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس/اورئوس* جدا شده از نمونه های مواد غذایی با روش PCR چندگانه ای انجام گردید و تمامی ایزوله ها با استفاده از پرایمرهای *mecA*, *czrC* بررسی شده و فراوانی ژن ها مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر از مجموع ۲۴ نمونه، ۱۲ نمونه از مواد غذایی و ۱۲ نمونه از منابع بالینی بود که میزان فراوانی ژن *mecA* در نمونه های بالینی ۵۰٪ و در مواد غذایی ۱۶/۶٪ بوده است. به علاوه نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه ها نشان داد میزان مقاومت در نمونه های مواد غذایی و بالینی به آنتی بیوتیکهای آزیترومایسین ۳۳/۳ و ۲۵٪، کلیندامایسین ۳۳/۳٪، لینزولید ۲۵ و ۱۶/۶٪، اوفلوکساسین ۲۵ و ۳۳/۳٪، متی سیلین ۱۶/۶ و ۵۸/۳٪ و دالفوپریستین/کوپروپرستین ۱۶/۶ و ۸/۳٪ بود. هیچ یک از جدایه های غذایی و بالینی به آنتی بیوتیکهای ونکومایسین و تیکوپلانین مقاومت نشان ندادند. میرزایی و همکاران در سال ۱۳۹۱، میزان شیوع و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی سیلین را در پنیر و کره محلی بررسی کردند. در این مطالعه از مجموع ۵۰ نمونه *استافیلوکوکوس/اورئوس* جداسازی شده، ۱۱ نمونه دارای ژن *mecA* بودند بر اساس نتایج آنتی بیوگرام ۶۰٪

نمونه ها مقاوم به متی سیلین و ۳۸٪ به ونکومایسین مقاوم بودند (۱۰). سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۸۸ در پژوهشی به جداسازی سویه های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مقاوم به متی سیلین از مواد غذایی در تهران در سه منطقه جنوب تهران، شهر ری و اسلام شهر پرداختند. در این مطالعه ۴۹ نمونه به *استافیلوکوکوس/اورئوس* آلوده بودند که از این میان ۲٪ جدا به ها مقاوم به متی سیلین و کلیندامایسین بودند (۱۱). در مطالعه رضازاده و همکاران در سال ۱۳۹۳، از ۱۰۰ نمونه *استافیلوکوکوس/اورئوس* مورد بررسی از نمونه های بالینی ۸۰٪ دارای ژن *mecA* بودند. به علاوه در این مطالعه مشخص شد شناسایی سویه های مقاوم به متی سیلین با روش PCR از حساسیت بالاتری نسبت به روش فنوتیپی برخوردار می باشد (۱۲). فرج زاده و همکاران در پژوهشی به بررسی الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس/اورئوس* های جدا شده از نمونه های بالینی بیماران بستری شده در بیمارستان های آموزشی شهر اهواز پرداختند. در این مطالعه تمامی ایزوله ها به آنتی بیوتیک های لینزولید و ونکومایسین حساس بودند. میزان مقاومت به آنتی بیوتیکهای متی سیلین و آزیترومایسین به ترتیب ۵۰ و ۶۱/۵٪ گزارش شد (۱۳). در مطالعه علیزاده و امینی در سال ۱۳۹۳ بر روی *استافیلوکوکوس/اورئوس* جدا شده از نمونه های بالینی میزان فراوانی ژن *mecA* ۵۰٪ بود. در میان آنتی بیوتیکها، مقاومت به آزیترومایسین، کلیندامایسین، لینزولید، اوفلوکساسین، متی سیلین و دالفوپریستین/کوپروپرستین به ترتیب ۳۲/۵٪، ۱۷/۵٪، ۳۵٪، ۲۷/۵٪، ۲۷/۵ و ۱۰٪ بود (۱۴). همچنین علیزاده و امینی در سال ۱۳۹۴، این آزمایش را بر روی جدایه های *استافیلوکوکوس/اورئوس* مواد غذایی انجام دادند که در این مطالعه ۵۷/۵٪ نمونه ها دارای ژن *mecA* بودند. به علاوه ۳۲٪ نمونه ها به آزیترومایسین، ۱۷٪ به کلیندامایسین، ۳۵٪

به لینزولید، ۲۷٪ به اوفلوکساسین، ۲۵٪ به متی سیلین و ۱۰٪ به دالفوپریستین/کونوپریستین مقاوم بودند (۵). Weese و همکاران در سال ۲۰۱۰، میزان آلودگی به استافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم در برابر متی سیلین در محصولات گوشت خرده فروشی را مورد بررسی قرار دادند. از مجموع نمونه های مورد بررسی ۵/۳٪ استافیلوکوکوس مقاوم به متی سیلین جداسازی شد (۱۵). در مطالعه Vola و همکاران در کشور برزیل در سال ۲۰۱۳، شیوع استافیلوکوکوس/ورئوس و میزان مقاومت به متی سیلین در عفونت های چشمی بررسی شد. در این مطالعه ۹/۹٪ سویه ها مقاومت به متی سیلین را نشان دادند (۱۶). در مطالعه حاضر ژن *czrC* در ۵۰٪ نمونه های غذایی و در ۷۵٪ نمونه های بالینی حضور داشته است. همچنین میزان مقاومت سویه ها به فلزات روی و کادمیوم با روش MIC بررسی شد. نتایج MIC نشان داد در مجموع میزان مقاومت به کادمیوم بیشتر از روی بوده است. کمترین غلظت تاثیر فلزات سنگین بر روی نمونه های غذایی نمک کادمیوم ۰/۶۲ ppm و در نمونه های بالینی ۰/۳ ppm بوده است و نمونه های انسانی نسبت به نمونه های غذایی با غلظت کمتر حساس بوده است. در نتایج نمک روی مشخص شده نمونه های غذایی و بالینی هر دو با یک غلظت ۰/۰۷ ppm حساس بوده و تفاوتی در نتایج مشاهده نشد. Panda و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی مقاومت به متی سیلین و فلزات روی و کادمیوم در استافیلوکوکوس/ورئوس بر روی ۱۴۴ نمونه بالینی جداسازی شده به روش Multiplex-PCR پرداختند. در این مطالعه ژنهای مقاومت به فلزات سنگین (*czrC*) در ۳ نمونه (۰/۲٪) و مقاومت به متی سیلین (*mecA*) در ۶ نمونه (۰/۴٪) از ایزوله ها شناسایی گردید (۶). Cavaco و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی مقاومت استافیلوکوکوس/ورئوس به فلز روی با روش MIC و PCR پرداختند. در این مطالعه ۴۷۶ نمونه استافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین از کشورهای

اروپایی مورد بررسی قرار گرفتند که از این میان ۷۳٪ نمونه ها واجد ژن *czrC* بودند که همه این نمونه ها دارای $MIC > 2mM$ بوده اند (۱۷). به علاوه در این دو مطالعه اخیر مشخص شد فراوانی ژن *czrC* در سویه های مقاوم به متی سیلین بالاست و بین میزان فراوانی این ژن و مقاومت به متی سیلین رابطه مستقیم وجود دارد که این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد. مقاومت به فلزات روی و کادمیوم در انتخاب و زنده ماندن سویه های استافیلوکوکوس/ورئوس مقاوم به متی سیلین نقش مهمی دارد (۱۷). در سال ۲۰۲۴ خاکیان و همکاران برای اولین بار در ایران به بررسی ظهور استافیلوکوک های مقاوم به فلزات سنگین در میان گونه های مقاوم به متی سیلین پرداختند. این مطالعه شامل ۳۰۰ جدایه ی استافیلوکوکی انسانی و حیوانات خانگی بوده است. PCR ژن اصلی نشان داد که تنها ۶۶/۷٪ از جدایه های MRS سگ که از نظر فنوتیپی در برابر این فلزات سنگین (کلرید روی و استات کادمیوم) مقاوم بودند، حاوی ژن *czrC* بودند. در این مطالعه مقاومت فنوتیپی به متی سیلین رابطه ی معنا داری با وجود ژن *mecA* در تمام سویه های MRS داشت. بنابراین وجود فلزات سنگین (روی و کادمیوم) در محیط زندگی استافیلوکوک ها این باکتری ها را به متی سیلین مقاوم میکند (۱۸). در سال ۲۰۱۶ Angeles Argudin و همکاران ادعا داشت که اکثر LA-MRSA ها در اروپا متعلق به کمپلکس کلونال هستند که دلیل ظهور آنها به طور کامل مشخص نیست. در این مطالعه ارزیابی وقوع ژن های مقاومت به فلز در میان مجموعه ای از استافیلوکوک های حساس به متی سیلین جدا شده از دام و غذای آنها صورت گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از این است که اکثر جدایه ها حداقل یک ژن مقاومت به فلز را داشتند. در میان این جدایه ها ژن های مقاومت به ترکیبات آرسنیک، کادمیوم، مس و ترکیب روی و کادمیوم شناسایی گردید. این مطالعه نشان میدهد که ژنهایی که به طور بالقوه مقاومت به فلز را ایجاد

دارویی و روی ممکن است به طور قابل توجهی در تداوم LA-MRSA نقش داشته باشد. گرچه LA-MRSA با منشا خوکی در حاضر بعید است که به انسان سرایت کند اما می تواند به یک مشکل بالینی منجر شود و جلوگیری از انتشار آن مستلزم استفاده ی محتاطانه از داروهای ضد میکروبی، محدود کردن مصرف روی به حداقل ماده ی مغذی مورد نیاز و انجام اقدامات بهداشتی اساسی است (۲۱). به طور کلی مطالعه حاضر نشان دهنده فراوانی بالای ژنهای *mecA* و *czfC* در سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* جداسازی شده از نمونه های مواد غذایی و بالینی می باشد. به علاوه میزان مقاومت به آنتی بیوتیکهای متی سیلین، آزیترومایسین، کلیندامایسین، اوفلوکساسین و لینزولید دارای فراوانی قابل توجهی در جدایه های مواد غذایی و بالینی می باشد. بنابر این شناسایی سریع و به موقع این مقاومتها هم به صورت فنوتیپی و هم ژنوتیپی جهت انتخاب درمان مناسب عفونتهای ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* و جلوگیری از گسترش سویه های مقاوم امری ضروری می باشد.

میکند اغلب در LA-MRSA وجود دارد (۱۹). در سال ۲۰۱۴ Nair و همکاران بررسی ای انجام دادند که هدف از این مطالعه ی انجام شده در اروپا مشاهده ی مقاومت به فلزات کمیاب مانند کلرید روی و سولفات مس در *استافیلوکوک* *اورئوس* جدا شده از دام بوده است. این مطالعه به منظور تعیین شیوع مقاومت به روی و کادمیوم به *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به متی سیلین جدا شده از ایالات متحده انجام شد. ۲۹٪ جدایه ها *czfC* مثبت بودند. در نتیجه مشاهده شد که مقاومت در برابر روی و کادمیوم ارتباط مستقیم با MRSA دارد و قرار گرفتن طولانی مدت در معرض روی در خوراک دام و کودها میتواند مقاومت در برابر یون های فلزی را افزایش دهد و از عوامل موضعی مبتنی بر روی را در درمان های عفونت های *استافیلوکوکوس اورئوس* مختل کند (۲۰). کاوانیشی و همکاران در سال ۲۰۲۴، شیوع *استافیلوکوک* های مقاوم به متی سیلین مرتبط با دام را بررسی کردند. این جدایه ها در کشتارگاه های خوک از سال ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۲ در ژاپن شناسایی شدند. این مطالعه نشان میدهد که فشار انتخاب مشترک مرتبط با مقاومت چند

Reference

1. Ghaznavi-Rad E, Nor Shamsudin M, Sekawi S, Khoon LY, Aziz MN, Hamat RA, et al. Predominance and emergence of clones of hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. JCM 2010; 48: 867-72.
2. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res. 2003; 2(1):63-76.
3. Tachbele E, Erku W, Gebre-Michael T, Ashenafi M. Cockroach-associated food-borne bacterial pathogens from some hospitals and restaurants in Addis Ababa, Ethiopia: Distribution and antibiograms. J Rural Tropic Public Health. 2006;5:34-41.
4. Besaury L, Pawlak B, Quillet L. Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions. Envir Sci Pollution Res. 2016; 23(5): 4013-23.
5. Alizadeh S, Amini K. Determining the presence of virulence genes Pantone Valentine leukocidin PVL and methicillin resistance gene *mecA* in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples by Multiplex PCR and antibiotic resistance. JFM. 2015; 2(4): 49-58.

6. Panda S, Kar S, Choudhury R, Sharma S, Singh DV. Development and evaluation of hexaplex PCR for rapid detection of methicillin, cadmium/zinc and antiseptic-resistant *staphylococci*, with simultaneous identification of PVL-positive and-negative *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *staphylococci*. FEMS microbiol lett. 2014; 352(1): 114-22.
7. Bauer A, Kirby WM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer J Clin Pathol. 1996; 45: 493-496.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2014): Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing; twenty first Informational Supplement. M100-S24. Wayne, PA: CLSI.
9. Manfreda G, Mioni R, Cesare A. Surveillance and characterization of enterotoxigenic *staphylococci* in foods of animal origin collected in the Veneto Region. Vet Res Com. 2005; 29: 331-3.
10. Mirzaei H, Javadi A, Farajli M, Shah-Mohammadi AR, Monadi AR, Barzegar A. Prevalence of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin in traditional cheese and cream: a study in city of Tabriz, Iran. J. Vet. Res. 2012; 67(1): 65-70.
11. Soltan Dallal MM, Panahi E, Saberpour F, Fazelifard P, Tabatabaei Bafroei A, Fakharian F, et al. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from food in Tehran J Microbial Bliotech. 2009; 1(2): 1-8.
12. Rezazadeh M, Yousefi Mashouf R, sarmadyan H, Ghaznavi-Rad E. Comparison of disk diffusion and "PCR" methods for determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. ISMJ. 2014; 17(3): 280-289
13. Faraj Zadeh Sheykh A, Ranjbar Y, Meghdadi H, Nazar Zadeh N, Shakori Fard R. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens taken from hospitalized patients in educational hospitals of Ahvaz city, against methicillin, vancomycin, linezolid and macrolides in 2013. Jundishapur scientific Med J. 2015; 13(4): 465-74.
14. Alizadeh S, Amini K. Identification of virulence gene Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and resistance to methicillin (*mecA*) in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens: A short report. Rafsanjan Univ Med Sci 2015; 14(5): 427-34.
15. Weese J, Avery B, Reid-Smith R. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. Lett Appl Microbiol. 2010; 51(3): 338-42.
16. Vola ME, Moriyama AS, Lisboa R, Vola MM, Hirai FE, Bispo PJM, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ocular infections. Arquivos brasileiros de oftalmologia. 2013;76(6): 350-3.
17. Cavaco LM, Hasman H, Aarestrup FM, Wagenaar JA, Graveland H, Veldman K, Mevius D, Fetsch A, Tenhagen BA, Porrero MC, Dominguez L. Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. Vet Microbiol. 2011; 150(3): 344-8.
18. Khakian M, Hashemitabar G, Askari Badouei M, Khoramian Tousi B. Phenotypic and genotypic study of resistance to Zinc and Cadmium salts in methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from humans and domestic animals. Journal of Zoonotic Diseases. 2025 Jan 1;9(1):678-89.
19. Argudín MA, Lauzat B, Kraushaar B, Alba P, Agerso Y, Cavaco L, Butaye P, Porrero

- MC, Battisti A, Tenhagen BA, Fetsch A. Heavy metal and disinfectant resistance genes among livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2016 Aug 15;191:88-95.
20. Nair R, Thapaliya D, Su Y, Smith TC. Resistance to zinc and cadmium in *Staphylococcus aureus* of human and animal origin. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2014 Oct;35(S3):S32-9.
21. Kawanishi M, Matsuda M, Abo H, Ozawa M, Hosoi Y, Hiraoka Y, Harada S, Kumakawa M, Sekiguchi H. Prevalence and genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from pigs in Japan. *Antibiotics*. 2024 Feb 4;13(2):155.

بررسی و مقایسه تاثیرات ضد میکروبی و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و
کشندگی عصاره هیدروالکلی گیاهان دارویی دانه اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ
رزماری بر علیه باکتری های باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه،
استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی

زهرا فتحی^{۱*}، هادی سعیدی^۲

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده

مقدمه: داروهای گیاهی طی قرن های متمادی جهت درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار گرفته اند و امروزه نیز با وجود پیشرفت علم و توسعه کاربرد داروهای شیمیایی و سنتزی، هنوز گیاهان دارویی در مقیاس وسیع مورد استفاده قرار می گیرند. کشور ایران به علت تنوع آب و هوایی دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی است که پایه و اساس طب سنتی کشور می باشد. در این مطالعه به بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره ی هیدروالکلی گیاهان دارویی دانه اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ رزماری و بازدارندگی و کشندگی آن ها بر علیه باکتری های باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیا کلی پرداخته شده است.

مواد و روش ها: بدین منظور در ابتدا حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره ها با تاثیر رقت های مختلف عصاره بر باکتری های مذکور در محیط BHI مایع سنجیده شد و بررسی اثرات ضد میکروبی با اندازه گیری هاله عدم رشد ناشی انتشار عصاره گیاهی از چاهک تکمیل گردید.

یافته ها: بر مبنای نتایج بدست آمده غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره هیدروالکلی دانه اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ رزماری بر علیه باکتری های باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به ترتیب برابر با غلظت های ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، ۲۵، ۲۰۰، ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، ۱۲/۵، ۲۵، ۱۰۰ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد.

نتیجه گیری: این نتایج حاکی از پتانسیل بالای گیاهان دارویی دانه اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ رزماری در توسعه روش های جدید درمانی و کاهش استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت ها است و می تواند به عنوان یک آغاز برای تحقیقات اختصاصی تر در زمینه خواص ضدباکتریایی این گیاهان دارویی و کاربردهای بالینی آن ها در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اثرات ضدباکتریایی، عصاره ی هیدروالکلی دانه اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ رزماری

Investigating and comparing the antimicrobial effects and determining the minimum concentration of inhibitory and bactericidal effect of the hydroalcoholic extract of *Peganum harmala*, *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, and *Salvia rosmarinus* against *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* bacteria

Zahra Fathi^{1*}, Hadi Saeidi²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran,

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran,

Abstract

Introduction: Herbal medicines have been used for many centuries to treat various diseases, and even today, despite the progress of science and the development of the use of chemical and synthetic drugs, medicinal plants are still widely used. Due to the variety of climate, Iran has a wide range of medicinal plants that are the basis of the country's traditional medicine. In this study, the antibacterial effects of hydroalcoholic extracts of *Peganum harmala*, *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, and *Salvia rosmarinus* and their inhibition and lethality against *Bacillus cereus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* bacteria have been investigated.

Materials and Methods: For this purpose, at first, the minimum inhibitory concentration and the minimum lethal concentration of the extracts were measured with the effect of different dilutions of the extract on the mentioned bacteria in aliquid BHI environment, and the antimicrobial effects were investigated by measuring the halo of non-growth caused by the release of plant extract from The well was completed.

Results: Based on the results obtained, the inhibitory concentration (MIC) of hydroalcoholic extracts of pecan seeds, fennel, cumin, and rosemary leaves against the bacteria *Peganum harmala*, *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, and *Salvia rosmarinus* are respectively equal to 12.5 concentrations. 12.5, 25 and 12.5 mg/ml, 25, 200, 25, and 100 mg/ml, 12.5, 25, 100, and 25 mg/ml, and 12.5, 25, 50, and 12.5 mg/ml were reported.

Conclusion: These results indicate the high potential of *Peganum harmala*, *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, and *Salvia rosmarinus* medicinal plants in developing new treatment methods and reducing the use of antibiotics in the treatment of infections, and can be used as a starting point for more specific research in the field of antibacterial properties of these medicinal plants and clinical applications. They will be used in the future.

Keywords: Antibacterial effects, Hydroalcoholic extract of *Peganum harmala*, *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, and *Salvia rosmarinus*.

مقدمه

با وجود اینکه امروزه بخش عظیمی از داروهای مصرفی، شیمیایی هستند اما تخمین زده می‌شود که دست‌کم یک‌سوم کلیه فرآورده‌های دارویی یا منشا گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه، تغییر شکل یافته‌اند و همچنین استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها همچنان ادامه دارد (۱). پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یک مشکل مهم در مراقبت‌های بهداشتی مطرح می‌باشد. این ویژگی، منجر به گسترش پاتوژن‌های میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده است (۲). علاوه بر این، روند استفاده از نگهدارنده‌ها در مواد غذایی و آگاهی مردم از اثرات سوء این ترکیبات سبب شده است تا کارخانجات تولید و بسته‌بندی مواد غذایی گرایش جدی به استفاده از گیاهان دارویی و معطر برای افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی پیدا کنند (۵-۳). بنابراین باید یک جایگزین غیرشیمیایی کارآمد برای آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی پیدا کرد. گیاهان دارویی شامل انواع مختلفی از مجموعه گیاهان هستند که برخی از آن‌ها دارای فعالیت‌های دارویی و ضد میکروبی می‌باشند. این گیاهان نیز سرشار از متابولیت‌های ثانویه‌ای می‌باشند که برای سنتز و توسعه داروها و نیز درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). اسپند با نام علمی *Peganum harmala*

هارمالا (*Peganum harmala*) گیاهی است علفی و پایا از خانواده زیگوفیللاسه (*Zygophyllaceae*) که این گیاه، بومی مناطق خشک مدیترانه شرقی تا شمال هند می‌باشد (۷). ترکیبات فعال اسپند آلکالوئیدها هستند که شامل بتاکاربولین‌ها (هارمالین و هارمین) و مشتقات کینازولینی (وسی‌سین و وسی‌سینون) می‌باشند. بیش از ۶۰٪ آلکالوئیدهای موجود در دانه را بتاکاربولین‌ها تشکیل می‌دهند (۸ و ۹). رزماری یکی از گیاهان دارویی می‌باشد که قابلیت زیادی در تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی دارد. گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از خانواده نعنائیان (لامیاسه) (*Lamiaceae*) می‌باشد. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضد سرطانی این گیاه به‌خوبی شناخته شده است (۱۱ و ۱۰). عصاره الکلی رزماری شامل ترکیبات فنولیک مانند کارنوزول، کارنوزیک اسید، رزمارینیک اسید و رزمانول می‌باشد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند (۱۲). زیره‌سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* گیاهی است ارزنده که کاربردهای فراوانی در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی دارد. زیره‌سبز حاوی تانن، روغن زرین و اسانس می‌باشد. ترکیبات موثر اسانس کارون، فلاندرن، کومینول و سمین هستند. کومینول، آلدئیدی است که مسئول آرومای خاص زیره است و مقدار آن بسته به محل کشت زیره بین ۳۰ تا ۵۰٪ است. خواص درمانی آن مشابه زیره‌سیاه و انیسون است. برخی از خواص دارویی زیره‌سبز عبارتند از: درمان عفونت حاد و مزمن برونشیت، ضد نفخ، مقوی معده، ضد تشنج و صرع، مدر و بادشکن، قاعده‌آور و معرق (۱۳). رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare mill* از تیره جعفری می‌باشد که معطر و چند ساله به‌حالت وحشی به ارتفاع ۱ تا ۲ متر و دارای برگ‌های با پهنک تقسیم شده به قطعات نازک و نخی شکل است

نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست شناسی،

دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

آدرس الکترونیک:

z.fathi@maragheh.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

(۱۴). بیشترین استفاده از ریشه، برگ و میوه آن است ولی معمولاً کلیه بخش‌های گیاه مفید می‌باشد. میوه گیاه فوق‌الذکر، حاوی ۱۰ تا ۱۲٪ ماده روغنی، کمی هم ماده قندی موسیلاژ و اسانس در لپه‌های دانه می‌باشد و دارای اثرهای فنی است که عامل اصلی خاصیت دارویی آن محسوب می‌شوند. ترکیب‌های شاخص این گیاه ترانس آنتول، لیمون و فنچون است. گیاه رازیانه بهترین مورد برای استخراج ترنس آنتول می‌باشد (۱۵). *باسیلیوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) یکی از مهم‌ترین بیماری‌زاهای مواد غذایی مختلف هم‌چون لبنیات، مواد گوشتی، غلات و از جمله برنج است. این باکتری منجر به دو نوع مختلف مسمومیت غذایی یعنی نوع اسهالی و تهوع در انسان می‌شود. اسپوره‌های این باکتری حتی پس از پختن در غذا باقی می‌مانند و در صورتی که مواد غذایی در شرایط گرم و مرطوب نگهداری شود، اسپور جوانه زده و نوعی سم روده‌ای (انترتوکسین) تولید می‌کند که منجر به مسمومیت غذایی می‌شود (۱۶-۱۸). *استرپتوکوکوس پنومونیه* (پنوموکوک) (*Streptococcus pneumoniae*)، در دستگاه تنفسی فوقانی ۴۰-۵٪ افراد سالم وجود دارد و عامل بروز مننژیت، پنومونی، سپتی‌سمی، عفونت گوش میانی، باکتری، سینوزیت، برونشیت و سایر پروسه‌های عفونی معرفی شده می‌باشد (۱۹ و ۲۰). باکتری ناشی از پنومونی نیز می‌تواند منجر به عفونت‌های شدیدتری مانند مننژیت، اندوکاردیت و آرتريت عفونی شود (۱۹). *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) یکی از عوامل پیش‌رو در ایجاد عفونت‌های باکتریایی در کشورهای در حال توسعه بوده که می‌تواند منجر به طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسانی و حیوانی از یک عفونت کوچک پوستی تا ذات‌الریه کشنده شود (۲۱ و ۲۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان علت اصلی بسیاری از عفونت‌های کسب شده از جامعه و بیمارستان شناخته می‌شود. این باکتری از یک سو، قادر به

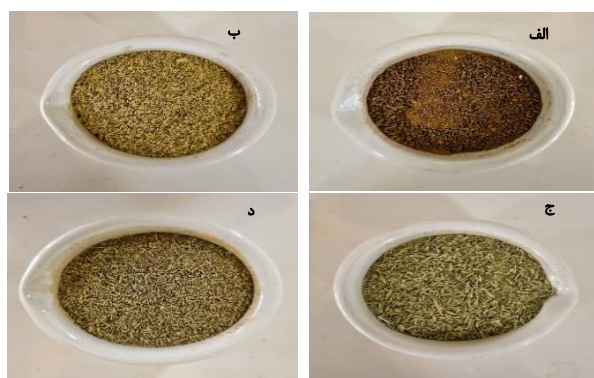
استقرار در پوست و بخش خلفی بینی افراد جامعه و پرسنل بیمارستانی بوده و توسط طیف وسیعی از افراد جامعه حمل می‌گردد (۲۳ و ۲۴). از سویی دیگر، می‌توانند بر روی سطوح خشک نیز زندگی کنند. بنابراین، تماس با وسایل شخصی مانند لباس آلوده و یا وسایل خواب موجب انتقال آن به افراد حساس خواهد شد (۲۵). *اشرشیا کلی* (*Escherichia coli*) باکتری معمول موجود در دستگاه گوارش پرندگان و پستانداران می‌باشد که سویه‌ی بیماری‌زای آن در بیماری‌های گوارشی انسان و دام‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این باکتری همچنین می‌تواند عامل بیماری تنفسی در طیور شود که قادر به ایجاد تلفات قابل ملاحظه‌ای با بروز سپتی‌سمی و عوارض عمومی است (۲۶-۲۸). از طرفی *اشرشیا کلی* منجر به اسهال گوساله‌ها می‌شود که از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که باعث خسارات اقتصادی فراوانی در گاو‌داری‌ها می‌گردد (۲۹). هدف از این مطالعه تعیین و مقایسه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های الکلی گیاهان دارویی پرکاربرد در طب سنتی با طیف گسترده اثرات ضد میکروبی شامل: دانه اسپند، رزماری، زیره سبز و رازیانه و همچنین تخمین حداقل غلظت کشندگی این عصاره‌ها بر علیه باکتری‌های *باسیلیوس سرئوس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*، به عنوان باکتری‌های شاخص و به ترتیب نماینده‌ای از گروه‌های باکتری‌های باسیلی گرم مثبت، کوکسی‌های گرم مثبت کلتالاز مثبت و منفی و باسیل‌های گرم منفی، می‌باشد، تا بر مبنای نتایج این آزمایش، موثرترین عصاره الکلی به عنوان ماده ضد میکروبی تعیین شود.

مواد و روش‌ها

نمونه های گیاهی

به منظور تهیه عصاره گیاهی، ابتدا دانه‌های اسپند، رازیانه، زیره سبز و برگ رزماری جمع‌آوری و پس از اینکه به صورت

کامل خشک شدند، توسط آسیاب برقی کاملاً پودر گردیدند که در شکل ۱ پودر نمونه‌های گیاهی آورده شده است.



شکل ۱. نمونه‌های گیاهی (الف) دانه اسپند، (ب) برگ رازیانه، (ج) دانه زیره سبز و (د) برگ رزماری

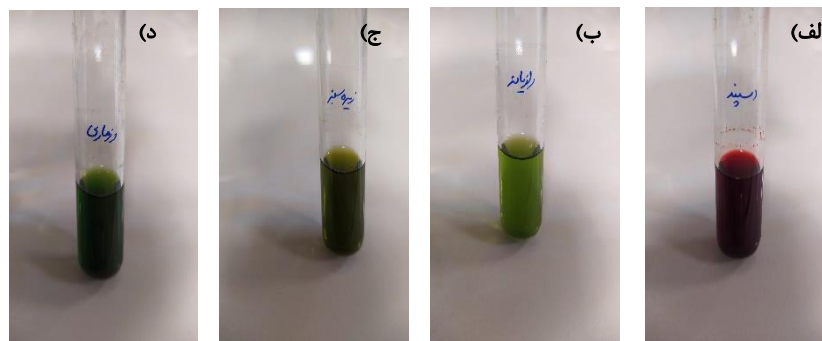
سویه‌های میکروبی

در این تحقیق از سویه‌های استاندارد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *استرپتوکوکوس پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی* جهت بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های الکلی استفاده شدند.

تهیه‌ی عصاره الکلی

جهت تهیه عصاره الکلی گیاهان مذکور، ۲۰ گرم از پودرهای تهیه شده دانه اسپند، برگ رازیانه، دانه زیره سبز و برگ رزماری توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ به مدت ۷۲ ساعت خیسانیده شد و در نهایت در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد)

و به دور از نور عمل فیلتراسیون با عبور از صافی واتمن ۴۲ روی عصاره صورت گرفت. عصاره حاصل جهت تغلیظ در دستگاه روتاری قرار داده شد و حجم نهایی عصاره‌های در انتهای روند تغلیظ به ۵ میلی‌لیتر کاهش یافت. در شکل ۲ عصاره‌های الکلی گیاهان استفاده شده نشان داده شده است. بدین صورت که غلظت نهایی عصاره حاصل پس از تغلیظ معادل عصاره‌ی 0.2 ± 4 گرم از گیاهان مورد استفاده در هر میلی‌لیتر نمونه تغلیظ شده رسید. عصاره استخراج شده در شیشه درب آبی استریل ریخته و تا زمان بررسی به‌منظور جلوگیری از اثر با نور با پوشش ورق آلومینیومی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد (۳۰).



شکل ۲. عصاره‌های الکلی (الف) دانه اسپند، (ب) برگ رازیانه، (ج) دانه زیره سبز و (د) برگ رزماری

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره های الکلی

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)

(Minimum Inhibitory Concentration)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت لوله ای تعیین گردید. در ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با کدورت ۰/۵ مک فارلند در محیط BHI برات (مرک، آلمان) تهیه شد (۳۰). برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره از ۸ سری لوله های آزمایش با ۳ تکرار جهت کاهش خطای نتایج استفاده شد. ۶ سری از لوله ها برای آزمایش رقت های متفاوت عصاره و یک سری از لوله به عنوان کنترل مثبت و یک سری از لوله ها به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. عصاره با رقت های مختلف از لوله شماره یک به غلظت ۱۲/۵ میلی-گرم بر میلی لیتر تا لوله شماره پنج به غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط کشت BHI برات به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی که دارای CFU/ml $10^8 \times 1/5$ باکتری بود، آماده گردید. یک لوله حاوی ۴/۵ میلی لیتر محیط کشت به علاوه ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره و ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی و نیز یک لوله حاوی ۴/۵ میلی لیتر محیط کشت به علاوه ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به عنوان کنترل مثبت تهیه شد و حجم محیط هر لوله با آب مقطر استریل به ۵ میلی لیتر رسید. همه لوله های آزمایش برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در آن کدورت حاصل از رشد باکتری مشاهده نشد، این غلظت به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی آن ماده در نظر گرفته شد. این روش برای عصاره و سویه میکروبی مورد آزمایش در ۳ تکرار انجام شد (۳۰).

بررسی حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی

(MBC)

(Minimum Bactericidal Concentration)

حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی (MBC) با استفاده از روش رقت لوله ای تعیین گردید. برای تعیین MBC از همه لوله هایی که در آن ها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود، نمونه برداری و جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره به روش پورپلیت کشت داده شدند. بدین جهت ۰/۱ میلی لیتر از هر لوله با ۲۰ میلی لیتر از مخلوط BHI آگار با درجه حرارت حدود ۳۷ درجه سانتی گراد در ظروف پتری دیش مخلوط و پس از بسته شدن آگار و انکوبه کردن به مدت ۲۴ ساعت، پلیت های کشت داده شده از نظر وجود رشد میکروبی کنترل شدند. لوله ای که حاوی کمترین غلظت عصاره بود و در پلیت مربوطه عدم رشد باکتری مشاهده گردید، این غلظت به عنوان حداقل غلظت کشندگی آن ماده در نظر گرفته شد (۳۰).

بررسی تشکیل هاله عدم رشد بر مبنای انتشار چاهکی در آگار

برای بررسی اثر ضد میکروبی رقت های مختلف عصاره الکلی گیاهان مذکور، از آزمون تعیین تشکیل هاله عدم رشد بر مبنای انتشار چاهکی در آگار استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط BHI آگار تهیه شد و به ضخامت ۵-۴ میلی متر در پلیت ها تقسیم گردید. سپس چاهک هایی به قطر تقریبی ۵ میلی متر در پلیت ها حفر شد (۳۱). کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون باکتری با غلظت $10^8 \times 1/5$ باکتری در هر میلی لیتر با استفاده از استاندارد محلول مک فارلند از باکتری های استاندارد باسیلوس سرئوس، استرپتوکوک پنومونیه، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس تهیه شد و بر روی محیط BHI آگار کشت چمنی تهیه شد. سپس درون چاهک ها از رقت های ۱:۲، ۱:۴ تا ۱:۳۲ عصاره الکلی گیاه مورد نظر به مقدار 50 ± 1 میکرولیتر پر گردید (این آزمایش با سه بار تکرار انجام گردید). محیط های کشت، به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در نهایت قطر هاله عدم رشد باکتری ها بر روی پلیت در اطراف چاهک ها اندازه گیری و میانگین قطر هاله مربوطه گزارش گردید (۳۰).

روش های آماری

بررسی‌های مربوط به تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و بررسی حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی و قطر هاله بر مبنای روش‌های ذکر شده انجام گردید و در نهایت اطلاعات به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به‌منظور بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌های کدورت ناشی از رشد باکتریایی و قطر هاله عدم رشد، از تست تکمیلی دانکن در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد. همچنین جهت بررسی رابطه بین میزان غلظت‌های مختلف عصاره و تاثیرگذاری آن‌ها نیز همبستگی بین این دو پارامتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی

پس از تغلیظ عصاره‌های الکلی دانه اسپند، برگ رازیانه، دانه زیره سبز و برگ رزماری در دستگاه روتاری در نهایت به‌ترتیب به ۵ میلی‌لیتر عصاره غلیظ به‌دست آمد و در تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به‌روش سریال رقتی و روش انشار چاهکی در پلیت مورد استفاده قرار گرفت. میانگین وزن خشک عصاره‌های الکلی فوق به میزان 4 ± 0.2 گرم گیاه در میلی‌لیتر رسید که باتوجه به این مقدار جهت بیان رقت‌های مختلف عصاره، میزان این عصاره به پارامترهای وزنی تبدیل شدند. در جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی‌های حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌ها در مقابل گونه‌های باکتریایی مدنظر نشان دادند که بین گیاهان مختلف از نظر حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی تفاوت معناداری وجود دارد.

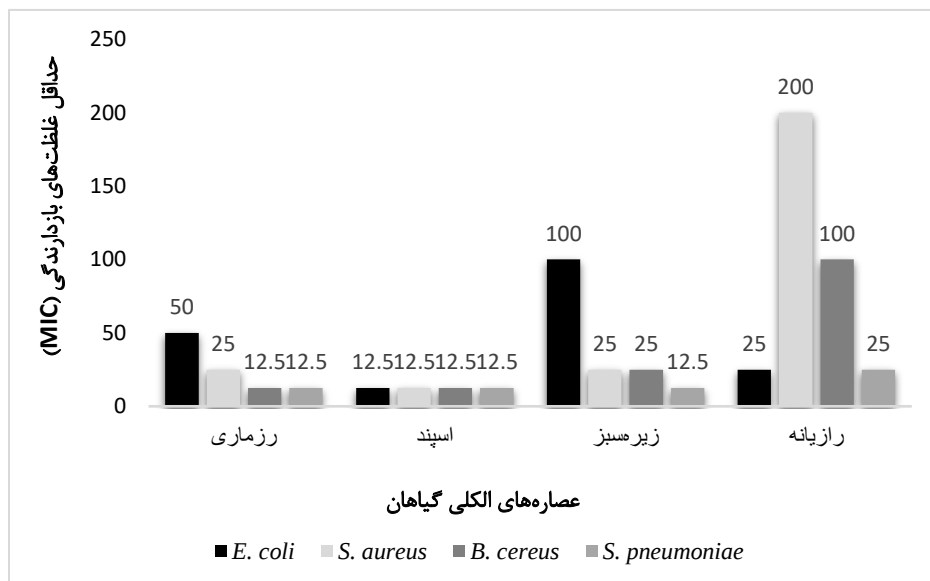
جدول ۱. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) (برحسب mg/ml) عصاره الکلی دانه اسپند، برگ رازیانه، دانه زیره سبز و برگ رزماری بر روی باکتری‌های منتخب

<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. pneumoniae</i>		سویه‌های باکتریایی
MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	عصاره‌های الکلی
۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۵۰	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۲۵	اسپند
۱۰۰	۲۰۰	۲۵	۵۰	۲۰۰	۴۰۰	۲۵	۲۵	رازیانه
۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	زیره سبز
۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۵	۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵	رزماری

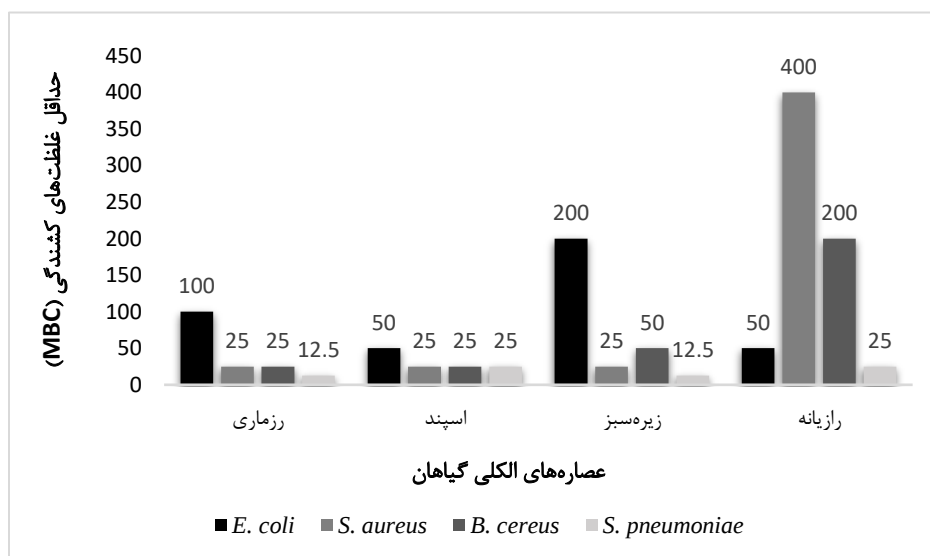
استرپتوکوک پنومونیه نشان داد. برای عصاره زیره سبز غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به مهار رشد و غلظت‌های ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مرگ سویه‌های /استافیلوکوکوس/اورئوس منجر شد. همچنین عصاره الکلی رزماری در غلظت‌های ۱۲.۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب باعث مهار رشد و مرگ سویه‌های باسیلوس سرئوس شد و این رقت‌ها به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) این عصاره الکلی بر علیه

عصاره‌های الکلی گیاهی و همچنین رقت‌های مختلف از هر عصاره تاثیرات متفاوتی بر روی سویه‌های باکتریایی مختلف نشان دادند. بدین صورت که عصاره الکلی اسپند بهترین عملکرد خود را در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مهار رشد و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مرگ باسیلوس سرئوس داشت. عصاره الکلی رازیانه بهترین عملکرد خود را در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ممانعت از رشد و در رقت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مرگ سویه‌های

باکتری مذکور تعیین شد. نتایج ذکر شده در جدول ۱ و شکل های ۳ و ۴ آورده شده است.



شکل ۳. نمودار بررسی کمترین غلظت بازدارندگی عصاره های مختلف (MIC) بر سویه های باکتریایی مورد آزمایش



شکل ۴. نمودار بررسی کمترین غلظت کشندگی عصاره های مختلف (MBC) بر سویه های باکتریایی مورد آزمایش

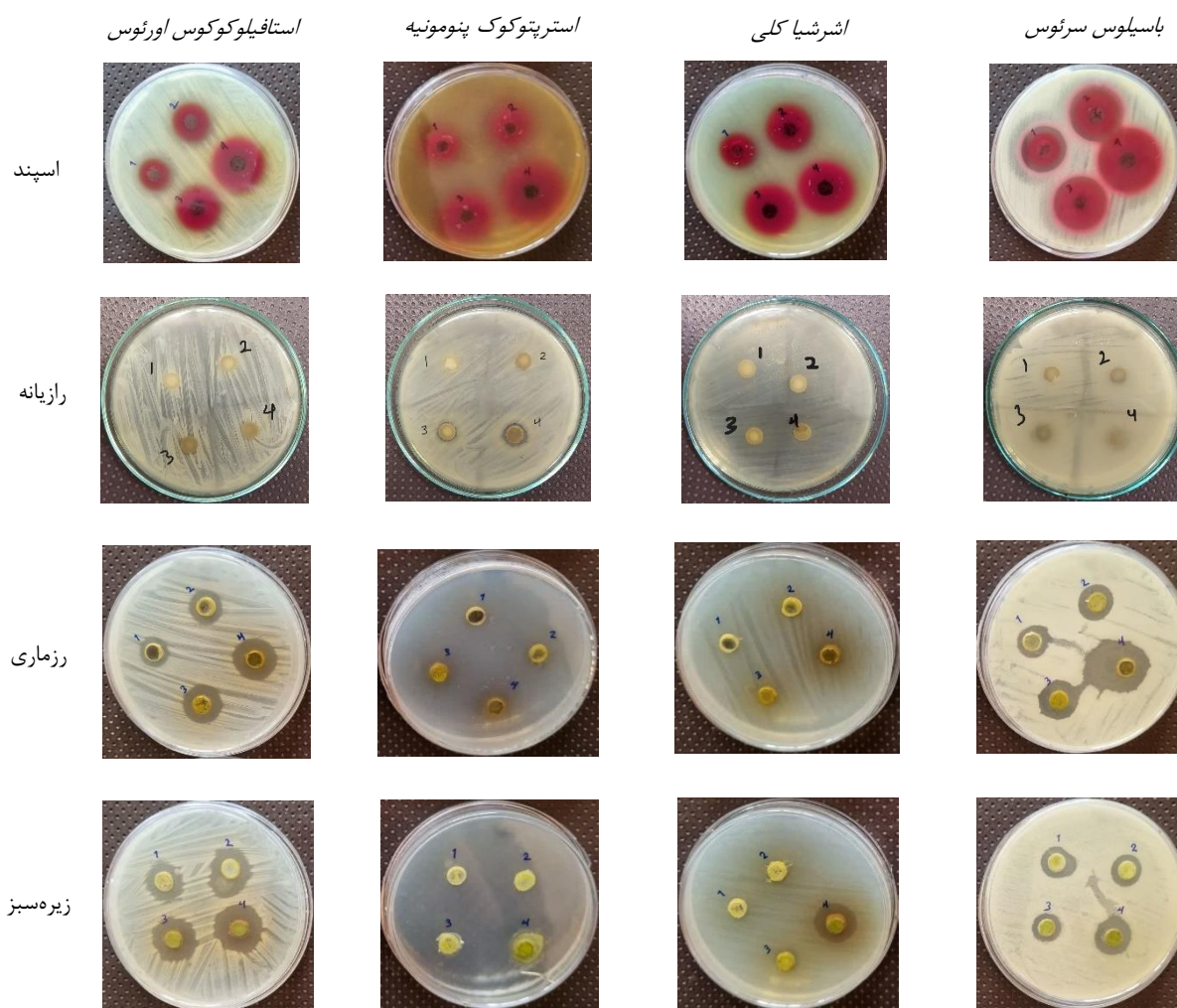
بررسی قطر هاله عدم رشد

پس از گذشتن ۲۴ ساعت از کشت باکتری‌های مورد نظر و طی شدن دوره گرماگذاری، قطر هاله عدم رشد ناشی از تاثیر عصاره‌های الکلی گیاهان مورد نظر بر روی رشد سویه‌های باکتریایی سنجیده شد. قطر هاله‌های عدم رشد برحسب میلی‌متر در جدول ۲ گزارش شده است. در شکل ۶ نتایج هاله‌های عدم رشد ناشی از تاثیرات عصاره‌های الکلی بر روی سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش نشان داده شد. نتایج حاصل از بررسی قطر هاله عدم رشد سویه‌های باکتریایی با بررسی و آنالیز آماری قطر هاله‌های عدم رشد توسط نرم افزار SPSS برای هر کدام از سویه‌های مدنظر تاثیرگذارترین عصاره برگزیده شد.

با بررسی نتایج آماری حاصل از نرم افزار SPSS متوجه می‌شویم که برای سویه‌ی /شرشیا کلی عصاره‌های الکلی اسپند و رازیانه به یک سطح تاثیرگذار هستند و اختلاف معنی داری بین آن‌ها وجود ندارد ($p\text{-value} > 0.05$) و تاثیرگذارتر از دو عصاره دیگر هستند. عصاره الکلی رزماری برای سویه باسیلوس سرئوس به عنوان تاثیرگذارترین عصاره برگزیده شد چرا که از لحاظ آماری نیز اختلاف معناداری با دیگر عصاره‌های تحت بررسی از خود نشان داد ($p\text{-value} < 0.05$). هر سه عصاره الکلی اسپند، رزماری و زیره سبز در یک سطح معناداری بر سویه‌ی /استافیلوکوکوس /ورئوس تاثیرگذار بودند و تفاوت معناداری میان آن‌ها مشاهده نشد ($p\text{-value} > 0.05$). در مورد سویه‌ی /ستریپتوکوک پنومونیه نیز دو عصاره‌ی الکلی رزماری و زیره سبز در یک سطح معنادار و بیشتر از دو عصاره دیگر بر سویه‌ی مذکور تاثیرگذار بودند ($p\text{-value} > 0.05$).

جدول ۲. قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر برای غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی دانه اسپند، برگ رازیانه، دانه زیره سبز و برگ رزماری

وزن عصاره گیاهی (میلی گرم)	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	سویه عصاره
۴۰۰	۲۴	۱۷	۱۹	۲۰	عصاره اسپند
۲۰۰	۲۰	۱۶	۱۶	۱۷	
۱۰۰	۱۹	۱۴	۱۵	۱۵	
۵۰	۱۷	۱۰	۱۲	۱۲	
۴۰۰	۶	۵	۵	۷	عصاره رازیانه
۲۰۰	۶	۵	۵	۶	
۱۰۰	۵	۵	۵	۵	
۵۰	۵	۵	۵	۵	
۴۰۰	۱۹	۸	۹	۵	عصاره زیره سبز
۲۰۰	۱۱	۷	۷	۵	
۱۰۰	۱۱	۷	۷	۵	
۵۰	۱۰	۵	۵	۵	
۴۰۰	۱۲	۱۲	۱۶	۶	عصاره رزماری
۲۰۰	۹	۷	۱۴	۶	
۱۰۰	۹	۶	۱۳	۵	
۵۰	۹	۵	۱۲	۵	



شکل ۶. بررسی نتایج هاله عدم رشد ناشی از تاثیرات عصاره های الکلی گیاهان بر روی سویه های باکتریایی مورد آزمایش

و مشتقات آن‌ها به منظور استفاده های درمانی و مکمل های درمانی در بیماری های مختلف شده است زیرا مشخص شده برخی از گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکروبی تولید می کنند و می توانند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک ها باشند (۳۳). گیاهان دارویی دارای خواص مفیدی هستند که از جمله می توان به خاصیت ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد (۳۴). بعضی از گیاهان تاثیراتی همانند داروهای شیمیایی و گاهی به مراتب بیشتر از آن ها دارند. به طور کلی فراورده های گیاهی باعث گرانبه شدن سیتوپلاسم، گسیختگی غشاء سیتوپلاسمی، غیر فعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم های درون سلولی و برون سلولی و متلاشی شدن دیواره سلولی می شود (۳۵). مکانیسم ضد میکروبی احتمالا حاصل ترکیباتی مانند فلاونوئیدها و

در روش انتشار چاهکی در آگار، عصاره الکلی اسپند با دارا بودن بیشترین هاله عدم رشد بر تمامی سویه های مورد آزمایش، با اختلاف معناداری ($p\text{-value} < 0.05$) به عنوان تاثیر گذارترین عصاره برگزیده شد. همچنین اختلاف موجود بین عصاره برگزیده شده از طریق بررسی هاله عدم رشد و میزان MIC و MBC از لحاظ آماری معنا دار هستند ($p\text{-value} < 0.05$) و همبستگی بین دو روش فوق وجود ندارد.

نتیجه گیری

ترکیبات طبیعی گیاهی منبع مهمی از ترکیبات دارویی جدید و مؤثر هستند (۳۲). گیاهان دارویی از جمله ترکیبات طبیعی گیاهی هستند که در طب سنتی و مصارف صنعتی و خوراکی کاربردهای گسترده دارند. امروزه توجه خاصی به این گیاهان

فلاونول ها از طریق واکنش با گروه های سولفیدریل یا واکنش - های غیراختصاصی با پروتئین های میکروبی مانند پروتئین - های خارج سلولی و تشکیل کمپلکس با دیواره سلولی و یا ایجاد اختلال در غشاء سلول میکروارگانیسم ها است (۳۶). اثرات ضد میکروبی ساختارهای فنولی در مطالعات اخیر ثابت شده است و همچنین مشاهده گردیده که قدرت ضد میکروبی آن ها به محل و تعداد گروه های هیدروکسیل روی حلقه فنولی بستگی دارد (۳۷). در نتایج حاصل از این مطالعه پایین ترین غلظت بازدارندگی (MIC) با میزان ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای عصاره های اسپند در تاثیر بر هر چهار سویه باکتریایی، عصاره رزماری در تاثیر بر باکتری های *باسیلوس سرئوس* و *استرپتوکوک پنومونیه* و همچنین عصاره زیره سبز در تاثیر بر *استرپتوکوک پنومونیه*، همچنین بالاترین مقاومت به بازدارندگی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با میزان ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با عصاره رازیانه بدست آمد. در ادامه پایین ترین غلظت کشندگی (MBC) با میزان ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای عصاره های رزماری و زیره سبز در مورد تاثیر بر باکتری *استرپتوکوک پنومونیه* و بالاترین مقاومت به کشندگی در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با عصاره رازیانه مشاهده شد. بررسی قطر هاله های عدم رشد باکتریایی نیز ثابت کرد که عصاره اسپند بر هر چهار سویه باکتریایی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۲ میلی متر و پس از آن نیز عصاره زیره سبز با قطر ۱۹ میلی متر بر باکتری *باسیلوس سرئوس* دارای بیشترین اثربخشی بوده است. در مقابل، کوچکترین هاله های عدم رشد را که ناشی از مقاوم بودن باکتری های مذکور به عصاره مورد نظر بود در تاثیر عصاره های رازیانه بر سویه های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس*، زیره سبز بر سویه *استرپتوکوک پنومونیه* و همچنین رزماری نیز به ترتیب بر سویه های *اشرشیا کلی* و *استرپتوکوک پنومونیه* مشاهده گردید. از بررسی نتایج هاله های عدم رشد نتیجه گیری می شود که سویه *استرپتوکوک پنومونیه* مقاوم ترین سویه باکتریایی در مقابل عصاره های رازیانه، زیره سبز و رزماری می باشد. دانه گیاه اسپند با وجود ترکیبات موثری چون آلکالوئیدهای هارمالین، هارمین و هارمالول به - عنوان یک گیاه با خواص درمانی از قدیم تاکنون مورد توجه

قرار گرفته است. از جمله می توان خواص ضد التهابی ماده پیتولین به دست آمده از دانه اسپند اشاره کرد که توسط آل - رافعی مطالعه شده است. وی اثرات ضد باکتری، ضد قارچی، ضد تبزایی و ضد انگلی عصاره اسپند را اثبات نمود (۳۸). اثرات ضد باکتری و ضد قارچی هارمالین توسط عبدالفتاح گزارش شده است (۳۹). ناه در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای به بررسی اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی آلکالوئیدهای بتا - کاربولین گیاه اسپند پرداخت و دریافت که هارمان موجود در اسپند دارای بیشترین فعالیت ضد باکتریایی می باشد (۴۰). بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین قطر هاله عدم رشد حاصل از تأثیر عصاره الکلی اسپند بود، به این ترتیب که قطر هاله عدم رشد حاصل از تاثیر این عصاره بر روی باکتری گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* به اندازه ۲۴ میلی متر بود در صورتی که به روی باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* به قطر هاله ۱۹ میلی متر گزارش گردید همچنین با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد باکتری ها به صورت معنی داری ($p < 0.05$) افزایش می یابد. عصاره گیاه اسپند دارای بازدارندگی رشد و اثر کشندگی بیشتری روی باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی می باشد. داراب پور و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ در مطالعه به بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره اسپند علیه چند باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک پرداختند و دریافتند که عصاره متانولی اسپند دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد (۴۱). همچنین بر اساس نتایج این مطالعه رابطه مستقیمی بین افزایش غلظت عصاره و میزان اثرات بازدارندگی از رشد آن وجود دارد، این نتایج با یافته های صفری و احمدی اسپچین و همچنین زندی و همکاران مطابقت دارد که افزایش غلظت های مختلف عصاره منجر به افزایش فعالیت ضد باکتریایی و افزایش قطر هاله عدم رشد می شود (۴۳ و ۴۲). داراب پور و همکاران گزارش کردند، که بهترین فعالیت ضد باکتریایی عصاره اسپند علیه گونه های گرم مثبت باکتریایی، از جمله: *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس پومیلیوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استرپتوکوکوس پایوژنز* و گونه های گرم منفی شامل *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سالمونلا تایفی*، *پروتئوس میرابیلیس* می باشد (۴۱).

بنبوت و همکارانش در سال ۲۰۱۲ اثر مهاری عصاره آلکالوئیدهای دانه اسپند را در برابر گونه‌های باکتریایی گرم مثبت مانند: *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوک* *سارپروفیتیکوس* و گرم منفی از جمله *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سریشیا* گزارش کردند (۴۴). زینلی و همکارانش در سال ۱۳۹۴، MIC عصاره متانولی گیاه اسپند برای باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ۵۶/۱ میلی گرم در میلی لیتر و برای باکتری *لیستریا مونوسیژنوز* ۷۸/۰ میلی گرم در میلی لیتر تعیین کردند. همچنین، MBC عصاره متانولی گیاه اسپند برای باکتری‌های مذکور را مشابه MIC آن‌ها گزارش نمودند (۴۵). در مطالعه هاشمی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاه اسپند بر روی سوش‌های استاندارد و ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* حاوی بتالاکتاماز، نشان دادند که عصاره اسپند نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پنم و مروپنم کمترین تأثیر را داشتند (۴۶). فضلی بزاز و همکارانش آلکالوئیدهای حاصل از اسپند دارای اثرات ضد میکروبی خوبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت دارند که در این بین بیشترین تأثیر را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند (۴۷). عمادی و همکارانش با بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره الکلی اسپند بر باکتری‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نشان دادند که بیشترین هاله عدم رشد در باکتری *اشریشیا کلی* (۲۹/۳۳ میلی متر) و کمترین هاله عدم رشد در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* (۱۷/۳۳ میلی متر) دیده شد. MIC باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بین ۱۶-۲ میکروگرم بر میلی لیتر بودند (۸). مطالعات دیگر حساسیت سویه *آئروموناس هیدروفیال*، *لاکتوباسیل‌ها* و *استرپتوکوکوس موتانس* به عصاره اسپند را نشان دادند (۴۸). نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که عصاره الکلی رازیانه در غلظت‌های ۲۵، ۲۰۰، ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ممانعت از رشد و در رقت‌های ۲۵، ۴۰۰، ۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر منجر به مرگ سویه‌های *استرپتوکوک پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلای* و *باسیلوس سرئوس* گردید و این رقت‌ها به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره

الکلی مذکور تعیین شد. در مطالعه‌ای که توسط شهیدی در کرمان انجام پذیرفت، اثر عصاره اتانولی گیاه رازیانه بر روی ده باکتری مورد مطالعه قرارگرفت اثر این عصاره تنها بر مهار رشد *استافیلوکوک طلایی* و *باسیلوس سرئوس* گزارش گردید و از جمله این عصاره بر مهار رشد *اشریشیا کلی* هیچ گونه تأثیری را نشان نداد (۴۹)، درحالی که در مطالعه حاضر اثر مهاری عصاره رازیانه بر سویه‌ی *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوک طلایی* در غلظت‌های بالاتر از مطالعه فوق مشاهده گردید. در مطالعه دیگری که در هند به انجام رسید، عصاره آبی گیاه رازیانه اثر مهار رشد بر سه میکروارگانیزم *استافیلوکوک اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* نشان داد که در این میان در روش دیسک بیشترین اثر بر روی *استافیلوکوک طلایی* گزارش گردید (۵۰)، در تحقیق صورت گرفته هیچ اثر مهاری از عصاره الکلی رازیانه از طریق روش دیسک فیوژن مشاهده نگردید. اما نتایج حاصل از مطالعه دیگری که بر روی عصاره دانه گیاه رازیانه بر روی ۱۵ میکروارگانیزم از جمله *استافیلوکوک اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* انجام پذیرفته بود موید نتایج حاصل از آزمایشات ما بودند چراکه هیچ گونه اثر مهارکننده رشدی از طریق انتشار از دیسک مشاهده نشد (۵۱). در گزارش دیگری که بر روی چندین گیاه انجام پذیرفت، اثر ضدباکتری عصاره‌های استونی و هیدرومتانولی رازیانه بر روی میکروارگانیزم بررسی گردید که اثر مهار رشد تنها بر روی *باسیلوس سرئوس* مشاهده گردید و این عصاره‌ها فاقد اثر مهارکننده رشد بر روی *استافیلوکوک طلایی* و *اشریشیا کلی* بودند (۵۲)، در مطالعه صورت گرفته اثر مهاری از طریق انتشار از دیسک بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده نگردید که در تضاد با یافته‌های تحقیقات حاضر می‌باشد. این نتایج حکایت از تأثیر منطقه رویش گیاه و به ویژه اقلیم و شرایط آب و هوا و خاک منطقه و همچنین نوع عصاره مورد استفاده دارد، که به دنبال آن تفاوت در درصد ترکیبات ضد میکروبی و موثر موجود در عصاره را سبب می‌گردد. در این مطالعه، عصاره الکلی رزماری بیشترین هاله عدم رشد را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله ۱۶ میلی متر و کمترین تأثیر را بر روی سویه‌ی *استرپتوکوک پنومونیه* به قطر ۶ میلی متر دارا بود. حضور اسیدهای فنولیک مانند اسید رزمارینیک

و کلروژنیک را در عصاره رزماری از عوامل موثر بر باکتری‌های گرم منفی می‌دانند. از آنجا که حلالیت این ترکیبات در حلال‌های آلی بسیار بیشتر از آب است (۵۳) لذا تاثیر بالای عصاره رزماری بر باکتری/شرشیا کلی می‌تواند به دلیل حضور بیشتر این ترکیبات فعال در عصاره هیدروالکلی باشد. مورنو و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تحقیقی تحت عنوان وابستگی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی رزماری به محتوای فنلی آن، نشان دادند که بین خواص ضد باکتریایی رزماری و محتوای فنلی آن رابطه مستقیم وجود دارد و MIC آن بر باکتری‌های گرم مثبت بین ۲ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر و همینطور برای باکتری‌های گرم منفی بین ۲ تا ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. برای قارچ‌ها نیز برابر ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این تحقیق نشان داد که عصاره آبی رزماری که دارای ۱۵٪ رزمارینیک‌اسید است، فعالیت ضد میکربی بسیار پایینی دارد، درحالی‌که عصاره متانولی که حاوی ۳۰٪ کارنوزیک‌اسید بود از فعالیت ضد میکروبی بالایی برخوردار بود (۵۴). البته تحقیقاتی که توسط آنجیونی و همکارانش بر روی یک نمونه رزماری (Sardinian rosemary) انجام شد، نشان داد که این نمونه از رزماری اثرات بازدارندگی قابل توجهی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *شرشیا کلی* نداشته است (۵۵). در صورتیکه محققین دیگری اثرات بازدارنده نمونه دیگری از رزماری (Argentinian rosemary) را بر قارچ‌ها گزارش نمودند. همچنین اوکوه و همکاران بر روی اثرات ضد باکتریایی گیاه رزماری مطالعاتی را انجام دادند و نتایج نشان داد که اسانس روغنی گیاه رزماری

اثرات ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر روی باکتری‌های مورد آزمایش داشته است (۵۶). بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل مربوط به عصاره متانولی زیره سبز می‌باشد (۵۷). در همین راستا وی و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که علاوه بر ترکیبات فنولی، عوامل دیگری نیز بر سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارند (۵۸). دانشمندی و همکاران در سال ۲۰۱۰ از اسانس پودر دانه زیره سبز برای بررسی عملکرد ضد باکتریایی باکتری‌های *شرشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا فلکسنری*، *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *انتروکوکوس فکالیس* به روش انتشار از دیسک با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله مهار و تعیین حداقل غلظت مهار توسط روش میکروبراث دایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفته و مشخص شده است که بزرگترین هاله عدم رشد مربوط به *باسیلوس سرئوس* با قطر ۴۴ میلی‌متر و بعد از آن بیشترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب مربوط به *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا فلکسنری* و *شرشیا کلی* بوده است و برای *انتروکوکوس فکالیس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* کمترین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده است (۵۹). در مطالعه حاضر نیز بیشترین قطر هاله عدم رشد عصاره الکلی زیره سبز ناشی از تاثیر بر آن سویه‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس آئوس* می‌باشد. بررسی نتایج MBC و MIC در مطالعات دیگر نیز نشان داد که اسانس زیره سبز بیشترین اثر مهارکنندگی و کشندگی را بر روی *شرشیا کلی* دارد (۶۰).

منابع

1. Javidtash I, Roshandel L. Collection and identification of dye plants of Fars province and dyeing of wool and natural silk fibers by scientific methods. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2000;6:67–96. (In Persian).
2. Imperial IC, Ibana JA. Addressing the antibiotic resistance problem with probiotics: reducing the risk of its double-edged sword effect. *Front Microbiol*. 2016;7:1983.
3. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):564–582.
4. Omidbaigi R. *Production and processing of medicinal plants*. Vol. 3. Tehran: Agricultural Education and Extension Publications; 2005.
5. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, et al. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*. 2004;84(4):519–525.
6. Bakal SN, Bereswill S, Heimesaat MM. Finding novel antibiotic substances from medicinal plants—antimicrobial properties of *Nigella sativa* directed against multidrug-resistant bacteria. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2017;7(1):92–98.
7. Berrougui H, Martín-Cordero C, Khalil A, Hmamouchi M, Ettaib A, Marhuenda E, et al. Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seeds in isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006;104(3):150–157.
8. Chegeni TN, Ghaffarifar F, Khoshzaban F, Asl AD. Evaluation of anti-amoebic activity of *Peganum harmala* ethanolic extract on *Acanthamoeba* in vitro. *Journal of Entomology*. 2018;20(129):74–82.
9. Loub WD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Quinn ML. NAPRALERT: computer handling of natural product research data. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 1985;25(2):99–103.
10. Özcan M. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(3):267–270.
11. Del Campo J, Amiot M-J, Nguyen-The C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection*. 2000;63(10):1359–1368.
12. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*. 2008;110(1):76–82.
13. Oliveira AA, Segovia JF, Sousa VY, Mata EC, Gonçalves MC, Bezerra RM, et al. Antimicrobial activity of Amazonian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2013;2:1–6.
14. Mirsaid SF, Shiravi A, Heydari-Nasrabadi M. The effect of intraperitoneal injection of alcoholic extract of fennel seed (*Foeniculum vulgare* Mill) on gonadotropin and testosterone hormones in male Wistar rats. *Animal Biology*. 2008;1(1):49–56. (In Persian).

- 15.Sefidkan F. Quantitative and qualitative analysis of *Foeniculum vulgare* essential oil at different growth stages. *Majazi Journal*. 2014;1(1):85–104. (In Persian).
- 16.Sharbatkori M, Nateghpour M, Edrisian G. Cidal activity of *Peganum harmala* on *Plasmodium falciparum* and comparison with chloroquine in vitro. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*. 2007;7(2):101–108.
- 17.Das S, Surendran P, Thampuran N. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. *Indian Journal of Medical Research*. 2009;129(3):316–320.
- 18.Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, et al. Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;121(3):352–356.
- 19.Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T. *Medical Microbiology: Jawetz, Melnick & Adelberg's*. 25th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2010.
- 20.Driver C. Pneumonia part 2: signs, symptoms and vaccinations. *British Journal of Nursing*. 2012;21(4):245–249.
- 21.Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629–641.
- 22.Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) classification and typing methods: an overview. *Polish Journal of Microbiology*. 2011;60(2):95–103.
- 23.Trilla A, Miro J. Identifying high-risk patients for *Staphylococcus aureus* infections: skin and soft tissue infections. *Journal of Chemotherapy*. 1995;7(Suppl 3):37–43.
- 24.Casey A, Lambert PA, Elliott T. Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007;29(Suppl 3):S23–S32.
- 25.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2013.
- 26.Fecteau G, Fairbrother JM, Higgins R, Van Metre DC, Paré J, Smith BP, et al. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from the blood of bacteremic neonatal calves. *Veterinary Microbiology*. 2001;78(3):241–249.
- 27.Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*. 1999;30(2–3):299–316.
- 28.Jay CM, Bhaskaran S, Rathore KS, Waghela SD. Enterotoxigenic K99⁺ *Escherichia coli* attachment to host cell receptors inhibited by recombinant pili protein. *Veterinary Microbiology*. 2004;101(3):153–160.
- 29.Batt C. Listeria. In: Robinson R, Batt C, Patel P, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press; 2000. p. 132-238.
- 30.O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*. 2009;374(9693):893–902.
- 31.Nezhad FM, Zeigham H, Mota A, Sattari M, Yadegar A. Antibacterial activity of *Eucalyptus* extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus. *Research Journal of Biological Sciences*. 2009;4(8):905–908.

32.Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2013;1830(6):3670–3695.

33.Fisgin NT, Cayci YT, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, et al. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper®. *Fitoterapia*. 2009;80(1):48–50.

34.Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases. *Digestive and Liver Disease*. 2007;39(4):293–304.

35.Brul S, Coote P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1999;50(1–2):1–17.

36.Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996;50(1):27–34.

37.Shan B, Cai Y-Z, Brooks JD, Corke H. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007;55(14):5484–5490.

38.Mirzaei M. Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant *Peganum harmala*. *The Korean Journal of Parasitology*. 2007;45(4):267.

39.Shahverdi AR, Monsef-Esfahani HR, Nickavar B, Bitarafan L, Khodaei S, Khoshakhlagh N. Antimicrobial activity and

main chemical composition of two smoke condensates from *Peganum harmala* seeds. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2005;60(9–10):707–710.

40.Nenaah G. Antibacterial and antifungal activities of β -carboline alkaloids of *Peganum harmala* L. seeds and their combination effects. *Fitoterapia*. 2010;81(7):779–782.

41.Darabpour E, Bavi AP, Motamedi H, Nejad SMS. Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *European Journal of Experimental Biology*. 2011;10:252.

42.Safari M, Ahmady-Asbchin S. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of medlar (*Mespilus germanica* L.) leaves. *Biomedical and Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):372–378.

43.Zandi H, Hajimohammadi B, Amiri A, Ranjbar A, Mozaffari Khosravi H, Fallah Zadeh H, et al. Antibacterial effects of *Mentha × piperita* L. hydroalcoholic extract on six food-borne pathogenic bacteria. *The Journal of Toloo-e-behdasht*. 2016;15(4):22–33.

44.Benbott A, Yahyia A, Belaidi A. Assessment of the antibacterial activity of crude alkaloids extracted from seeds and roots of the plant *Peganum harmala* L. *Journal of Natural Products and Plant Resources*. 2012;2(5):568–573.

45.Zeinali T, Mohsenzadeh M, Rezaeian Doloei R, Nabipour R. In vitro assessment of antimicrobial effect of methanolic extract of *Peganum harmala* against some important foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Hygiene*. 2016;5(4):27–36.

46. Hashemi A, Shams S, Barati M, Samedani A. Antibacterial effects of methanolic extracts of *Zataria multiflora*, *Myrtus communis*, and *Peganum harmala* on *Pseudomonas aeruginosa* producing ESBL. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2011;14(4):104–112.
47. Fazli Bazaz B, Mohammadi A, Sabeti Noghabi Z. Antimicrobial effects of smoke and alkaloids of *Peganum harmala*. *Journal of Food Preservation, Mashhad University of Medical Sciences*. 2016;5(4):27–36.
48. Abutbul S, Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Ofir R, Zilberg D. Screening of desert plants for use against bacterial pathogens in fish. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*. 2005;57(2):71–80.
49. Bonjar GSJ. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. *Fitoterapia*. 2004;75(2):231–235.
50. Arora DS, Kaur GJ. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Natural Medicines*. 2007;61(3):313–317.
51. Sağdıç O, Özcan M. Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*. 2003;14(2):141–143.
52. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;80(3):223–230.
53. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Herbal Medicines*. London: Pharmaceutical Press; 2007.
54. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Food Research International*. 2006;40(2):223–231.
55. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(11):3530–3535.
56. Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. *Food Chemistry*. 2010;120(1):308–312.
57. Baharlouei M, Ranjbar M. Antioxidant and antimicrobial effects of methanolic and aqueous extracts of *Cuminum cyminum*, *Carum carvi*, and *Nigella sativa* against *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2023;30(2):164–175.
58. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(11):5165–5170.
59. Daneshmandi S, Soleimani N, Sattari M, Pourfathollah A. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *Cuminum cyminum* essential oil. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology, Avicenna Medical University Journal*. 2010;13(2):25–37.
60. Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LED, Moreira RRD, Pietro RCL. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18:241–244.

مکمل های هوشمند: قدرت پست بیوتیک ها در تغذیه و دارو مروری بر اثرات پست بیوتیک ها به عنوان مکمل غذایی و دارویی مهسا قهقایی^۱، محدثه لاری پور^{۲*}

۱- دانشجوی دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

پست بیوتیک ها محصولات متابولیکی یا ترکیبات زیست فعالی هستند که توسط میکروارگانیسم های پروبیوتیک تولید می شوند و پس از مرگ یا غیرفعال شدن این میکروارگانیسم ها همچنان خواص زیستی خود را حفظ می کنند و یا به عبارتی به تمامی فاکتورهای محلولی اطلاق می شود که یا از سلول پروبیوتیک زنده ترشح شده و یا پس از لیز سلولی آزاد می شوند. این ترکیبات فعال زیستی، محصولات متابولیکی تولید شده توسط میکروارگانیسم های پروبیوتیک هستند که می توانند اثرات مفیدی بر سلامت انسان داشته باشند و به دلیل پایداری بالا در شرایط محیطی نسبت به پروبیوتیک ها و امکان تولید صنعتی در مقیاس بزرگ، در حال حاضر به عنوان یک گزینه درمانی و پیشگیرانه در حال بررسی هستند. برخی از محدودیت های مرتبط با پروبیوتیک ها، از جمله حساسیت به دما و pH محیط های اسیدی، باعث شد تا تحقیقات به سمت استفاده از پست بیوتیک ها سوق پیدا کند. این ترکیبات شامل طیف وسیعی از مواد مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم ها، پلی ساکاریدها و متابولیت های فعال هستند که می توانند اثرات مفیدی بر سلامت گوارش، تقویت سیستم ایمنی، کاهش التهاب و بهبود اختلالات متابولیکی داشته باشند. هدف از این مقاله مروری، بررسی ماهیت، ساختار و انواع مکانیسم های عمل و کاربردهای بالقوه پست بیوتیک ها در بهبود سلامت انسان و صنایع غذایی می باشد و به روش های تولید، شناسایی و کاربرد پست بیوتیک ها در حوزه سلامت می پردازد. همچنین، نتایج تحقیقات اخیر درباره اثربخشی این ترکیبات مرور شده و مزایا و محدودیت های آنها مورد بحث قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پست بیوتیک، ترکیبات زیست فعال، مکمل غذایی، مکمل دارویی، سیستم ایمنی

Smart Supplements: The Power of Postbiotics in Nutrition and Medicine Review of the Effects of Postbiotics as Dietary and Medicinal Supplements

Mahsa Ghahghaei¹, Mohaddeseh Larypoor^{2*}

1- PhD. student in Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

2- Associate Professor of Mycology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Postbiotics are metabolic products or bioactive compounds produced by probiotic microorganisms, which retain their biological properties even after the microorganisms have died or become inactive. In other words, they refer to all soluble factors either secreted by the live probiotic cell or released following cell lysis. These bioactive compounds, including metabolic products produced by probiotics, can have beneficial effects on human health. Due to their high stability under environmental conditions compared to probiotics and their potential for large-scale industrial production, postbiotics are currently being explored as a therapeutic and preventive option. Some limitations associated with probiotics, such as sensitivity to temperature and acidic pH of environments, have led research to shift towards using postbiotics. These compounds encompass a wide range of substances including short-chain fatty acids, antimicrobial peptides, enzymes, polysaccharides, and active metabolites, which can promote digestive health, strengthen the immune system, reduce inflammation, and improve metabolic disorders. The aim of this review article is to examine the nature, structure, types of mechanisms, and potential applications of postbiotics in improving human health and the food industry. It delves into the methods of production, identification, and applications of postbiotics in healthcare. Additionally, recent research findings on the efficacy of these compounds are reviewed, and their advantages and limitations are discussed.

Keywords: Probiotics, Postbiotics, Bioactive compounds, Dietary Supplements, Medicinal Supplements, the immune system

مقدمه

غذایی و دارویی تبدیل کرده است (۵). پست‌بیوتیک‌ها به دلیل غیرزنده بودن و ایمنی بیشتر نسبت به پروبیوتیک‌ها، در گروه‌های حساس مانند کودکان و بیماران نقص ایمنی جایگزین ایده‌آلی محسوب می‌شوند (۶)، همچنین از ترکیباتی مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی تشکیل شده‌اند که بدون نیاز به حضور خود باکتری‌ها، می‌توانند اثرات مفیدی بر میزبان داشته باشند (۷).

تعریف و طبقه‌بندی پست‌بیوتیک‌ها

پست‌بیوتیک‌ها به عنوان متابولیت‌های فعال پروبیوتیک‌ها تعریف می‌شوند که پس از فرآیند تخمیر تولید می‌شوند (۸). این ترکیبات شامل متابولیت‌های زیستی، پروتئین‌های ضدباکتریایی، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر و دیگر اجزای سلولی هستند (۶) و برخلاف پروبیوتیک‌ها که نیاز به حضور زنده دارند، پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند به طور مستقل اثرات سلامت‌محور داشته باشند و این ویژگی آن‌ها را به یک گزینه مناسب برای استفاده در مکمل‌ها و داروهای غذایی تبدیل کرده است (۹). پست‌بیوتیک‌ها عموماً بر اساس نوع ترکیب یا اثرات بیولوژیکی آن‌ها دسته‌بندی می‌شوند. به‌طور مثال، اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر (SCFAs) مانند بوتیرات، استات و پروپیونات نقش مهمی در حفظ سلامت روده و کاهش التهاب دارند. پپتیدهای ضدباکتریایی و ضدالتهابی از دیگر ترکیبات مؤثر پست‌بیوتیک‌ها هستند که می‌توانند در پیشگیری از عفونت‌ها و کاهش خطر بیماری‌های مزمن نقش داشته باشند. همچنین، پلی‌ساکاریدها مانند بتا‌گلوکان‌ها که در تقویت سیستم ایمنی و مقابله با عفونت‌ها تأثیرگذار هستند، یکی دیگر از انواع پست‌بیوتیک‌ها به‌شمار می‌آیند (۵).

مکانیسم‌های عمل پست‌بیوتیک‌ها

پست‌بیوتیک‌ها از طریق مهار رشد میکروارگانیسم‌های مضر و تقویت رشد باکتری‌های مفید، به حفظ تعادل میکروبیوتای روده کمک می‌کنند (۲) و با تعامل با سیستم ایمنی میزبان و تقویت مخاط روده‌ای، می‌توانند به بهبود سلامت گوارشی

پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های مفید که اثرات مثبتی بر میکروبیوم روده و سلامت عمومی بدن دارند شناخته شده‌اند (۱). با این حال، برخی از محدودیت‌های مرتبط با پروبیوتیک‌ها، از جمله حساسیت به دما و pH محیط‌های اسیدی، باعث شد تا تحقیقات به سمت استفاده از پست‌بیوتیک‌ها سوق پیدا کند (۲). پست‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان ترکیبات متابولیکی غیرزنده تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها، در سال‌های اخیر توجه زیادی را در صنایع غذایی، دارویی و تحقیقاتی جلب کرده‌اند. این ترکیبات شامل اجزای سلولی، متابولیت‌های فعال زیستی، و ترکیبات ضدباکتریایی هستند که می‌توانند اثرات مثبتی بر سلامت انسان داشته باشند. مزایای این ترکیبات شامل بهبود عملکرد ایمنی، کاهش التهابات، حفظ سلامت روده و کاهش خطر بیماری‌های مزمن است (۳و۴). پست‌بیوتیک‌ها، به‌عنوان نسل جدید مکمل‌های زیستی، مزایای قابل‌توجهی نسبت به پروبیوتیک‌ها دارند. برخلاف پروبیوتیک‌ها، این ترکیبات نیازی به زنده بودن ندارند و از این رو می‌توانند در شرایط سخت محیطی، پایداری بیشتری داشته باشند. این ویژگی آن‌ها را

نویسنده ی مسئول: دانشیار قارچ شناسی، گروه

میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران

شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک: m.larypoor@iaui.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۱

به یک جایگزین مطمئن و کارآمد برای استفاده در صنایع

کمک کنند (۱۰). به عنوان مثال، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره که از متابولیت‌های پست‌بیوتیک هستند، می‌توانند با تحریک تولید سایتوکین‌های ضد التهابی، پاسخ‌های ایمنی بدن را بهبود بخشند (۱۱). پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند از طریق مسیرهای ضد التهابی مانند کاهش تولید $TNF-\alpha$ و IL-6، التهاب را مهار کنند. این مکانیسم‌ها در بیماری‌های التهابی مزمن مانند بیماری التهابی روده (IBD) مفید هستند (۱۲). پست‌بیوتیک‌ها با تحریک و تنظیم مسیرهای متابولیکی مانند سنتز اسیدهای چرب و تحریک ژن‌های متابولیک می‌توانند به بهبود متابولیسم بدن کمک کنند (۸).

کاربردهای بالینی پست‌بیوتیک‌ها

پست‌بیوتیک‌ها در مطالعات بالینی به عنوان یک گزینه نویدبخش در درمان اختلالات مختلف از جمله سندرم روده تحریک‌پذیر (Irritable bowel syndrome (IBS و بیماری التهابی روده (Inflammatory bowel disease (IBD مطرح شده‌اند علاوه بر این، استفاده از پست‌بیوتیک‌ها در تغذیه نوزادان به بهبود سلامت گوارشی و تقویت سیستم ایمنی آن‌ها کمک کرده است (۱۱،۱۳). برخی مطالعات همچنین نشان داده‌اند که پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند در بهبود عفونت‌های باکتریایی و ویروسی موثر باشند (۱۴). اسیدهای چرب کوتاه زنجیره نقش مهمی در کاهش مقاومت به انسولین و بهبود حساسیت به گلوکز دارند، که می‌تواند در پیشگیری و مدیریت دیابت نوع ۲ مؤثر باشد (۱۰). پست‌بیوتیک‌ها به عنوان یک رویکرد نوین در بهبود سلامت انسان در حال پیشرفت هستند. تحقیقات بیشتر در مورد انواع مختلف پست‌بیوتیک‌ها و مکانیسم‌های اثر آن‌ها می‌تواند به توسعه محصولات جدید برای کاربردهای درمانی منجر شود (۱۲).

کاربرد پست‌بیوتیک‌ها در صنعت غذایی

پست‌بیوتیک‌ها به دلیل ویژگی‌های زیست‌فعال و ضد میکروبی خود، توجه بسیاری از محققان و صنعتگران را به خود جلب کرده‌اند. یکی از کاربردهای برجسته پست‌بیوتیک‌ها، استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های

طبیعی در صنعت غذایی است. این ترکیبات نه تنها می‌توانند مدت زمان ماندگاری مواد غذایی را افزایش دهند، بلکه از استفاده از پست‌بیوتیک‌ها به عنوان نگهدارنده طبیعی در صنعت غذایی یک راه‌حل پایدار و موثر برای افزایش ماندگاری و ایمنی مواد غذایی است. به طور کلی، پست‌بیوتیک‌ها به دلیل ویژگی‌هایی مانند ساختارهای شیمیایی مشخص، دوزهای پارامتری ایمن و ماندگاری طولانی‌تر بیشتر از ۵ سال هنگامی که بعنوان ماده موثره در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها یا به عنوان مکمل‌های غذایی استفاده می‌شود، بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد (۱۵ و ۱۶). با توجه به خواص ضد میکروبی و پایداری بالای این ترکیبات، پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی شوند و همزمان کیفیت حسی و تغذیه‌ای مواد غذایی را بهبود بخشند. با انجام تحقیقات بیشتر و بهبود فرآیندهای تولید، استفاده از پست‌بیوتیک‌ها در صنایع غذایی می‌تواند به‌طور گسترده‌تری مورد استفاده قرار گیرد.

انواع پست‌بیوتیک‌ها

اسیدهای چرب کوتاه زنجیره

این ترکیبات (SCFAs) از تخمیر فیبرهای غذایی توسط میکروبیوتای روده تولید می‌شوند و نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی و بهبود عملکرد روده دارند (۱۰). این ترکیبات مانند بوتیرات، استات و پروپیونات اثرات ضدالتهابی دارند و به‌طور مستقیم در تنظیم عملکرد روده نقش دارند (۴). تقریباً ۸۰ تا ۹۰٪ اسیدهای چرب کوتاه زنجیره تولید شده در روده بزرگ توسط بدن استفاده می‌شود و بقیه از طریق مدفوع دفع می‌شود.

پروتئین‌ها و ترکیبات دیواره سلولی، پپتیدهای

ضدباکتریایی

پروتئین‌های سطحی پروبیوتیک‌ها نقش بسزایی در تقویت سد روده‌ای، جذب زیستی فلزات سنگین، ممانعت از اتصال پاتوژن‌ها دارند (۱۷). این پپتیدها توسط پروبیوتیک‌ها تولید شده و می‌توانند به مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در

روده کمک کنند و رشد باکتری‌های مضر را مهار کنند همچنین اثرات ضدالتهابی داشته باشند مانند نایسین قادر به مهار رشد پاتوژن‌ها هستند (۱۸). پپتیدهای ضد میکروبی می‌توانند به حفظ تعادل میکروبیوم روده و کاهش عفونت‌های باکتریایی کمک کنند (۱۴). از دیگر ترکیبات دیواره سلولی میتوان به تیکوئیک اسیدها و پپتیدوگلیکان اشاره کرد که اثرات ایمونولوتاری در تعدیل سیستم ایمنی و اثرات ضد سرطانی آن‌ها اثبات شده است، نام برد (۲۰ و ۱۹).

ویتامین‌ها و کوآنزیم‌ها

برخی پروبیوتیک‌ها توانایی تولید ویتامین‌های ضروری مانند ویتامین‌های گروه B و K را دارند که به عنوان پست‌بیوتیک‌ها در بهبود عملکرد بدن نقش دارند (۲۱). ویتامین‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به تقویت سیستم ایمنی و متابولیسم بدن کمک می‌کنند (۹).

اگزوپلی ساکاریدها

پلیمرهای زیستی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید و به خارج از سلول ترشح می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند اثرات ضدالتهابی و تقویت سیستم ایمنی داشته باشند و با اتصال به گیرنده‌های ایمنی، پاسخ‌های ایمنی میزبان را تقویت کنند (۲۲). در واقع پلی ساکاریدهای زنجیره بلندی هستند که در طی مراحل رشد میکربی در محیط رها می‌شوند و از آنجا که متصل به سطح سلول میکروبی نیستند، می‌توان آن‌ها را از پلی ساکاریدهای کپسوله شده که متصل به سطح سلول هستند متمایز کرد. اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله‌ای و قوام دهنده‌گی ایجاد می‌کنند؛ همچنین در مواد غذایی به عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون و تشکیل فیلم به کار می‌روند (۲۳).

آنزیم‌ها

پست‌بیوتیک‌ها همچنین می‌توانند شامل آنزیم‌هایی باشند که در تجزیه غذاها و بهبود فرآیند هضم مؤثر هستند. آنزیم‌هایی مانند لیپاز و آمیلاز که توسط پروبیوتیک‌ها تولید می‌شوند، می‌توانند در بهبود گوارش نقش داشته باشند (۲۵). برخی از مطالعات (۴۱ و ۴۲ و ۴۳) مشخص کردند که عصاره‌های بدون سلول از باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است ظرفیت آنتی اکسیدانی به طور قابل توجهی بالاتری نسبت به کشت های سلولی کامل نشان دهند. نشان داد که ظرفیت آنتی اکسیدانی را می‌توان به آنتی اکسیدان های داخل سلولی آنزیمی و غیر آنزیمی نسبت داد. علاوه بر این بیفیدوباکتریوم /ینفنتیس (*Bifidobacterium infantis*)، بیفیدوباکتریوم بروه (*Bifidobacterium breve*)، بیفیدوباکتریوم آدونتیس (*Bifidobacterium adolescentis*) و لانگوم (*Bifidobacterium longum*) قادر به تجزیه پراکسید هیدروژن با تولید NADH پراکسیداز هستند (۴۴). گزارش شده است که گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز دو آنزیم آنتی اکسیدانی مهم هستند که با از بین بردن گونه های اکسیژن فعال (ROS) از سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند. با این حال، ظرفیت آنتی اکسیدانی و فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی نمی‌تواند برای همه سویه‌ها همبستگی مثبت داشته باشد، که نشان می‌دهد ترکیبات دیگر ممکن است در اثر آنتی اکسیدانی دخیل باشند (۴۵). فعالیت آنتی اکسیدانی پست‌بیوتیکی غیر آنزیمی می‌تواند ناشی از ROS و خاصیت مهارکنندگی گونه‌های نیتروژن فعال آن باشد (۴۶ و ۴۷).

متابولیت‌های ثانویه

این متابولیت‌ها شامل ترکیباتی مانند پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات آروماتیک هستند که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی دارند. این ترکیبات می‌توانند به کاهش استرس اکسیداتیو و محافظت از سلول‌ها در برابر آسیب‌های محیطی کمک کنند (۲۵). پست‌بیوتیک‌ها به عنوان ترکیبات زیست‌فعالی که از فعالیت‌های میکروبی حاصل

و از بیماری‌های گوارشی مانند بیماری التهابی روده (IBD) و سندرم روده تحریک‌پذیر (IBS) جلوگیری کنند، علاوه بر این، پستیوتیک‌ها به حفظ سلامت فلور روده کمک می‌کنند که این امر تأثیر مستقیمی بر کیفیت هضم و جذب مواد غذایی دارد (۲۶ و ۲۷).

کاهش التهاب سیستمیک و پیشگیری از بیماری‌های مزمن

پستیوتیک‌ها نقش مهمی در کاهش التهاب دارند. التهاب مزمن یکی از عوامل اصلی در بروز بیماری‌های مزمن همچون دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، و بیماری‌های خودایمنی است. پستیوتیک‌ها به‌ویژه اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر با تأثیر بر سیگنال‌دهی التهابی در بدن، می‌توانند از شدت التهاب بکاهند و در پیشگیری از این بیماری‌ها مؤثر باشند. بوتیرات، به‌عنوان یک اسید چرب کوتاه‌زنجیر، نه‌تنها منبع انرژی برای سلول‌های روده است، بلکه با تأثیر بر مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی می‌تواند از واکنش‌های التهابی جلوگیری کند (۲۶). همچنین، پپتیدهای زیست‌فعال که از تخمیر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک تولید می‌شوند، خواص ضدالتهابی دارند و به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی نیز عمل می‌کنند که می‌توانند به تقویت سلامت روده و کاهش التهاب کمک کنند (۳۵ و ۳۶). پستیوتیک‌ها می‌توانند از طریق تنظیم مسیرهای التهابی مانند NF- κ B به کاهش التهاب مزمن کمک کنند (۴). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که مصرف پستیوتیک‌ها ممکن است خطر بیماری‌های مزمن مانند دیابت نوع ۲ و سندرم روده تحریک‌پذیر را کاهش دهد (۳).

تقویت سیستم ایمنی بدن

پستیوتیک‌ها می‌توانند سیستم ایمنی بدن را تقویت کنند. مصرف این ترکیبات می‌تواند موجب افزایش تولید سلول‌های ایمنی مانند لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها شود. این سلول‌ها به‌طور مستقیم با عفونت‌ها مبارزه می‌کنند و از بدن در برابر عوامل

می‌شوند، دارای کاربردهای وسیعی در بهبود سلامت بدن انسان هستند. این ترکیبات می‌توانند در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی، به‌ویژه در حفظ تعادل میکروبیوم روده، تقویت سیستم ایمنی، کاهش التهاب، و پیشگیری از بیماری‌های مزمن مؤثر باشند. مصرف پستیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی روز به روز در حال افزایش است و توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۴). در ادامه، به نقش‌های مختلف پستیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل غذایی و دارویی پرداخته می‌شود.

اثرات سلامتی بخش پست بیوتیک‌ها

پستیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعالی که از فعالیت‌های میکروبی حاصل می‌شوند، دارای کاربردهای وسیعی در بهبود سلامت بدن انسان هستند. این ترکیبات می‌توانند در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی، به‌ویژه در حفظ تعادل میکروبیوم روده، تقویت سیستم ایمنی، کاهش التهاب، و پیشگیری از بیماری‌های مزمن مؤثر باشند. مصرف پستیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی روز به روز در حال افزایش است و توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

تقویت سلامت روده و میکروبیوم گوارشی

یکی از اصلی‌ترین عملکردهای پستیوتیک‌ها، بهبود و تقویت سلامت روده است. میکروبیوم روده انسان شامل میلیاردها میکروب است که نقشی حیاتی در هضم غذا، جذب مواد مغذی و تقویت سیستم ایمنی دارد. مصرف پستیوتیک‌ها می‌تواند موجب حفظ تعادل میکروبی در روده شده و از عبور مواد مضر به داخل بدن جلوگیری کرده و تعادل میکروبی را در روده حفظ کند و از رشد باکتری‌های مضر جلوگیری کند. این ترکیبات با تقویت سد مخاطی و تنظیم فلور میکروبی روده به سلامت دستگاه گوارش کمک می‌کنند (۱۸ و ۳۷). پستیوتیک‌ها به‌ویژه اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر مانند بوتیرات، استات و پروپیونات، به‌عنوان محصولات نهایی تخمیر فیبرهای غذایی، می‌توانند باعث کاهش التهاب در روده شوند

بیماری‌ها محافظت می‌کنند. تحقیقات نشان داده است که پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند با تقویت فعالیت ماکروفاژها و سایر سلول‌های ایمنی، پاسخ ایمنی بدن را به عفونت‌ها و بیماری‌ها بهبود بخشند (۳۸ و ۲۸).

کنترل قند خون و مدیریت دیابت

پست‌بیوتیک‌ها به‌ویژه در کنترل قند خون و پیشگیری از دیابت نوع ۲ نیز کاربرد دارند. برخی از پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند با کاهش مقاومت به انسولین، بهبود متابولیسم گلوکز و کاهش سطح قند خون کمک کنند. تحقیقات نشان داده‌اند که اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر تولید شده از تخمیر فیبرهای غذایی می‌توانند از طریق تقویت پاسخ به انسولین و کاهش التهاب به بهبود مدیریت دیابت کمک کنند. این خاصیت پست‌بیوتیک‌ها به‌ویژه در بیماران دیابتی یا افرادی که در معرض ابتلا به دیابت هستند، می‌تواند مفید واقع شود (۲۶).

پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی

پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند به کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی نیز کمک کنند. کاهش التهاب، بهبود عملکرد رگ‌های خونی و کاهش سطح کلسترول از جمله مزایای پست‌بیوتیک‌ها در این زمینه است. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف پست‌بیوتیک‌ها می‌تواند به‌ویژه با کاهش التهاب سیستمیک، فشار خون را کنترل کرده و در نهایت از بیماری‌های قلبی-عروقی جلوگیری کند (۲۶).

اثر بر بهبود وضعیت روانی و کاهش استرس

پیامدهای روانی بلندمدتی که بر جامعه امروزی تأثیر می‌گذارد می‌تواند در نتیجه همه‌گیری ایجاد شده توسط ویروس COVID_19 مرتبط باشد. به دلیل انزوای ناشی از قرنطینه، توقف ناگهانی زندگی روزانه میلیون‌ها نفر منجر به افزایش تنهایی، اضطراب، افسردگی، بی‌خوابی، استفاده مضر از الکل و مواد مخدر، و خودآزاری یا رفتار خودکشی شد (۴۹ و ۵۰).

به همین دلیل، درمان‌های احتمالی برای کاهش اختلالات روانی ناشی از همه‌گیری مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مصرف پروبیوتیک‌ها می‌تواند راه‌حل مناسبی باشد. تحقیقات اخیر استدلال کرده است که میکروبیوتای روده بر تنظیم روده تأثیر می‌گذارد و بر سلامت روان از طریق محور روده-مغز تأثیر می‌گذارد (۴۸، ۵۱ و ۵۲). اگرچه اصطلاح «سایکوبیوتیک‌ها» در سال ۲۰۱۳ ابداع شد، اما در سال‌های اخیر با توجه به شرایط فعلی، قدرت بیشتری پیدا کرده است (۵۳). سایکوبیوتیک به پتانسیل تأثیر وضعیت روانی مولکول‌های تولید شده توسط باکتری‌های پروبیوتیک اشاره دارد و به پروبیوتیک‌های خاصی اشاره دارد که شامل گونه‌هایی مانند، بیفیدوباکتریوم انیمالیس (*Bifidobacterium animalis*), بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*), بیفیدوباکتریوم آدونتیس (*Bifidobacterium adolescentis*) و بیفیدوباکتریوم لانگوم (*Bifidobacterium longum*) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) می‌باشد (۵۴). این پروبیوتیک‌های باکتریایی قادر به تولید مواد عصبی فعال مانند γ -آمینوبوتیریک اسید (GABA) و سروتونین می‌باشند. همچنین متابولیت‌ها، مانند SCFAs، از آنجایی که در کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی نقش دارند، ممکن است بر درمان استرس و افسردگی تأثیر مثبت بگذارند (۵۵). اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر، به‌ویژه بوتیرات، می‌توانند از طریق اثرات ضدالتهابی و تنظیم سیگنال‌دهی عصبی، به بهبود خلق و کاهش اضطراب کمک کنند (۱۸).

کاهش خطر سرطان

پست‌بیوتیک‌ها همچنین می‌توانند در کاهش خطر برخی از انواع سرطان‌ها مؤثر باشند. اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر به‌ویژه بوتیرات، با اثر بر متابولیسم سلولی و کاهش التهاب می‌توانند از رشد تومورها و پیشرفت سرطان جلوگیری کنند. مطالعات نشان داده‌اند این ترکیبات از طریق تأثیر بر بیان ژن‌ها و مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی، توانایی جلوگیری از تقسیم سلولی غیرطبیعی را دارد (۱۸). علاوه بر این، مشاهده شد که

ممکن است فعالیت متالوپروتئیناز-۹ را کاهش دهند که تهاجم سرطان روده بزرگ را مهار می کند (۴۰).

تاثیرات زیست فعالی پست بیوتیک ها

در سال های اخیر، تعداد قابل توجهی از مطالعات با استفاده از مدل های *in vivo* و *in vitro* برای ارزیابی فعالیت زیستی بالقوه ویا اثرات سلامتی پست بیوتیک های مختلف، مانند متابولیت ها و اجزای دیواره سلولی، به صورت ساختارهای جدا شده یا مخلوط، مانند عصاره ها یا سوسپانسیون ها مورد استفاده قرار گرفته اند (۵۴). خلاصه ای در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

اثر محافظتی در مردان قوی تر از زنان بوده است. مطالعات بالینی در مورد خواص ضد سرطانی بسیار اندک بوده و بر اساس پرسشنامه بوده است. مطالعات بالینی بیشتری مورد نیاز است تا نشان دهد مصرف غذاهای پروبیوتیک به درمان و پیشگیری از سرطان کمک می کند. پست بیوتیک ها همچنین یک فعالیت خاص ضد تکثیری را در برابر سلول های سرطانی روده بزرگ ثابت کرده اند. به احتمال زیاد مربوط به فعال شدن مسیرهای مرگ سلولی پرو آپوپتوز از طریق تنظیم پاسخ های ایمنی است (۳۹). گزارش شده است که پست بیوتیک های به دست آمده از سویه های لاکتوباسیلوس

جدول ۱. مطالعات *in vivo* و *in vitro* برای ارزیابی فعالیت زیستی بالقوه ویا اثرات سلامتی پست بیوتیک های مختلف

فصلنامه ی تازه های زیست فناوری میکروبی

منبع	اثرات یا فعالیت زیستی	روش مطالعه	ترکیبات زیستی	نام پروبیوتیک
(۵۵)	تعدیل سیستم ایمنی	رده سلولی ماکروفاژ RAW264.7	دیواره سلولی اجزاء و عصاره سیتوپلاسمی	<i>Bifidobacterium spp</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp.bulgaricus <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
(۵۶)	تعدیل سیستم ایمنی	سلول های Caco-2	اجزاء و عصاره سیتوپلاسمی	<i>Faecali bacterium prausnitzii</i> A2-165 (DSM17677)
(۵۷)	تعدیل سیستم ایمنی	سلول THP-1 مونوسیت انسانی	لیپوتیکوئیک اسید	<i>Lactobacillus plantarum</i> K8 (KCTC10887BP)
(۵۸)	تعدیل سیستم ایمنی	رده سلولی ماکروفاژ RAW264.7	عصاره بدون سلول باکتری	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BGN4
(۵۹)	تعدیل سیستم ایمنی	رده سلولی HT29 انسانی	لیپوتیکوئیک اسید	<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> La10
(۶۰)	تعدیل سیستم ایمنی	رده سلولی ماکروفاژ RAW264.7	لیپوتیکوئیک اسید	<i>Lactobacillus casei</i> YIT9029 <i>Lactobacillus fermentum</i> YIT0159
(۶۱)	تعدیل سیستم ایمنی	سلول های دندریتیک از خون انسان مونوسیت ها	سوپرناتانت های بدون سلول باکتری	<i>Lactobacillus paracasei</i> B21060
(۶۲)	ضد التهاب	موکوس مخاط روده بزرگ انسان	سوپرناتانت های بدون سلول باکتری	<i>Lactobacillus paracasei</i> B21060
(۶۳)	تعدیل سیستم ایمنی و ضد التهاب	سلول های پلی مورفونکلتر انسانی (PMNs)	ترکیبات دیواره سلولی	<i>Bacillus coagulans</i>
(۶۴)	ضد التهاب	سلول های ماهیچه ای صاف کولون انسان	سوپرناتانت های بدون سلول باکتری	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
(۶۵)	ضد تکثیر	سلول های HeLa ، MCF7 ، U- ،U2OS ،HepG2 ،87 ،WiDr ،HT-29 ،PANC-1 CX-1وDLD-1	مواد درون سلولی	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC43121,ATCC4356,606) <i>Lactobacillus brevis</i> ATCC8287 <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> (YIT9029,ATCC393) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
(۶۶)	ضد تکثیر	رده سلولی سرطان کولون CT26 موشی و انسانی HT29	سوسپانسیون سلولی	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC393
(۶۷)	آنتی اکسیدان	در محیط آزمایشگاهی	مواد درون سلولی	<i>Streptococcus salivarius ssp</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC19258 <i>Lactobacillus delbrueckii spp</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ATCC11842
(۶۸)	آنتی اکسیدان	در محیط آزمایشگاهی	مواد درون سلولی	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC3111 <i>Lactobacillus jonsonii</i> KCTC3141 <i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC3151 <i>Lactobacillus brevis</i> KCTC3498
(۶۹)	آنتی اکسیدان	در محیط آزمایشگاهی	مواد درون سلولی	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> SY13 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.bulgaricus LJJ
(۷۰)	آنتی اکسیدان	در محیط آزمایشگاهی	مواد درون سلولی	<i>Bifidobacterium</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> strains

<i>Bifidobacterium longum</i> SPM1207	سوسپانسیون سلولی	مدل رت با کلسترول بالا	هیپرکلسترولمی	(۷۱)
<i>Lactobacillus casei</i> YIT9018	پلی ساکارید - گلیکوپپتید	موش صحرایی با فشار خون بالا	ضد فشار خون	(۷۲)
<i>Lactobacillus amylovorus</i> CP1563	قطعات اجزاء سلولی	موش چاق	ضد چاقی	(۷۳)
<i>Lactobacillus fermentum</i> BGHV110	سوسپانسیون سلولی	سلول های هپاتوما انسانی HepG2	محافظت از کبد	(۷۴)
<i>Enterococcus lactis</i> IITRHR1 <i>Lactobacillus acidophilus</i> MTCC447	مواد درون سلولی	سلول های بافت کبد rat	محافظت از کبد	(۷۵)
<i>Lactobacillus plantarum</i> RG11,RG14,RI11,UL4,TL1andRS5	سوپرناتانت های بدون سلول باکتری	در محیط آزمایشگاهی	ضد میکروبی	(۷۶)

فرآیند تولید پست بیوتیک ها

تولید پست بیوتیک ها فرآیندی است که از تخمیر پروبیوتیک ها شروع می شود و طی آن محصولات زیست فعال و ترکیبات متابولیکی مختلفی حاصل می شود. این فرآیند به نحوی طراحی می شود که میکروارگانیسم ها ترکیبات مورد نیاز را در محیط کشت مناسب تولید کرده و سپس با روش های مختلف، میکروارگانیسم های زنده حذف شده و تنها ترکیبات فعال (پست بیوتیک ها) باقی می ماند.

این فرآیند شامل انتخاب و کشت میکروارگانیسم های مفید، تخمیر کنترل شده، حذف میکروارگانیسم های زنده و تثبیت ترکیبات زیست فعال است. استفاده از روش های مدرن و فناوری های نوین در این فرآیند به بهبود کارایی تولید و کیفیت نهایی پست بیوتیک ها کمک کرده و امکان تولید انبوه این ترکیبات را در صنایع غذایی و دارویی فراهم کرده است. با توجه به مزایای پایداری و امنیت بالاتر این محصولات، پیش بینی می شود که استفاده از پست بیوتیک ها در آینده ای نزدیک به طور گسترده تری در صنایع مختلف افزایش یابد (۲۹).

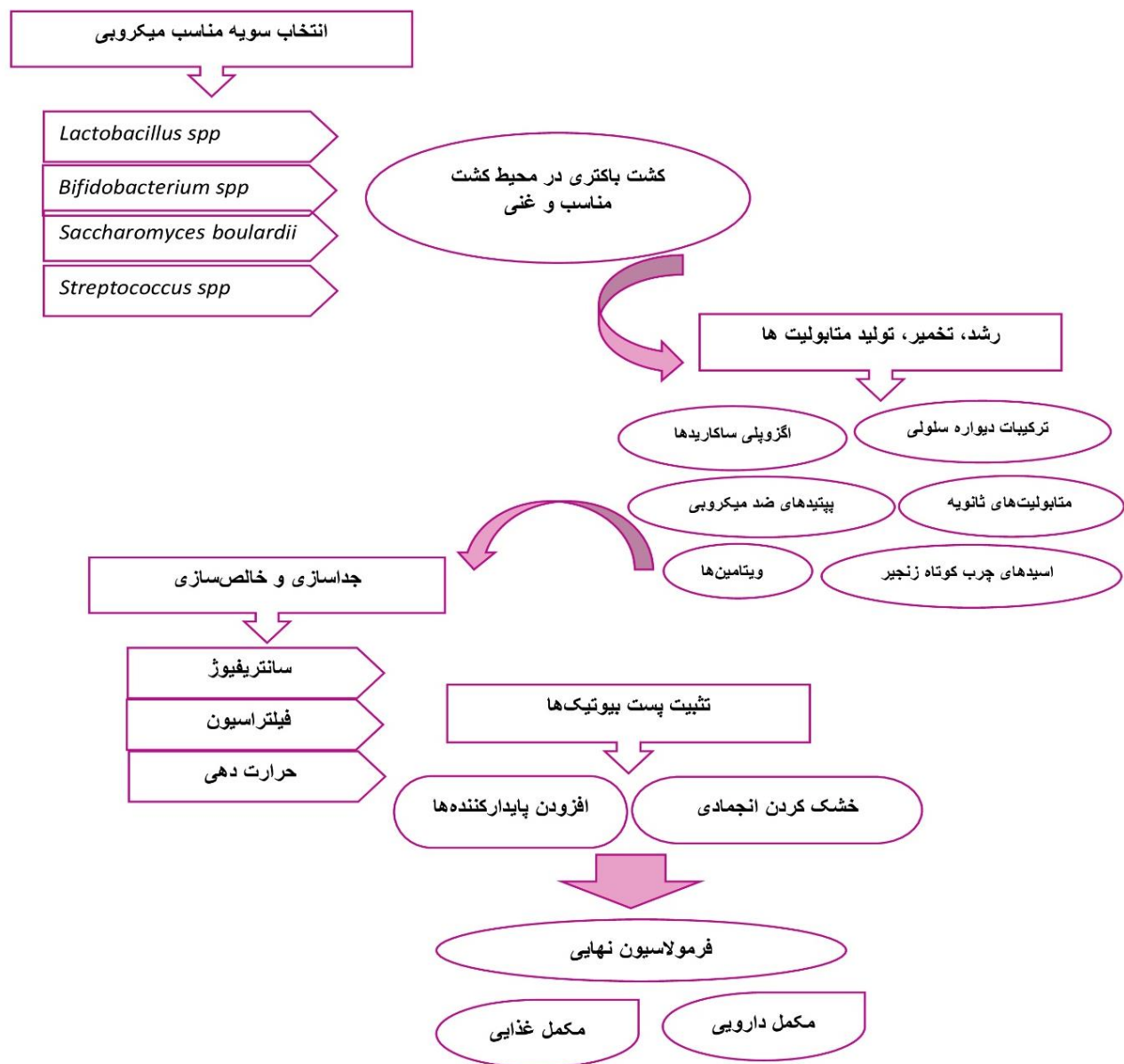
مراحل فرآیند تولید پست بیوتیک ها

تولید پست بیوتیک ها با انتخاب و استفاده از سویه های خاصی از باکتری ها یا مخمرهای مفید آغاز می شود. برخی از سویه های پروبیوتیک که معمولاً مورد استفاده قرار می گیرند عبارتند از *Bifidobacterium*، *Lactobacillus*، *spp*

Saccharomyces و *spp Streptococcus*. *spp boulardii* این سویه ها با توجه به خواص ضد میکروبی، تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره و دیگر متابولیت ها انتخاب می شوند (۱۶). تولید متابولیت های سلول های باکتریایی ممکن است با روش های فیزیکی (اختلال مکانیکی، عملیات حرارتی، تابش γ یا UV، فشار هیدرواستاتیک بالا، خشک کردن انجمادی، فراصوت) یا شیمیایی (غیرفعال سازی اسید) انجام شود (۷). میکروارگانیسم ها در محیط های کشت غنی از مواد مغذی که شامل کربوهیدرات ها، پروتئین ها و املاح معدنی است، رشد داده می شوند. در این مرحله، میکروارگانیسم ها شروع به تخمیر مواد موجود در محیط می کنند و ترکیبات زیست فعال مانند اسیدهای چرب، پپتیدهای ضد میکروبی، ویتامین ها و دیگر متابولیت های ثانویه را تولید می کنند (۱۰). طی فرآیند تخمیر، میکروارگانیسم ها رشد و تکثیر می کنند و در نتیجه ترکیبات متابولیکی مختلف تولید می شود. تخمیر معمولاً در دما و pH کنترل شده ای انجام می شود که شرایط بهینه برای تولید پست بیوتیک ها فراهم شود. بسته به نوع محصول نهایی و ترکیبات هدف، ممکن است این مرحله چندین ساعت تا چند روز طول بکشد (۲). حذف سلول های میکروبی و میکروارگانیسم ها: پس از تکمیل تخمیر، مرحله ای انجام می شود که طی آن سلول های زنده میکروبی از محیط کشت جدا می شوند. این کار از طریق فرآیندهای مختلفی مانند فیلتراسیون، سانتریفیوژ یا استفاده از حرارت انجام می شود (۲۹). هدف از این مرحله حذف تمام میکروارگانیسم های زنده

ترکیبات جلوگیری شود (۲۹). پس از تثبیت، پست‌بیوتیک‌ها فرموله شده و آماده استفاده در محصولات غذایی، مکمل‌های غذایی یا محصولات دارویی می‌شوند. در این مرحله، ممکن است پست‌بیوتیک‌ها با دیگر مواد افزودنی طبیعی یا مواد حامل ترکیب شوند تا از پایداری و قابلیت مصرف بهتر اطمینان حاصل شود (۳۰) (شکل ۱)

است تا تنها محصولات متابولیکی یا ترکیبات زیست‌فعال (پست‌بیوتیک‌ها) باقی بمانند. تثبیت پست‌بیوتیک‌ها: برای اطمینان از پایداری پست‌بیوتیک‌ها در طول زمان و در شرایط مختلف، این ترکیبات معمولاً تحت فرآیندهای تثبیتی قرار می‌گیرند. این فرآیندها ممکن است شامل خشک‌کردن انجمادی، اسپری درآینگ (خشک کردن پاششی) یا افزودن مواد پایدارکننده باشد تا از تجزیه یا کاهش فعالیت زیستی



شکل ۱. مراحل فرآیند تولید پست‌بیوتیک‌ها

عوارض احتمالی پست‌بیوتیک‌ها

هرچند پست‌بیوتیک‌ها به عنوان یک راه‌حل امیدوارکننده برای بهبود سلامت عمومی بدن مطرح شده‌اند، اما برخی از عوارض و نگرانی‌ها نیز در ارتباط با استفاده از آن‌ها وجود دارد. این عوارض بیشتر ناشی از عدم مطالعات کافی بر روی اثرات طولانی‌مدت آن‌ها و واکنش‌های متنوع افراد به مصرف این محصولات هستند. عدم توازن میکروبیوتا، مصرف بی‌رویه پست‌بیوتیک‌ها ممکن است باعث عدم تعادل در میکروبیوتای روده شود. این امر می‌تواند منجر به مشکلات گوارشی مانند نفخ، اسهال یا یبوست شود (۲). تأثیرات منفی بر برخی بیماری‌های زمینه‌ای، استفاده از پست‌بیوتیک‌ها در افرادی که به بیماری‌های خاصی مانند بیماری‌های خودایمنی یا مشکلات شدید گوارشی مبتلا هستند، ممکن است باعث تشدید علائم شود. به عنوان مثال، پپتیدهای ضد میکروبی ممکن است در برخی افراد باعث تحریک سیستم ایمنی و افزایش التهابات شوند (۱۰). نیاز به تنظیم دوز یکی از چالش‌های مهم در استفاده از پست‌بیوتیک‌ها تعیین دوز مناسب است. مصرف بیش از حد پست‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به اختلالات گوارشی یا مشکلات متابولیکی شود (۱۰). در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات ایمنی و سمیت احتمالی پست‌بیوتیک‌ها پرداخته است، نشان می‌دهد که در دوزهای مشخص، پست‌بیوتیک‌ها ایمن هستند، اما استفاده طولانی‌مدت و بیش از حد ممکن است باعث بروز مشکلاتی شود. این مطالعه توصیه می‌کند که تنظیم دوز و نظارت بر مصرف این محصولات ضروری است (۳۱). همچنین به اثرات سیستم ایمنی پست‌بیوتیک‌ها بر روی بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی و دیگر مشکلات التهابی پرداخته شده است. در این پژوهش به نقش پست‌بیوتیک‌ها در تنظیم پاسخ ایمنی و پیشگیری از برخی بیماری‌ها اشاره دارد، اما توصیه می‌کند که در بیماران با شرایط خاص باید با احتیاط استفاده شوند. مطالعه ای دیگر به بررسی اثرات پست‌بیوتیک‌ها بر

سلامت متابولیکی، به‌ویژه در کاهش مقاومت به انسولین و بهبود وضعیت دیابت نوع ۲ پرداخته است (۱۰). اگرچه نتایج مثبت بوده‌اند، ولی مطالعه هشدار می‌دهد که مصرف نادرست پست‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به مشکلات گوارشی و متابولیکی شود. همچنین مقاله‌ای به مطالعه اثرات پست‌بیوتیک‌ها بر میکروبیوم روده و تعامل آن با سایر باکتری‌های موجود در روده پرداخته است (۳۲). این تحقیق پیشنهاد می‌دهد که مصرف بیش از حد پست‌بیوتیک‌ها ممکن است تعادل میکروبی روده را به هم زده و منجر به مشکلاتی همچون نفخ و سوء هاضمه شود.

نتیجه‌گیری

با وجود اینکه پست‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک روش نوین برای بهبود سلامت عمومی بدن در حال رشد هستند، هنوز چالش‌هایی وجود دارد. از جمله این چالش‌ها می‌توان به فقدان تحقیقات بالینی گسترده، نیاز به تعیین دوز مؤثر و مطالعه بر روی گروه‌های مختلف سنی و جمعیتی اشاره کرد (۱۶). تحقیقات آینده باید بر بررسی تأثیرات طولانی‌مدت پست‌بیوتیک‌ها و مکانیزم‌های دقیق اثر آن‌ها متمرکز شود (۱۳). بنابراین، تحقیقات پست‌بیوتیک‌ها در انسان و بررسی و ارزیابی مزایای بالینی و غیر بالینی این مولکول‌های زیست فعال، نیاز روز است. فرمول‌بندی جدید پست‌بیوتیک‌ها ممکن است افق جدیدی را بگشاید که منجر به رویکردهای بالینی درمانی و پیشگیرانه جدیدی در بیماری‌هایی مانند دیابت، ترمیم زخم، داروهای کمکی درمانی و همچنین در حفظ زیستی مواد غذایی، بسته‌بندی مواد غذایی، کنترل بیوفیلم، غذای کاربردی، مکمل‌های غذایی، مواد غذایی دارویی و غیره شود. به طور خلاصه، تحقیقات پست‌بیوتیک‌ها مفهوم متابولیت‌های میکروبی را در حفظ سلامتی آشکار کردند (۳). پست‌بیوتیک‌ها به‌عنوان ترکیبات غیرزنده‌ای که اثرات قابل‌توجهی بر سلامت دارند، در حال تبدیل‌شدن به یکی از اجزای اصلی مکمل‌های غذایی و درمان‌های نوین هستند (۶).

شناسایی مکانیزم‌های دقیق عملکرد این ترکیبات و گسترش کاربردهای آن‌ها مورد نیاز است.

مزایای اصلی آن‌ها شامل ایمنی بالا، پایداری در شرایط مختلف، و اثرات اثبات‌شده بر تقویت سیستم ایمنی و کاهش التهاب است (۴). با این حال، تحقیقات بیشتری برای

منابع

- 1) Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC. Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2014;11(8):506
- 2) Wegh CA, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *International journal of molecular sciences*. 2019 Sep 20;20(19):4673.
- 3) Aggarwal S, Sabharwal V, Kaushik P, Joshi A, Aayushi A, Suri M. Postbiotics: From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 2022 Sep 21;6:887642.
- 4) Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2021 Sep;18(9):649-67.
- 5) Martín R, Langella P. Emerging health concepts in the probiotics field: streamlining the definitions. *Frontiers in microbiology*. 2019 May 21;10:1047
- 6) Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, Babu KS, Mundanat AS, Deliephan A, Deokar GS, Santivarangkna C, Nirmal NP. Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*. 2022 Oct 5;11(19):3094.
- 7) de Almada CN, Almada CN, Martinez RC, Sant'Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends in food science & technology*. 2016 Dec 1;58:96-114
- 8) Tsilingiri K, Rescigno M. Postbiotics: what else?. *Beneficial microbes*. 2013 Mar 1;4(1):101-7.
- 9) El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T. Emerging trends in “smart probiotics”: functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Frontiers in microbiology*. 2017 Sep 29;8:1889.
- 10) Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in food science & technology*. 2018 May 1;75:105-14.
- 11) Sánchez Macarro M, Ávila-Gandía V, Pérez-Piñero S, Cánovas F, García-Muñoz AM, Abellán-Ruiz MS, Victoria-Montesinos D, Luque-Rubia AJ, Climent E, Genovés S, Ramon D. Antioxidant effect of a probiotic product on a model of oxidative stress induced by high-intensity and duration physical exercise. *Antioxidants*. 2021 Feb 22;10(2):323.
- 12) Śliżewska K, Markowiak-Kopeć P, Śliżewska W. The role of probiotics in

- cancer prevention. *Cancers*. 2020 Dec 23;13(1):20.
- 13) Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*. 2020 Aug;12(8):2189.
- 14) Siciliano RA, Reale A, Mazzeo MF, Morandi S, Silvetti T, Brasca M. Paraprobiotics: A new perspective for functional foods and nutraceuticals. *Nutrients*. 2021 Apr 8;13(4):1225.
- 15) Shigwedha N. Probiotic cell fragments (PCFs) as “novel nutraceutical ingredients”. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2014 May 9;2(03):43.
- 16) Tomar SK, Anand S, Sharma P, Sangwan V, Mandal S. Role of probiotics, prebiotics, synbiotics and postbiotics in inhibition of pathogens. The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs. 2015:717-32.
- 17) Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular microbiology*. 2007 Feb;9(2):356-67.
- 18) Vera-Santander VE, Hernández-Figueroa RH, Jiménez-Munguía MT, Mani-López E, López-Malo A. Health benefits of consuming foods with bacterial probiotics, postbiotics, and their metabolites: a review. *Molecules*. 2023 Jan 27;28(3):1230.
- 19) Kim KW, Kang SS, Woo SJ, Park OJ, Ahn KB, Song KD, Lee HK, Yun CH, Han SH. Lipoteichoic acid of probiotic *Lactobacillus plantarum* attenuates poly I: C-induced IL-8 production in porcine intestinal epithelial cells. *Frontiers in Microbiology*. 2017 Sep 21;8:1827.
- 20) Aintablian A, Jaber DF, Jallad MA, Abdelnoor AM. The effect of *Lactobacillus plantarum* and bacterial peptidoglycan on the growth of mouse tumors in vivo and in vitro. *Am J Immunol* 2017; 13: 201–208.
- 21) Peluzio MD, Martinez JA, Milagro FI. Postbiotics: Metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. *Trends in Food Science & Technology*. 2021 Feb 1;108:11-26.
- 22) Liu CT, Chu FJ, Chou CC, Yu RC. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011 Apr 3;721(2):157-62.
- 23) De Vuyst L, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 1999 Apr 1;23(2):153-77.
- 24) Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, Babu KS, Mundanat AS, Deliephan A, Deokar GS, Santivarangkna C, Nirmal NP. Postbiotics: current trends in food and pharmaceutical industry. *Foods*. 2022 Oct 5;11(19):3094.
- 25) Darwish MS, Qiu L, Taher MA, Zaki AA, Abou-Zeid NA, Dawood DH, Shalabi OM, Khojah E, Elawady AA. Health benefits of postbiotics produced by *E. coli* Nissle 1917 in functional yogurt enriched with Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Fermentation*. 2022 Mar 16;8(3):128.
- 26) Al-Habsi N, Al-Khalili M, Haque SA, Elias M, Olqi NA, Al Uraimi T. Health Benefits of Prebiotics, Probiotics,

- Synbiotics, and Postbiotics. *Nutrients*. 2024 Nov 19;16(22):3955.
- 27) Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, Gil A. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*. 2017 May 28;9(6):555.
- 28) Rocchetti MT, Russo P, De Simone N, Capozzi V, Spano G, Fiocco D. Immunomodulatory activity on human macrophages by cell-free supernatants to explore the probiotic and postbiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* strains of plant origin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2024 Jun;16(3):911-26
- 29) Moradi M, Molaei R, Guimarães JT. A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 2021 Feb 1;143:109722.
- 30) Nataraj BH, Ali SA, Behare PV, Yadav H. Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial cell factories*. 2020 Dec;19:1-22
- 31) Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*. 2011 Aug;6(3):261-74.
- 32) Rad AH, Hosseini S, Pourjafar H. Postbiotics as dynamic biological molecules for antimicrobial activity: A mini-review. *Biointerface Res. Appl. Chem*. 2022;12(5):6543-56.
- 33) Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR. GanedenBC 30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. *BMC immunology*. 2010 Dec;11:1-4.
- 34) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 Oct 28;105(43):16731-6.
- 35) Robles-Vera I, Toral M, Romero M, Jiménez R, Sánchez M, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Antihypertensive effects of probiotics. *Current hypertension reports*. 2017 Apr;19:1-8.
- 36) Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes & nutrition*. 2011 Aug;6(3):261-74.
- 37) Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou EE, Saxami G, Ypsilantis P, Lampri ES, Simopoulos C, Kotsianidis I. *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PloS one*. 2016 Feb 5;11(2):e0147960.
- 38) Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-free supernatants from probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease colon cancer cell invasion in vitro. *Nutrition and cancer*. 2012 Aug 1;64(6):871-8.
- 39) Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International journal of food*

- microbiology. 2002 Feb 5;72(3):215-24.
- 40) Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Digestive diseases and sciences. 2000 Aug;45:1617-22.
- 41) Saide JA, Gilliland SE. Antioxidative activity of lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity. Journal of dairy science. 2005 Apr 1;88(4):1352-7.
- 42) Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. Journal of Dairy Science. 1992 Dec 1;75(12):3296-306.
- 43) Kim HS, Chae HS, Jeong SG, Ham JS, Im SK, Ahn CN, Lee JM. In vitro antioxidative properties of lactobacilli. Asian-australasian journal of animal sciences. 2005 Dec 7;19(2):262-5.
- 44) Amaretti A, Di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. Applied microbiology and biotechnology. 2013 Jan;97:809-17.
- 45) Zhang S, Liu L, Su Y, Li H, Sun Q, Liang X, Lv J. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. Afr J Microbiol Res. 2011 Dec 9;5(29):5194-201.
- 46) Gao X, Zhao J, Zhang H, Chen W, Zhai Q. Modulation of gut health using probiotics: the role of probiotic effector molecules. Journal of Future Foods. 2022 Mar 1;2(1):1-2.
- 47) Dey G, Mookherjee S. Probiotics-targeting new milestones from gut health to mental health. FEMS Microbiology Letters. 2021 Aug;368(15):fnab096.
- 48) Liu L, Zhu G. Gut-brain axis and mood disorder. Frontiers in psychiatry. 2018 May 29;9:223.
- 49) Ohsawa K, Nakamura F, Uchida N, Mizuno S, Yokogoshi H. *Lactobacillus helveticus*-fermented milk containing lactononadecapeptide (NIPPLTQTPVVVPPFLQPE) improves cognitive function in healthy middle-aged adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. International journal of food sciences and nutrition. 2018 Apr 3;69(3):369-76.
- 50) Kato-Kataoka A, Nishida K, Takada M, Suda K, Kawai M, Shimizu K, Kushiro A, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, Miyazaki K. Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress. Beneficial microbes. 2016 Mar 11;7(2):153-6.
- 51) Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. Biological psychiatry. 2013 Nov 15;74(10):720-6.
- 52) Zielińska D, Karbowski M, Brzezicka A. The role of psychobiotics to ensure mental health during the COVID-19 pandemic—a current state of knowledge. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2022 Sep 3;19(17):11022.
- 53) Du Y, Gao XR, Peng L, Ge JF. Crosstalk between the microbiota-gut-brain axis and depression. Heliyon. 2020 Jun 1;6(6).
- 54) Robles-Vera I, Toral M, Romero M, Jiménez R, Sánchez M, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Antihypertensive

- effects of probiotics. Current hypertension reports. 2017 Apr;19:1-8.
- 55) Tejada-Simon MV, Pestka JJ. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. Journal of food protection. 1999 Dec 1;62(12):1435-44
 - 56) Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008 Oct 28;105(43):16731-6.
 - 57) Kim HG, Lee SY, Kim NR, Lee HY, Ko MY, Jung BJ, Kim CM, Lee JM, Park JH, Han SH, Chung DK. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid down-regulated Shigella flexneri peptidoglycan-induced inflammation. Molecular immunology. 2011 Jan 1;48(4):382-91.
 - 58) Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2011 Sep;91(12):2284-91.
 - 59) Vidal K, Donnet-Hughes A, Granato D. Lipoteichoic acids from Lactobacillus johnsonii strain La1 and Lactobacillus acidophilus strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. Infection and Immunity. 2002 Apr;70(4):2057-64.
 - 60) Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, Yoshikai Y. Lipoteichoic acids from Lactobacillus strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. Clinical and Vaccine Immunology. 2003 Mar;10(2):259-66.
 - 61) Mileti E, Matteoli G, Iliev ID, Rescigno M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. PloS one. 2009 Sep 16;4(9):e7056.
 - 62) Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, Rescigno M. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. Gut. 2012 Jul 1;61(7):1007-15.
 - 63) Jensen GS, Benson KF, Carter SG, Endres JR. GanedenBC 30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. BMC immunology. 2010 Dec;11:1-4.
 - 64) Cicienia A, Santangelo F, Gambardella L, Pallotta L, Iebba V, Scirocco A, Marignani M, Tellan G, Carabotti M, Corazziari ES, Schippa S. Protective role of postbiotic mediators secreted by Lactobacillus rhamnosus GG versus lipopolysaccharide-induced damage in human colonic smooth muscle cells. Journal of clinical gastroenterology. 2016 Nov 1;50:S140-4.
 - 65) Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. Letters in Applied Microbiology. 2006 May 1;42(5):452-8.

- 66) Tiptiri-Kourpeti A, Spyridopoulou K, Santarmaki V, Aindelis G, Tompoulidou E, Lamprianidou EE, Saxami G, Ypsilantis P, Lampri ES, Simopoulos C, Kotsianidis I. *Lactobacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. *PloS one*. 2016 Feb 5;11(2):e0147960.
- 67) Ou CC, Ko JL, Lin MY. Antioxidative effects of intracellular extracts of yogurt bacteria on lipid peroxidation and intestine 407 cells. *Journal of Food and Drug analysis*. 2006;14(3):10.
- 68) Kim HS, Chae HS, Jeong SG, Ham JS, Im SK, Ahn CN, Lee JM. In vitro antioxidative properties of lactobacilli. *Asian-australasian journal of animal sciences*. 2005 Dec 7;19(2):262-5.
- 69) Zhang S, Liu L, Su Y, Li H, Sun Q, Liang X, Lv J. Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *Afr J Microbiol Res*. 2011 Dec 9;5(29):5194-201.
- 70) Amaretti A, Di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013 Jan;97:809-17.
- 71) Shin HS, Park SY, Lee DK, Kim SA, An HM, Kim JR, Kim MJ, Cha MG, Lee SW, Kim KJ, Lee KO. Hypocholesterolemic effect of sonication-killed *Bifidobacterium longum* isolated from healthy adult Koreans in high cholesterol fed rats. *Archives of pharmacal research*. 2010 Sep;33:1425-31.
- 72) Sawada H, Furushiro M, Hirai K, Motoike M, Watanabe T, Yokokura T. Purification and Characterization of an Antihypertensive Compound from *Lactobacillus casei*. *Agricultural and biological chemistry*. 1990 Dec 1;54(12):3211-9.
- 73) Nakamura F, Ishida Y, Sawada D, Ashida N, Sugawara T, Sakai M, Goto T, Kawada T, Fujiwara S. Fragmented lactic acid bacterial cells activate peroxisome proliferator-activated receptors and ameliorate dyslipidemia in obese mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016 Mar 30;64(12):2549-59.
- 74) Dinić M, Lukić J, Djokić J, Milenković M, Strahinić I, Golić N, Begović J. *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Frontiers in Microbiology*. 2017 Apr 6;8:594.
- 75) Sharma S, Singh RL, Kakkar P. Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food and chemical toxicology*. 2011 Apr 1;49(4):770-9.
- 76) Kareem KY, Hooi Ling F, Teck Chwen L, May Foong O, Anjas Asmara S. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut pathogens*. 2014 Jun;6:1-7

