بررسی اثر ضد قارچی عصاره و اسانس اسطوخودوس وتاثیر هر یک بر خصوصیات شیمیایی، میکروبی وحسی نان تست

شبنم حاجی حسینی[۱]، فاطمه حسینمردی*[۲]، علیرضا رحمن[۳]

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: alireza_rahman@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۹، پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۴/۱۲

چکیده

در تحقیق حاضر تاثیراسانس و عصاره‌های (آبی، الکلی و هیدروالکلی) اسطوخودوس بر کپک‌های *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم و آسپرژیلوس نایجر* بررسی شد .سپس غلظتی از اسانس و عصاره های به دست آمده باتوجه به حداقل غلظت کشندگی ومهارکنندگی آنها به فرمولاسیون نان تست اضافه و ویژگیهای شیمیایی،میکروبی و حسی(میزان پذیرش کلی) نمونه‌های نان در بازه های زمانی ۳، ۶ و۹ روز پس از تولید سنجش گردید. نمونه های نان تست تهیه شده شامل نمونه های شاهد، محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس، محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی، محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی و محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی بودند.دربررسی نتایج ملاحظه گردید که PH ورطوبت نمونه ها در بازه زمانی فوق در حد استاندارد بود. درخصوص حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی قارچهای موردبررسی ،کمترین میزان برای اسانس و وبیشترین میزان برای عصاره آبی بدست آمد ($p\leq$۰/۰۵). در روز سوم نگهداری نان، نمونه شاهد دارای بالاترین جمعیت میکروبی کل و دیگر نمونه‌های مورد بررسی فاقد جمعیت میکروبی بودند. در روز ششم، بالاترین جمعیت میکروبی کل و جمعیت کپک متعلق به نمونه شاهد بود و پس از آن در نمونه محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ونمونه محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی ملاحظه شد. پائین ترین جمعیت میکروبی کل و جمعیت کپک در روز ششم متعلق به نمونه محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس و در روز نهم در نمونه محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی مشاهده شد($p\leq$۰/۰۵). در تمامی روزهای مورد بررسی نمونه نان تست محتوی ۱/۶۶٪ عصاره آبی-اتانولی گیاه اسطوخودوس دارای بالاترین امتیاز حسی(پذیرش کلی) بود($p\leq$۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس، نان تست، اسانس، عصاره

مقدمه

با وجود پیشرفت های نوین در صنایع غذایی باهدف افزایش ایمنی و ماندگاری محصولات، همچنان بیماری ها و فساد میکروبی یکی از نگرانی های اصلی در زمینه کیفیت و ایمنی مواد غذایی محسوب می‌شود. جلوگیری از رشد باکتریهای پاتوژن و به تاخیر انداختن فساد قارچی، فاکتورهایی هستند که به طور قابل ملاحظه‌ای می‌توانند ایمنی و ماندگاری محصولات غذایی را تضمین نمایند (۱و۲).

از مهم‌ترین نان‌های حجیم که در ایران تولید می-شود می‌توان به نان‌های باگت، همبرگر، تست، دونات، شیرمال و نان‌های مخصوص رژیمی اشاره نمود. فرمولاسیون عمومی نان‌های حجیم، شامل آرد، آب، نمک، مخمر ، شکر، روغن، مواد افزودنی و بهبود دهنده می‌باشد که بر حسب نوع نان ،مقادیر آن‌ها متفاوت است. اگراین دسته از نان‌ها با آرد سبوس‌دار تهیه گردند، از ارزش غذایی بالایی برخوردار خواهند بود. فرآوری خمیر این نان‌ها با استفاده از خمیر مایه بوده و زمان استراحت مطلوب در تخمیر نان و تولید گاز کافی، باعث می‌شود خمیر کاملاً حجیم گردد. خمیر مایه به علت شکستن زنجیره‌های بلند نشاسته، هضم نان را برای دستگاه گوارش آسان می‌کند. علاوه بر موارد فوق، وجود فیبر بالا نیز در نان‌های مذکور سبب ارتقاء ارزش تغذیه‌ای آن‌ها شده است. برخی از مردم، به اشتباه، مغز نان‌های حجیم (مغذی‌ترین قسمت نان) را از آن جدا می‌کنند، البته با این وجود نان‌های مذکور ضایعات کمتری نسبت به سایر نان‌ها دارند (۳).

دمای مورد استفاده برای پخت نان ومحصولات نانوایی ، فرم رویشی باکتری ها و قارچ ها و اسپور آنها را غیر فعال می کند .فرآیند پخت میزان فعالیت آبی را نیز کاهش می دهد و شرایط رشد را برای باکتری های پاتوژن نامساعد می سازد. ولی پس از پخت، کپک ها ازمهم ترین عوامل فساد دراین محصولات هستند. فساد اغلب محصولات نانوایی در اثر رشد کپک هایی مثل *آسپرژیلوس*[1] و*پنی سیلیوم*[2] به وجود می آید (۴). اسپوراین کپک ها در هوا، خاک، روی غلات و در آرد وجود دارند که معمولا طی فرآیند پخت از بین می روند ولی پس از پخت، هنگام سرد شدن و قبل از بسته بندی از طریق هواو سبدهای حمل مواد غذایی مجددا آلوده شده و زمینه رشد کپکها فراهم می‌گردد (۵و۶). این کپکها بدلیل تولید ترکیبات سمی[3] ایمنی موادغذایی را نیزبه مخاطره می اندازند.

باتوجه به اینکه نان از مهم ترین واصلی ترین منابع تغذیه درایران است لزوم افزایش ماندگاری وجلوگیری از فساد ودورریز این محصول ، همواره موردتوجه بوده و محققین بدنبال استفاده از روشهای ایمن و موثر دراین خصوص میباشند. دردهه های اخیر استفاده از اسانسها وعصاره های گیاهی بعنوان یکی از روشهای موثر در جلوگیری از فساد میکروبی درموادغذایی مورد توجه قرارگرفته است.

بررسی ها نشان داده که بسیاری از اسانس‌ها و عصاره های گیاهی دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی کسیدانی و ضد سرطانی هستند.این مواد با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی مانع از تند شدن مواد غذایی شده و با فعالیت کشندگی و مهارکنندگی باکتری‌ها وقارچها باعث افزایش ماندگاری آن ها می-گردند (۷).

گیاه اسطوخودوس با نام علمی *لاوندلا انگوستیفولیا*[4] گیاهی چند ساله و همیشه سبز از تیره نعناعیان است. نام انگلیسی این گیاه *لاوندر*[5] میباشد.این گیاه بوی مطبوعی دارد که ناشی از اسانس آن است و بومی اروپا است . اسانس اسطوخودوس دارای حدود ۴۰ درصد استات لینالیل وترکیباتی نظیر اسیدبوتیریک،

[1] Aspergillus
[2] Penicillium
[3] Mycotoxin
[4] Lavandula angustifolia
[5] Lavender

اسیدپروپیونیک، اسیدوالریک و لینالول آزاد است .از دیگر ترکیبات این گیاه میتوان به تانن، کومارین،فلاونوئیدها و فیتواسترولها اشاره نمود.(۸)

این گیاه در ایـران بـه صورت خودرو رشد نمی کند وتهیه و تولید آن صرفا از طریق کشـت امکان‌پذیر است. بنابراین در تمام پهنه کشورمان به صورت کشت شده یافت می شود.

دربررسی تاثیر اسانس گل اسطوخودوس بر روی باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* [1] و *اشرشیا کلای* [2] مشاهده شدکه اسانس این گیاه به صورت رقیق نشده دارای اثر باکتری کشی بود و تاثیر بیشتری بر روی *اشرشیا کلای* و تاثیر کمتری بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. در تجزیه و شناسایی ترکیبات اسانس با دستگاه گاز کروماتوگراف / طیف سنج جرمی (GC/MS) دوازده ترکیب شناسایی شد. لینالول با ۳۶.۹ درصد بیشترین مقدار را در بین کل ترکیبات اسانس داشت. ترکیبات اصلی اسانس گل اسطوخودوس که دراین پژوهش شناسایی شدند عبارت بودند از لینالول (36.9%)، ترپینن-۴اول(4.19%)، کامفور(4.2%)، اورنئول-ب (11.5%) ، ۱.۸سینئول(16%). به نظر می رسد ترکیبات مونوترپنی باعث خاصیت ضد میکروبی روغن های اسانسی می شوند.(۹)

در مطالعه دیگری تاثیر بکارگیری ضایعات اسطوخودوس و ملیسا در فرمولاسیون نوعی نان بررسی شد ومشاهده شد که نان های حاوی ۲/۵ درصد ضایعات اسطوخودوس حجم بیشتری در مقایسه با نانهای معمولی داشتند و از طرف دیگر ماندگاری نان هایی با ۲/۵ و ۵ درصد اسطوخودوس درمقایسه با نمونه شاهد تا ۹۶ ساعت افزایش یافت و در دمای ۲۲، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد ومدت زمان ۴ روز فساد باکتریایی و یا قارچی درآنها مشاهده نشد ودرارزیابی حسی نمونه ها ، نان با ۲/۵ درصد اسطوخودوس بعنوان نمونه ترجیحی گزارش گردید(۱۰).

در بررسی تاثیرافزودن عصاره دارچین به نان بر کپک های عامل فساد ،ابتدا MIC و MFC کپک *آسپرژیلوس* گونه های *نایجر*[3] ، *فلاووس*[4] و *فومیگاتوس*[5] وکپک *پنی سیلیوم* گونه های *اکسپانسوم*[6] و *نوتاتوم*[7] و کپک *ریزوپوس* گونه *اوریزآ*[8] تعیین گردید. دراین بررسی مشاهده شد که دوز ۴۵ میلی گرم در میلی لیتر، تمامی قارچ های موردمطالعه را مهار کرد ولی تاثیر معکوس بر خواص حسی آن داشت و دوز ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر علاوه بر خواص ضد قارچی، بر تاخیر بیاتی نیز موثر ونمونه ترجیحی ارزیاب‌ها بود (۱۱).

با توجه به این که کپک‌ها مهمترین و عمده ترین عوامل فساد در انواع نان وسایر فرآورده های تهیه شده از غلات میباشند و همچنین به دلیل وجود ترکیبات شیمیایی با پتانسیل ضدقارچی مناسب در گیاه اسطوخودوس بررسی های آزمایشگاهی در جهت تعیین کیفیت و گستره تأثیر اسانس وعصاره این گیاه بر روی قارچها انجام گرفت. در واقع پژوهش حاضر به منظور ارزیابی اثر اسانس و عصاره‌های آبی و اتانولی اسطوخودوس بر رشد وفعالیت تعدادی از کپکهای عامل فساد درنان تست و همچنین بررسی تاثیرآنها بر ماندگاری و خواص ارگانولپتیکی این محصول اجرا شد.

مواد و روش ها

گیاه اسطوخودوس از دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس تهیه شد. اتانول ۹۶ درصد ، نرمال- هگزان ،توئین ۸۰،کلرامفنیکل و سولفات سدیم بدون آب برندهای معتبر ایرانی ومحیط کشتهای نوترینت آگار ، DRBC آگار وRPMI براث برند

[1] S.aureus
[2] E.coli

[3] Niger
[4] Flavus
[5] Fumigatus
[6] Expansum
[7] Notatum
[8] Rhizopus oryzae

سیگما از شرکتهای معتبر خریداری شدند.تمام مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی خریداری و محلولها به صورت تازه تهیه شدند.سویه های قارچی مورد نیاز ازشرکت سرم سازی رازی تهیه گردید.

تهیه عصاره های آبی، الکلی و هیدروالکلی

اسطوخودوس در شرایط مناسب و در سایه خشک شد وجهت تهیه عصاره و اسانس آسیاب گردید وپودر حاصله مورداستفاده قرارگرفت. عصاره آبی، الکلی و هیدروالکلی گیاه به روش هضم استحصال شد (۱۲) برای تهیه عصاره آبی، ۱۰۰ گرم پودر گیاه اسطوخودوس و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴۰تا۵۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکر دار قرار گرفت. برای تهیه عصاره الکلی از ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه وبرای تهیه عصاره آبی-الکلی مخلوط آب واتانول(۲۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه و ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر) مورداستفاده قرار گرفت و عصاره گیری در شرایط فوق الذکر انجام شد. عصاره های اولیه سانتریفوژ و از صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند. عصاره های بدست آمده، وارد دستگاه تقطیر در خلاء (روتاری) شدند و حلال آن‌ها به مدت یک ساعت تبخیر گردیدوعصاره‌های تغلیظ شده به ظروف تیره منتقل و در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه اسانس گیاه اسطوخودوس

برای تهیه اسانس از گیاه اسطوخودوس، ۱۶۰ گرم گیاه خشک شده، در دستگاه کلونجر قرار داده شد و پس از ۶ ساعت اسانس آن جدا شد. سپس توسط نرمال- هگزان اسانس از آب جدا شد و آبگیری توسط سولفات سدیم بدون آب انجام گرفت. اسانس آبگیری شده در ظرف تیره در بسته ،جمع آوری و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت بکارگیری در آزمونها ،اسانس با نسبت ۱ به ۱ با اتانول حاوی ۰.۵٪ توئین ۸۰ رقیق شدو از میکروفیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد (13)

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[1] و حداقل غلظت کشندگی[2]

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با استفاده از روش میکرودایلوشن براث تعیین شد. ابتدا از کشت تازه قارچ مورد آزمون سوسپانسیونی باغلظت $۲/۵\times۱۰^{۳}$ اسپور درمیلی لیتر تهیه گردید.

برای هر نمونه (عصاره/اسانس) از یک سری ۱۰ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله برای آزمایش رقتهای مختلف هر نمونه (۲ ،۴ ، 8 ،۱۶ ،۳۲ ،۶۴ ،۱۲۸ و ۲۵۶ میلیگرم بر میلی لیتر) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (بدون قارچ) و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (حاوی قارچ)در نظر گرفته شد.محیط کشت مورداستفاده در لوله ها RPMI بود.پس از تلقیح غلظتی معادل نیم مک فارلند از سویه قارچی، لوله ها در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز گرمخانه گذاری شدند. پس از گرمخانه گذاری، لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچ های تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند و پایینترین غلظتی که درآن کدورتی مشاهده نگردید و کاملا شفاف بود، به عنوان MICدر نظر گرفته شد این روش برای اسانس و عصاره ها و هر دو قارچ سه بار تکرار شد. با استفاده از روش رقت لوله ای، حداقل غلظت کشندگی اسانس، عصاره های آبی، اتانولی و آبی- اتانولی گیاه

[1]Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Fungicidal Concentration

اسطوخودوس تعیین شد. برای تعیین MFC عصاره ها ،از یک سری ۱۰ تایی لوله آزمایش استریل استفاده شد، ۸ لوله آزمایش برای رقتهای مختلف(۲ ،۴ ،۸ ،۱۶ ، 32 ،۶۴ ،۱۲۸ و ۲۵۶ میلیگرم بر میلی لیتر) هر عصاره ویک لوله به عنوان کنترل منفی و (بدون قارچ) و یک لوله به عنوان کنترل مثبت(حاوی قارچ) وبرای اسانس رقت های ۶.۴ ،۳.۲ ، ۱.۶ ،۰.۸ ،۰.۴ ،۰.۲ ،۰.۱ ،۰.۰۵ میلی گرم برمیلی لیتر و کنترل منفی ومثبت درنظرگرفته شد. تمام لوله های آزمایش به مدت ۵ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از طی زمان گرمخانه گذاری لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد قارچهای تلقیح شده مورد بررسی قرار گرفتند [۱۴]

تهیه نمونه های نان تست محتوی اسانس وعصاره ها

نمونه های نان تست، براساس ارزیابی نتایج حاصله از آزمونهای MIC وMFC، بامقادیر اسانس وعصاره که در جدول ۱ ارائه شده است تهیه شدند . مواداولیه مورداستفاده برای تهیه نان تست شامل آرد نان فانتزی، شکر، نمک ، خمیر مایه ، تخم مرغ، روغن و شیر بود .پس ازتهیه خمیر وسپری شدن زمان استراحت آن، چانه گیری وقالب گیری انجام شد و پخت نان در دمای۲۱۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت.نان های تست تولیدی، پس ازخنک شدن، درکیسه های پلی اتیلنی بسته بندی شدند.

جدول۱-نمونه های نان تست محتوی اسانس وعصاره های اسطوخودوس

کدتیمار	شرح تیمار
1	نان تست فاقد اسانس وعصاره
2	نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس
3	نان تست محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی
4	نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی
5	نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

تعیین pH و رطوبت نمونه ها

pH نمونه های نان مطابق روش استاندارد ملی ایران شماره ۳۷ و رطوبت نمونه ها مطابق روش استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۰۵ انجام شد.

آنالیز میکروبی نمونه ها

*مقدار*۲۵ گرم نمونه به صورت اسپتیک در ۲۲۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل به مدت ۶۰ ثانیه در داخل استومیکر (پالسی فایر) هموژن شد. رقت سازی به صورت ۱۰ برابر متوالی از نمونه‌های هموژن شده برای شمارش کلی میکروبی استفاده شد. کشت سطحی رقتهای تهیه شده ،درمحیط کشت نوترینت آگار انجام شد و پلیتها در دمای ۳۲ ^{o}C به مدت ۳ روز گرمخانه گذاری شدند. جهت شمارش کلی قارچ ،کشت سطحی رقتها در محیط کشت DRBC آگار و گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بمدت ۵ روز انجام شد. پلیت های نوترینت آگار حاوی ۳۰۰-۳۰ کلنی و پلیتهای DRBC آگار حاوی ۱۵۰-۱۰ کلنی جهت انجام محاسبات انتخاب گردیدند.نتایج به صورت $\log_{10}$ cfu/g گزارش شد (۱۵).

ارزیابی حسی نمونه ها

ارزیابی حسی تیمارهای مختلف نان با استفاده از آزمون هدونیک پنج نقطه ای با توجه به پارامترهای بافت، طعم، رنگ، بو و پذیرش کلی نمونه ها انجام شد. نمونه ها با کد سه رقمی کور (با استفاده از جدول اعداد تصادفی) به صورت طراحی بلوک کامل در اختیار ارزیاب ها (۳۰ نفر ارزیاب آموزش ندیده بین ۲۰ و ۳۵ سال از هر دو جنسیت به طور مساوی) قرار داده شدندو پرشسنامه مخصوص ارزیابی به ارزیاب ها ارائه شد. امتیازدهی ویژگی های حسی مورد ارزیابی درمحدوده اتا۵ صورت گرفت وبا درنظرگرفتن ویژگی اعداد براساس۱(بسیارنامطلوب)،۲ (تقریبا نامطلوب)،۳(تقریبا مطلوب)،۴ (مطلوب) و ۵ (بسیار مطلوب) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی ویژگی‌های کمی داده‌ها با توجه به وجود ۵ تیمار و۳ تکرار از آنالیز واریانس یک طرفه و همچنین به منظور مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵٪ جهت بررسی معنی‌دار بودن نتایج استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ورسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی

نتایج ارائه شده درجدول ۲ نشان میدهد که درخصوص حداقل غلظت مهارکنندگی کپک *آسپرژیلوس نایجر* ، کمترین میزان برای اسانس گیاه اسطوخودوس (۰/۱۳ mg/ml) و بیشترین مقداربرای عصاره آبی گیاه(۲۶/۶۶ mg/ml) بدست آمد ($p\leq$۰/۰۵). همچنین درمورد حداقل غلظت مهارکنندگی کپک *پنی سیلیوم اکسپانسوم* کمترین میزان برای اسانس گیاه (۰/۱۰ mg/ml) و بیشترین میزان برای عصاره آبی گیاه (۲۱/۳۳ mg/ml) بدست آمد($p\leq$۰/۰۵). در تمامی عصاره‌ها (آبی، الکلی و هیدروالکلی)، حداقل غلظت مهارکنندگی برای*پنی سیلیوم اکسپانسوم* به طور معنی داری پائین‌تر از *آسپرژیلوس نایجر بود*($p\leq$۰/۰۵). در خصوص اسانس گیاه اسطوخودوس، اختلاف معنی داری در حداقل غلظت مهارکنندگی کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر و پنی سیلیوم اکسپانسوم* مشاهده نشد ($p>$۰/۰۵). بعلاوه درخصوص حداقل غلظت کشندگی *آسپرژیلوس نایجر*،کمترین میزان برای اسانس(۰/۱۶ mg/ml) و بیشترین میزان برای

عصاره آبی گیاه (۴۲/۶۶ mg/ml) بدست آمد ($p\leq$۰/۰۵). درمورد حداقل غلظت کشندگی*پنی سیلیوم اکسپانسوم* ، کمترین میزان برای اسانس(۰/۱۰ mg/ml) و بیشترین میزان برای عصاره آبی گیاه (۲۶/۳۳ mg/ml) حاصل شد ($p\leq$۰/۰۵). در تمامی عصاره‌ها (آبی، الکلی و هیدروالکلی)،حداقل غلظت کشندگی *پنی سیلیوم اکسپانسوم* به طور معنی داری پائین‌تر از *آسپرژیلوس نایجر* بود($p\leq$۰/۰۵). در خصوص اسانس گیاه اسطوخودوس، گرچه حداقل غلظت کشندگی آسپرژیلوس نایژر بیشتر از پنی سیلیوم اکسپانسوم بود ولی این اختلاف معنی دار نبود ($p>$۰/۰۵). (جدول۲) لذا در تهیه تیمارهای نان تست، نتایج مربوط به حداقل غاظت کشندگی آسپرژیلوس نایژر مورد استفاده قرارگرفت و به ترتیب نمونه های حاوی ۰.۰۱۶درصد اسانس ،۱.۶۶درصد عصاره آبی-اتانولی ،۳.۲درصد عصاره اتانولی و ۴.۲۶درصد عصاره آبی تهیه گردید ودر نمونه شاهد شاهد از اسانس یا عصاره استفاده نشد.

جدول۲-حداقل غلظت مهارکنندگی وکشندگی اسانس وعصاره های اسطوخودوس برعلیه قارچهای مورد آزمون

	MIC(mg/ml)		MFC(mg / ml)	
	آسپرژیلوس نایجر	*پنی سیلیوم اکسپانسوم*	*آسپرژیلوس نایجر*	*پنی سیلیوم اکسپانسوم*
عصاره آبی	$26/66\pm0/11^{aA}$	$21/33\pm1/09^{aB}$	$42/66\pm1/11^{aA}$	$26/33\pm0/17^{aB}$
عصاره اتانولی	$21/33\pm0/11^{bA}$	16 ± 0.09^{bB}	$32\pm1/25^{bA}$	$21/33\pm0/11^{bB}$
عصاره آبی-اتانولی	$8\pm0/11^{cA}$	$6/66\pm0/12^{cB}$	$10/66\pm0/61^{cA}$	8 ± 0.0^{cB}
اسانس	$0/13\pm0/11^{dA}$	$0/10\pm 0/00^{dA}$	$0/16\pm0/01^{dA}$	$0/10\pm0/00^{dA}$

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در ستون و حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در سطر میباشد(p< ۰/۰۵)

شکل (۲) نشان دهنده نمودار مدول ذخیره و افت بر حسب تنش برشی و جدول (۲) نشان دهنده تنش در نقطه تلاقی دو منحنی مدول ذخیره و افت می‌باشد. با توجه به داده‌های این جدول به راحتی می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش درصد نشاسته اصلاح شده و کاهش روغن مقدار حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) کمترین غلظت یک ماده شیمیایی تعریف شده است که اثر کشندگی بر قارچ دارد و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، کمترین غلظت از ماده ضدمیکروبی است که موجب ممانعت از رشد یک میکروارگانیسم خاص می گردد. بدین معنی که میکروارگانیسم در محیط وجود دارد ولی قادر به تکثیر نیست. کاهش تعداد میکروارگانیسم در این شرایط به علت اثر کشندگی عصاره نبوده بلکه به سبب رسیدن میکروارگانیسم به فاز مرگ است و دیگر تکثیر پیدا نمی‌کند و تعداد آن کاهش می‌یابد (۱۶)

اسانس‌ها ماهیت آبگریز دارند و همین به آنها کمک می‌کند تا در غشاء و میتوکندی سلول نفوذ کرده و آنها را نفوذ پذیر کنند، در نتیجه نقل و انتقال یون‌ها با اختلال مواجه می‌شود و خروج و نشت محتویات سلولی اتفاق می-افتد که در نهایت منجر به مرگ سلول می‌گردد .از زمان شناخت ترپن‌های موجود در اسانس‌های گیاهی به عنوان فاکتورهای ضد میکروبی اولیه ، سازوکار عمل ضدمیکروبی این اسانس‌ها به آنها نسبت داده شد. ساختار فنل‌های طبیعی موجود در اکثر ترپن‌های بسیار فعال مانند تیمول، کارواکرول و اوژنول ، نظریه ارتباط میان نحوه فعالیت و ساختمان فنلی آنها را قابل قبول می‌سازد. نحوه فعالیت ترکیبات فنلی شامل دخالت در عمل غشاء سیتوپلاسمی و و نیروی محرکه پروتئین و انتقال یونها می باشد. در واقع بین

ساختار شیمیایی و میزان مواد موثره موجود در اسانس‌هاو خاصیت ضد میکروبی آنها همبستگی وجود دارد. معمولا اسانس‌های غنی از ترکیبات فنلی دارای خاصیت ضد-میکروبی قابل توجهی هستند. این ترکیبات هم در غشاء سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند.به طور کلی میزان بازدارندگی اسانس‌ها را می‌توان به حضور یک حلقه آروماتیک متصل به یک گروه قطبی نسبت داد. شاهد این ادعا استفاده گسترده از فنل ها، کلروفنل‌ها و ترکیبات وابسته به عنوان مواد ضد عفونی کننده می‌باشد. وجود گروه هیدروکسی فنل در ساختمان برخی ترکیبات موجود در اسانس‌ها باعث سهولت برقراری پیوند هیدروژنی با جایگاه های فعال آنزیمها شده و سبب بالا رفتن فعالیت بازدارندگی اسانس می‌شود(۱۷).در بررسی اثرات متقابل ضد باکتریایی اسانس رزماری و اسانس اسطوخودوس روی دو باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی در محیط آزمایشگاهی مشاهده شد که در رقت های ۱، ۱/۲ و۱/۴ اثر بازدارندگی گیاه اسطوخودوس بر روی پنج باکتری مختلف ، نسبت به گیاه رزماری بیشتر و معنی دار است. مقایسه میانگین اثرات متقابل قطر هاله عدم رشد بین باکتری ها و رقت های دو گیاه نشان داد که رقت ۱ اسانس ها بیشترین اثر بازدارندگی را بر *پروتئوس میرابیلیس*[16] دارد. همچنین مقایسه اثرات مختلف اسانس های اسطوخودوس و رزماری بر روی پنج باکتری مختلف با یکدیگر نشان داد که رقت ۱، ۱/۲ و ۱/۴ اسانس اسطوخودوس بیشترین اثر بازدارندگی را بر *پروتئوس میرابیلیس* دارد و اثر بازدارندگی آن نسبت به گیاه رزماری بیشتر و معنی دار بود. دربررسی میزان MIC و MBC اسانس اسطوخودوس و رزماری ملاحظه شد که اثر باکتریواستاتیک اسانس ها بر روی باکتری ها بجز *انتروباکتر فکالیس*[17] مشابه است البته اثر باکتری کشی اسانس ها بر روی تمام باکتری ها بجز باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* [18]مشابه بود(۱۸)

تحقیقات نشان داده است که قسمتهای هوایی گیاه اسطوخودوس نسبت به سایر بخشهای گیاه اثر ضد میکروبی قوی تری دارد(۱۹).البته مشخص شده که برگ این گیاه علاوه بر دی ترپن، حاوی مقادیر زیادی الکل های حلقوی، فلانوئیدها و اسیدهای آلی مثل کارنوزیک اسید و ساپونین است که در این بین ساپونین ها خاصیت ضد باکتریایی مؤثری دارند(۲۰).حاج هاشمی و همکاران با انجام آزمون های مختلف، اثر عصاره های آبی- الکلی و اسانس اسطوخودوس را به عنوان یک ماده ضد التهاب بررسی و اثبات کردند(۲۱) همچنین با انجام آزمایشات کروماتوگرافی مشخص شد که گیاه اسطوخودوس دارای ۲۶ ماده مختلف است که لینالیل استات و لینالول از جمله بیشترین مواد تشکیل دهنده اسانس اسطوخودوس می باشند(۲۰) جواد نژاد ومحمدی (۱۳۹۴) در بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس برداشت شده از تنکابن بیان نمودند که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (کوکسی گرم مثبت) و *اشریشیاکلی* (باسیل گرم منفی) اثر داشت به طوری که حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی به ترتیب 12/5 و25 میلی گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* به ترتیب ۲۵ و۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. نتایج حاصل نشان داد که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بیشتر برروی باکتری گرم مثبت اثر مهار کنندگی و کشندگی داشته است(۲۲) همچنین در بررسی خواص

[16] P.mirabilis

[17] E.faecalis

[18] S.epidermidis

ضدمیکروبی اسانس گیاه اسطوخودوس مشاهده شد که این اسانس بر باکتری های *اشرشیاکلای، شیگلا سونئی*[19] و *انتروباکترائروژنز*[20] موثر بوده است.کاندیدا البیکانس[21] نسبت به این اسانس حساس بوده و هاله های بازدارندگی کاملاً قابل مشاهده بود. در اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های گیاهی بر روی میکروارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های غذایی نشان می‌دهد که اثر ضدمیکروبی اینگونه اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است (۲۳).

همچنین درمطالعه ای که جهت بررسی ترکیبات شیمیایی اسانسهای اسطوخودوس تولیدی در کشور مولداوی ومحصولات جانبی پس از تولید ،واثرات ضدباکتریایی وضدقارچی آنها انجام شد ،طی سنجشهای مبتنی بر GC/MS، ۴۱ ترکیب شیمیایی بابیش از ۹۶ درصد از محتوای اسانسها شناسایی گردید. ترکیبات اصلی شناسایی شده شامل مونوترپنها(بیش از ۸۰درصد)،سزکویی ترپنها(۳تا۱۳درصد) و برخی ازترکیبات آلیفاتیک(۱تا۳درصد)بودند. اسانس اسطوخودوس به ترتیب فعالیت ضد باکتریایی خوبی در برابر *باسیلوس سوبتیلیس*[22]، *سودوموناس فلورسنس*[23]، *زانتوموناس کامپستریس*[24]، *اروینیا کاروتوورا* [25]با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و *اروینیا آمیلورا*[26]، *کاندیدا یوتیلیس* [27]با غلظت ۱۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نشان داد. مواد گیاهی اسطوخودوس و همچنین آب باقیمانده و عصاره‌های اتانولی بقایای مواد زائد جامد، فعالیت ضد میکروبی بالایی را در برابر *آسپرژیلوس نایجر،آلترناریا آلترناتا*[28] ،*پنی سیلیوم کریزژنوم*[29] *وسودوموناس آئروژینوزا* [30]به ترتیب در غلظتهای 0.75-6 میکروگرم برمیلی لیتر،۰.۱۲۵-۰.۰۸ میکروگرم برمیلی لیتر،۴-۰.۰۵ میکروگرم برمیلی لیتر داشتند (۲۴).

ارزیابی نتایج pH

نتایج سنجش pH نمونه های نان تست(جدول ۳) نشان داد که در روز سوم، نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) و در دیگرروزهای موردبررسی، نمونه ۱ (فاقد اسانس وعصاره) بالاترین میزان pH راداشت ($p\leq$۰/۰۵). در روز سوم، پائین-ترین میزان pH متعلق به نمونه های ۴ (محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی) و ۵ (محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) بود.در روز ششم، نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) و در روز نهم نمونه ۵ (محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) پائین‌ترین pH راداشت ($p\leq$۰/۰۵). با گذشت زمان، از روز سوم تا روز ششم، در نمونه شاهد، افزایش معنی دار pH مشاهده شد و تا روز نهم به طور معنی داری کاهش یافت ($p\leq$۰/۰۵). با گذشت زمان، از روز سوم تا روز ششم، در نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس)، کاهش قابل ملاحظه pH مشاهده شد که تا روز نهم به طور معنی داری افزایش یافت ($p\leq$۰/۰۵). در دیگر نمونه های مورد بررسی با گذشت زمان از روز سوم تا روز ششم کاهش قابل ملاحظه pH مشاهده شدولی اختلاف معنی داری در میزان pH نمونه های روز ششم ونهم مشاهده نگردید($p>$۰/۰۵).

طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۸۸۸، میزان pH بایستی در محدوده5-6/5 باشد که در تحقیق حاضر، میزان pH در تمامی نمونه های مورد بررسی در محدوده استاندارد قرار داشت (۲۵).

در بررسی اثر توام اسانس مرزه و اینولین در تغییرات pH نان تافتون طی ۱۲ روز نگهداری نیز تغییر معنی داری در pHتیمارها مشاهده نشد و در محدوده استانداردبودند

[19] *Sh. sonnie*
[20] *E.aeorogenus*
[21] *C. albicans*
[22] B.subtilis
[23] P.flourescence
[24] X.campesteris
[25] E.carotovora
[26] E.amylovora
[27] C.utilis
[28] A.alternata
[29] P.crysegenum
[30] P.auroginosa

(۲۷).

جدول ۳ -تغییرات pH نمونه های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی)گیاه اسطوخودوس با گذشت زمان

کدتیمار	زمان نگهداری(روز)		
	روز سوم	روز ششم	روز نهم
1	$5/91\pm0/06^{bB}$	$6/06\pm0/350^{aA}$	$5/36\pm0/20^{dC}$
2	$6/02\pm0/00^{aA}$	$5/34\pm0/12^{cC}$	$589\pm0/15^{aB}$
3	$5/78\pm0/00^{cA}$	$5/51\pm0/12^{bB}$	$5/50\pm0/10^{bcB}$
4	$5/65\pm0/00^{dA}$	$5/51\pm0/12^{bB}$	$5/53\pm0/15^{bB}$
5	$5/66\pm0/00^{dA}$	$5/48\pm0/15^{bB}$	$5/44\pm0/26^{cB}$

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در ستون و حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در سطر میباشد($p<$ ۰/۰۵) کد ۱ :نان تست فاقد اسانس وعصاره(شاهد)، کد۲ :نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس ، کد۳ :نان تست محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی ا، کد۴ : نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ، کد۵ :نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

رطوبت

نتایج سنجش رطوبت نمونه های نان تست (جدول۴) نشان داد که در تمام بازه های زمانی، تاثیر تیمار بر میزان رطوبت نمونه‌های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی) گیاه اسطوخودوس معنی دار بود ($p\leq$۰/۰۵). در روز سوم، بالاترین میزان رطوبت متعلق به نمونه شاهد ونمونه ۳ (محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی) بود و درمیزان رطوبت تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در روز ششم، نمونه ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) و در روز نهم نمونه ۵ (۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) بالاترین میزان رطوبت راداشتند ($p\leq$۰/۰۵). در تمامی نمونه های مورد بررسی، با گذشت زمان، میزان رطوبت نمونه ها به طور معنی داری کاهش یافت($p\leq$۰/۰۵) که علت این امر بیاتی و از دست دادن آب توسط نان ها با گذشت زمان می باشد.البته در روز ششم و نهم نگهداری رطوبت کلیه تیمارها بطورمعنی داری از نمونه شاهد بیشتر بود که نشان دهنده تاثیر افزودن اسانس وعصاره ها به نان و تاخیر در کاهش رطوبت آن درحین نگهداری بود .

براساس بررسی های فراوان در زمینهٔ ماندگاری نان، عامل اصلی ضایعات صنعت نان، پدیدهٔ بیاتی به شمار می آید. در صنعت پخت و نانوایی از طریق حفظ رطوبت بیشتر، می توان فرآیند بیاتی را به تعویق انداخت تا بافت تازهٔ نان حفظ گردد.رطوبت موجود در نان نقش مهمی در بروز بیاتی ایفا می کند. بروز بیاتی در پوسته نان در ارتباط با مهاجرت رطوبت از بافت مغز نان به پوسته نان می باشد که منجر به بافتی چرم مانند می گردد در حالی که بیاتی مغز نان در نتیجه بروز تغییرات فیزیکوشیمیایی در نشاسته رخ می دهد(۲۸).طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۷۰۵، میزان رطوبت نان تست می بایست بین ۲۱-۲۷ درصد وزنی باشد که در تمامی تیمارهای مورد بررسی در محدوده استاندارد قرار داشت(۲۹)در بررسی اثر توام اسانس مرزه و اینولین در تغییرات رطوبت نان تافتون طی ۱۲ روز نگهداری تفاوت معنی داری در رطوبت تیمارها مشاهده شد و همه تیمارها

رطوبتی بالاتر ازنمونه شاهد داشتند البته در محدوده استاندارد بودند (۲۷). در مطالعه شیخ االاسلامی و همکاران نیز افزودن کنسانتره کشمش به نان تافتون سبب حفظ میزان رطوبت در محدوده 18/56-25/49درصد شده بود (۳۰).

جدول۴ -تغییرات رطوبت نمونه های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی)گیاه اسطوخودوس با گذشت زمان

کدتیمار	زمان نگهداری(روز)		
	روز سوم	روز ششم	روز نهم
1	$27/49\pm0/06^{aA}$	$24/28\pm0/350^{dB}$	$23/56\pm0/20^{dC}$
2	$26/18\pm0/00^{cA}$	$25/92\pm0/12^{cB}$	$24/53\pm0/15^{cC}$
3	$26/58\pm0/00^{cA}$	$26/46\pm0/12^{aB}$	$25/0\pm0/10^{bC}$
4	$26/26\pm0/00^{cA}$	$26/13\pm0/12^{bA}$	$24/96\pm0/15^{bB}$
5	$26/36\pm0/00^{cA}$	$26/40\pm0/15^{aA}$	$25/50\pm0/26^{aB}$

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در ستون و حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در سطر میباشد($p< ۰/۰۵$)
کد ۱ :نان تست فاقد اسانس وعصاره(شاهد)، کد۲ :نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس ، کد۳ :نان تست محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی ا، کد۴ : نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ، کد۵ :نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

ارزیابی نتایج شمارش جمعیت میکروبی کل

در روز سوم نگهداری نانهای تست، نمونه شاهد دارای بالاترین جمعیت میکروبی کل بود ($p\leq۰/۰۵$) و دیگر نمونه-های مورد بررسی فاقد جمعیت میکروبی بودند. در روز ششم، بالاترین جمعیت میکروبی کل متعلق به نمونه شاهد بود و پس از آن در نمونه‌های ۴ (محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی) و ۵ (محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) مشاهده شد($p\leq۰/۰۵$). در روز نهم، جمعیت میکروبی کل در نمونه شاهد غیر قابل شمارش به دست آمد و پس از آن بالاترین جمعیت میکروبی کل در نمونه ۵ (محتوی۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) ملاحظه شد ($p\leq۰/۰۵$). پائین ترین جمعیت میکروبی کل در روز ششم متعلق به نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) بود و در روز نهم در نمونه ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) مشاهده شد($p\leq۰/۰۵$). که علت این امر را می توان به تفاوت در خواص ضد میکروبی اسانس و عصاره های مورد مطالعه نسبت داد. در تمامی نمونه های مورد بررسی، با گذشت زمان، جمعیت میکروبی کل نمونه ها به طور معنی داری افزایش یافت($p\leq۰/۰۵$) که این میزان افزایش در نمونه شاهد با بیشترین میزان شیب و در نمونه ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) با کمترین میزان شیب بود که علت این امر را می توان به ترکیبات ضد میکروبی موجود در اسانس نسبت داد.باتوجه به نتایج بدست آمده ملاحظه میشود که با افزودن اسانس وعصاره ها جمعیت میکروبی کل در روز نهم

نگهداری بمیزان قابل توجهی کمتراز نمونه شاهد بود وافزایش ماندگاری تیمارها را موجب گردید(جدول ۵).

همچنین(2018) ,.Vasileva *et al* در بررسی تاثیر بکارگیری ضایعات اسطوخودوس و ملیسا در فرمولاسیون نوعی نان دریافتند ماندگاری نان هایی با ۲/۵ و ۵ ٪ اسطوخودوس در مقایسه با نمونه های کنترل تا ۹۶ ساعت افزایش یافت در و هیچ فساد باکتریایی و یا قارچی مشاهده نشد(۱۰).

در بررسی خواص ضدمیکروبی اسانس گیاه اسطوخودوس موجود در پوشش گیاهی استرالیا نیز مشاهده شد که این اسانس بر روی تمام باکتری های موجود در این تحقیق از جمله *اشرشیا کلای،شیگلا سونئی و انتروباکترائروژنز* موثر بوده است. تنها باکتری که حساسیتی نسبت به اسانس های اسطوخودوس نشان نداد باکتری *سودوموناس ائروژینوزا* بود. *کاندیدا البیکانس نیز* نسبت به این اسانس ها حساس بود و هاله های بازدارندگی کاملاً قابل مشاهده بود(۲۳) دربررسی بررسی تاثیر اسانس مرزه در افزایش ماندگاری و کیفیت نان تافتون، نتایج حاصل از آزمونهای نان در طی ۱۲ روز نگهداری در یخچال نشان داد که با افزایش غلظت اسانس مرزه، ماندگاری میکروبی نان افزایش می یابد به طوریکه تیمار حاوی ۰/۰۷ درصد اسانس مرزه با کمترین تغییرات pHتوانست ماندگاری میکروبی نان را تا روز ۹ با تعداد کپک و مخمر cfu/gr 70حفظ نماید (۲۷) همچنین در بررسی اثر افزودن اسانس بابونه شیرازی و اسانس بهارنارنج در کیک طی ۷۵ روز نگهداری مشاهده شد که نمونه حاوی اسانس بابونه و اسانس بهار نارنج در غلظت ۰/۱۵ ٪ در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی داری دارای جمعیت کلی میکروبی کمتر و جمعیت کپک ومخمر کمتری بود.(۳۱)

در بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره ها و اسانس اسطوخودوس مشاهده شده که میزان و اندازه محدوده بازدارندگی آنها در برابر انواع قارچ و باکتری کاملاً به گونه ی گیاه وابسته است و در خصوص باکتری ها این گیاه تاثیر بیشتری بر باکتری های گرم مثبت دارد(۳۲)

جدول ۵ – تغییرات در شمارش جمعیت میکروبی کل(log cfu/gr) نمونه های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی)گیاه اسطوخودوس با گذشت زمان

کدتیمار	زمان نگهداری(روز)		
	روزسوم	روزششم	روزنهم
1	$1/91\pm0/06^{bC}$	$2/55\pm0/350^{aB}$	غیرقابل شمارش
2	$0\pm0/00^{aC}$	$0/73\pm0/12^{dB}$	$2/03\pm0/15^{cA}$
3	$0\pm0/00^{aC}$	$1/54\pm0/12^{cB}$	$1/81\pm0/10^{dB}$
4	$0\pm0/00^{aC}$	$1/81\pm0/12^{bB}$	$2/75\pm0/15^{bA}$
5	$0\pm0/00^{aC}$	$1/88\pm0/15^{bB}$	$3/72\pm0/26^{aA}$

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در ستون و حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در سطر میباشد($p<$ ۰/۰۵)

کد ۱ :نان تست فاقد اسانس وعصاره(شاهد)، کد۲ :نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس ، کد۳ :نان تست محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی ا، کد۴ : نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ، کد۵ :نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

ارزیابی نتایج شمارش کپک

درتحقیق حاضر در روز سوم نگهداری، نمونه شاهد دارای بالاترین جمعیت کپک بود($p\leq$۰/۰۵) و دیگر نمونه های مورد بررسی فاقد کپک بودند. در روز ششم، بالاترین جمعیت قارچ متعلق به نمونه شاهد و پس از آن نمونه ۴ (محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی) بود($p\leq$۰/۰۵) و نمونه‌های ۲(محتوی ۰.۰۱۶ ٪ اسانس) و۳(محتوی ۱.۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) فاقد کپک بودند. در روز نهم، جمعیت کپک در نمونه شاهد غیر قابل شمارش به دست آمد و پس از آن بالاترین جمعیت به ترتیب در نمونه‌های ۵ (محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) و ۴ (محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی) مشاهده شد ($p\leq$۰/۰۵). پائین‌ترین جمعیت کپک در روزهای ششم و نهم، متعلق به نمونه های ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) و ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) بود ($p\leq$۰/۰۵). در تمامی نمونه های مورد بررسی، با گذشت زمان، جمعیت کپک در نمونه ها به طور معنی داری افزایش یافت($p\leq$۰/۰۵) که این میزان افزایش در نمونه شاهد با بیشترین میزان شیب و در نمونه‌های۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) و ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) با کمترین میزان شیب بود. که علت این امر را می توان به تفاوت در خواص ضد قارچی اسانس و عصاره های مورد مطالعه نسبت داد. باتوجه به نتایج بدست آمده ملاحظه میشود که با افزودن اسانس وعصاره ها جمعیت کپک در روز نهم نگهداری بمیزان قابل توجهی کمتراز نمونه شاهد بود وافزایش ماندگاری تیمارها را موجب گردید(جدول ۶).نتایج تحقیق حاضر همراستا با یافته های Vasileva وهمکاران(۲۰۱۸) است که در بررسی تاثیر استفاده از ضایعات اسطوخودوس و ملیسا در فرمولاسیون نوعی نان دریافتند که در نان های حاوی ۲/۵٪ و۵ ٪ درصد ضایعات اسطوخودوس در مقایسه با نان‌های کنترل در دمای ۲۲، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز هیچ فساد باکتریایی و یا قارچی مشاهده نشد(۱۰). Doudi و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره دارچین بر کپک های عامل فساد نان را مورد بررسی قرار دادند و MIC و MFC در برابر *آسپرژیلوس* گونه های *نایجر و فلاووس و فومیگاتوس و پنی سیلیوم اکسپانسوم، پنی سیلیوم نوتاتوم و ریزوپوس اوریزآ* بررسی شد. دوز ۴۵ میلی گرم در میلی لیتر تمامی قارچ های موردمطالعه را مهار کرد. و دوز ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر علاوه بر خواص ضد قارچی بر تاخیر بیاتی نیز موثر بود(۱۱). خاکی (۱۳۸۹) در بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس بابونه شیرازی و اسانس بهارنارنج بر ماندگاری کیک طی ۷۵ روز نگهداری بیان نمودند که نمونه حاوی اسانس بابونه و اسانس بهار نارنج در غلظت ۰/۱۵ ٪ در مقایسه با نمونه شاهد به طور معنی داری دارای جمعیت قارچی کمتری هستند. اما فعالیت این دو اسانس از فعالیت پتاسیم سوربات به نوان ماده ضد میکروبی ضعیف تر است(۳۱). کردساردویی و همکاران نیز (۱۳۸۹) در تحقیقی خواص ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی در کیک را مورد ارزیابی قرار دادند و بیان نمودند که در حضور اسانس ،میزان قارچ ها به صورت قابل ملاحظه ای در مقایسه با نمونه شاهد کاهش پیدا کرده و بین سطوح غلظتی 1000ppmو1500ppm اسانس استفاده شده، تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵مشاهده نشد.(۳۳).

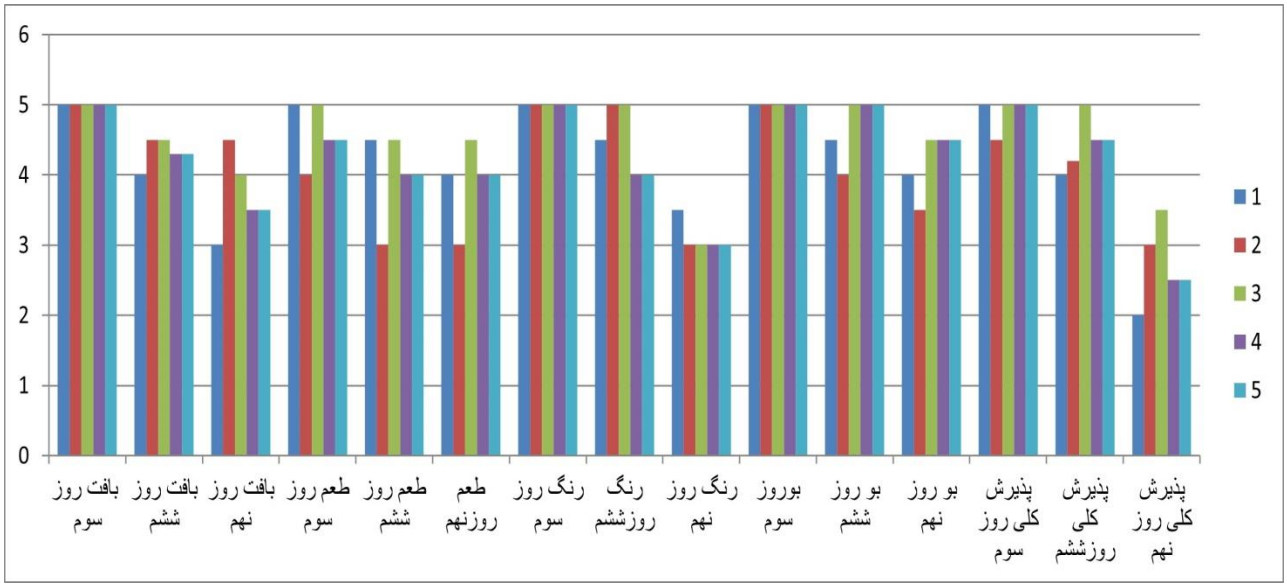
جدول ۶- تغییرات در شمارش(log cfu/gr) جمعیت کپک نمونه های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی)گیاه اسطوخودوس با گذشت زمان

کدنمونه	زمان نگهداری		
	روزسوم	روز ششم	روز نهم
1	$1/32\pm0/06^{aA}$	$2/23\pm0/35^{aB}$	غیرقابل شمارش
2	$0\pm0/00^{bA}$	$0\pm0/00^{cB}$	$0/91\pm0/15^{Bc}$
3	$0\pm0/00^{bA}$	$0\pm0/00^{cB}$	$0/59\pm0/10^{bC}$
4	$0\pm0/00^{bA}$	$1/47\pm0/07^{bB}$	$2/01\pm0/15^{abB}$
5	$0\pm0/00^{bA}$	$1/37\pm0/10^{bB}$	$3/06\pm0/26^{aB}$

حروف کوچک متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در ستون و حروف بزرگ متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار در سطر میباشد($p<$ ۰/۰۵)
کد ۱ :نان تست فاقد اسانس وعصاره (شاهد)، کد۲ :نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس ، کد۳ :نان تست محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی ، کد۴ : نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ، کد۵ :نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

ارزیابی نتایج آزمون حسی:

به طور کلی ویژگیهای حسی مواد غذایی، در انتخاب یک محصول بسیار حائز اهمیت میباشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اثر نوع تیمار بر ویژگیهای حسی مورد آزمون در این مطالعه معنی دار بود.در تمامی نمونه های مورد بررسی، با گذشت زمان، امتیاز نمونه ها به طور معنی داری کاهش یافت($p\leq$۰/۰۵). در روز سوم نگهداری امتیاز نمونه ها ازنظر بافت ،رنگ وبو تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. ولی ازنظر طعم ،نمونه ۳(محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) ونمونه۱ (شاهد)بیشترین امتیاز راکسب نمودند. در روز ششم نگهداری،نمونه۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) بالاترین امتیاز بافت،طعم،رنگ وبو را داشت. بعلاوه نمونه های ۱(شاهد)و۵(محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) نیز ازنظر بوامتیازی مشابه امتیاز نمونه ۳ کسب کردند وازنظررنگ نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) امتیازی مشابه امتیاز نمونه ۳ (محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) کسب نمود.. در روز نهم نگهداری نیز ازنظر طعم ،رنگ و بو نمونه۳(محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) دارای بالاترین امتیاز بود واز نظر طعم ،این نمونه امتیازی مشابه امتیاز نمونه ۱(شاهد)راکسب نمودولی ازنظر بافت،نمونه ۲ (محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس) بیشترین امتیاز را داشت ($p\leq$۰/۰۵). بالاترین امتیاز پذیرش کلی نیز در کلیه روزهای نگهداری متعلق به نمونه ۳ بود . البته در روز سوم ،امتیاز پذیرش کلی نمونه های ۱(شاهد) ، ۴ (محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی) و ۵(محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی) مشابه نمونه ۳ بود ($p\leq$۰/۰۵) درمجموع، ارزیابها نمونه ۳ را بعنوان تیمار برتر انتخاب نمودند(نمودار ۱).باتوجه به نتایج بدست آمده ،نمونه ۳(محتوی ۱/۶۶ ٪ عصاره آبی-اتانولی) در کلیه روزهای نگهداری از بالاترین امتیاز حسی برخورداربود و بعنوان تیمار برتر انتخاب شد. خاکی (۱۳۸۹) در بررسی اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس بابونه شیرازی و اسانس بهارنارنج بر ماندگاری کیک بیان نمودند که کیک های حاوی اسانس بهارنارنج در غلظت ۰/۱۵٪ دارای امتیاز بیشتری نسبت به بقیه نمونه ها بود[۳۱].Das و همکاران(۲۰۱۳) در بررسی تاثیر پودر رازیانه در نان اذعان نمودند که با افزودن در ویژگی های حسی نیز مقادیر ۵ و ۷ درصد پودر رازیانه امیتاز بالاتری را کسب نمودند(۳۱). همچنینVasileva وهمکاران (۲۰۱۸)در بررسی تاثیر بکارگیری ضایعات اسطوخودوس و ملیسا در فرمولاسیون نوعی نان دریافتند مشتری ها نان با ۲/۵ ٪ اسطوخودوس را ترجیح دادند(۱۰).



نمودار ۱- تغییرات درامتیاز حسی نمونه های نان تست حاوی اسانس و عصاره های (آبی، الکلی و هیدروالکلی)گیاه اسطوخودوس با گذشت زمان .کد ۱ :نان تست فاقد اسانس وعصاره (شاهد)، کد۲ :نان تست محتوی ۰/۰۱۶ ٪ اسانس ، کد۳ :نان تست محتوی ۱/۶۶٪عصاره آبی-اتانولی ، کد۴ : نان تست محتوی ۳/۲ ٪ عصاره اتانولی ، کد۵ :نان تست محتوی ۴/۲۶ ٪ عصاره آبی

نتیجه گیری

در سال‌های اخیر بکارگیری ترکیبات ضدمیکروبی با منشاء طبیعی در سیستمهای غذایی بسیار رواج یافته است.با توجه به اینکه فساد کپکی نان یکی از دلایل دور ریز این ماده غذایی ارزشمند است،در این پژوهش با استفاده از اسانس و عصاره‌های (آبی، الکلی و هیدروالکلی) گیاه اسطوخودوس درنان تست و بررسی خواص ضد میکروبی آن‌ها بر علیه کپک‌های شایع پنی‌سیلیوم اکسپانسوم و آسپرژیلوس نایجر و استفاده از مجموع آزمونهای میکروبی، شیمیایی وحسی مشاهده شد که در تمامی روزهای مورد بررسی نمونه ۳ (نان تست محتوی ۱/۰۱۶٪عصاره آبی-اتانولی گیاه اسطوخودوس) دارای بالاترین امتیاز حسی(پذیرش کلی) بود($p\leq ۰/۰۵$) و به عنوان تیمار برتر انتخاب شد. بعلاوه اسانس وعصاره این گیاه اثرات ضدقارچی قابل ملاحظه ای داشتند.

References

1. Petrou S, Tsiraki M, Giatrakou V, Savvaidis IN. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. International journal of food microbiology. 2012;156(3):264-71.
2. Giatrakou V, Ntzimani A, Savvaidis IN. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. Food microbiology. 2010;27(1):132-6.

3. Movahed S, Khalatbari Mohseni G, Ahmadi Chenarban H. Investigation of the effect of potato flour and xanthan hydrocolloid on dough rheology properties and toast quality. Iranian Food Science and Technology. 2017;14(66):85-94.
4. Vytřasová J, Přibáňová P, Marvanova L. Occurrence of xerophilic fungi in bakery gingerbread production. International Journal of Food Microbiology. 2002 Jan 30;72(1-2):91-6.
5. Feng W, Zheng X. Essential oils to control Alternaria alternata in vitro and in vivo. Food control. 2007 Sep 1;18(9):1126-30..
6. Guynot ME, Ramos AJ, Sanchis V, Marín S. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). International journal of food microbiology. 2005 May 25;101(2):161-8.
7. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of food microbiology. 2007 Jun 10;117(1):112-9.
8. Palá-Paúl J, Brophy JJ, Goldsack RJ, Fontaniella B. Analysis of the volatile components of Lavandula canariensis (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. Biochemical Systematics and Ecology. 2004 Jan 1;32(1):55-62.
9. Rasouli I,Rezaei M.B. Investigating the antimicrobial activity and chemical composition of essential oils of lavender and sage. Journal of Kerman University of Medical Sciences. 2018 ;7(4):173-181. https://sid.ir/paper/216/fa[In persian]
10. Vasileva I, Denkova R, Chochkov R, Teneva D, Denkova Z, Dessev T, Denev P, Slavov A. Effect of lavender (Lavandula angustifolia) and melissa (Melissa Officinalis) waste on quality and shelf life of bread. Food Chemistry. 2018 Jul 1;253:13-21.
11. Doudi M, Setorki M, Rezayatmand Z. Effects of aqueous extract of Cinnamomum verum on growth of bread spoilage fungi. International Journal of Medical Research & Health Sciences. 2016 Jan 1;5(1):162-71.
12. Ahmad I, Beg AZ. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. Journal of ethnopharmacology. 2001 Feb 1;74(2):113-23.
13. Blažeković B, Yang W, Wang Y, Li C, Kindl M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knežević S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of Lavandula× intermedia 'Budrovka'and L. angustifolia cultivated in Croatia. Industrial crops and products. 2018 Nov 1;123:173-82.
14. Amirsharifi M, Jamili S, Larijani K, Mashinchian Moradi A, Amini K. Investigation of Antibacterial and antifungal activities of the extract marine algae Sargassum glaucescens.. isfj; 25 (3) :113-120 .URL:http://isfj.ir/article-1-1538-en.html[iN [In persian]

15. Karim g. Microbiological examination of foods. 5 th ed .Tehran University Publications.2008.
16. Molinski TF. Antifungal compounds from marine organisms. Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents. 2004 Sep 1;3(3):197-220.
17. Ahmadi L, Mirza M, Sefidkan F. Natural essential oils: extraction, quantitative and qualitative identification, application. 1st ed. Research Institute of Forests and Pastures.1997. [In persian]
18. Ahmadi Asbchin S, Mostafapur M.J. Anti-bacterial interactions Rosemary (Rosmarinus officinalis) and essential oils of lavender (Lavandula stoechas) on two Grampositive and three Gram-negative bacteria in vitro. Journal of molecular and cellular research(Iranian Journal of Biology)[Internet]. 2018;31(2):177-187. https://sid.ir/paper/248527/en.[In persian]
19. Mahon CR, Manoselis G. Textbook of Diagostic Microbiology. 2th ed. W.B Saunders Company. 2000; Chapter 3: 62 – 95.
20. Kosaka K, Yokoi T. Carnosic acid, a component of rosemary (Rosmarinus officinalis L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. Biological and pharmaceutical bulletin. 2003;26(11):1620-2.
21. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sharif B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of Lavandula angustifolia Mill. Journal of ethnopharmacology. 2003 Nov 1;89(1):67-71.
22. Javadenjad A, Mohammadi M. Investigating the antibacterial activity of the ethanol extract of lavender plant harvested from Tenkaban. The first national conference on new microbiology findings, Lahijan. 2014, https://civilica.com/doc/740549.[In persian]
23. Moon T, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown Lavandula spp. International Journal of Aromatherapy. 2006 Jan 1;16(1):9-14.
24. Ciocarlan A, Lupascu L, Aricu A, Dragalin I, Popescu V, Geana EI, Ionete RE, Vornicu N, Duliu OG, Hristozova G, Zinicovscaia I. Chemical composition and assessment of antimicrobial activity of lavender essential oil and some by-products. Plants. 2021 Sep 3;10(9):1829..
25. Iranian Standard and Industrial Research Institute, 2014. Microbiology of flat bread and bulk and semi-bulk bread, characteristics and test method, Iran Standard No. 19888, 1-21.[In persian]
26. Shafii Jam R, Lakzadeh L. Investigating the effect of savory essential oil and inulin in increasing the shelf life and quality of Tufton bread. Food industry researches (agricultural knowledge) 2021, 31(2):89-100. https://sid.ir/paper/954688/fa[In persian]

27. Besbes E, Jury V, Monteau JY, Le Bail A. Effect of baking conditions and storage with crust on the moisture profile, local textural properties and staling kinetics of pan bread. LWT-Food Science and Technology. 2014 Oct 1;58(2):658-66.
28. Iranian Standard and Industrial Research Institute, ۲۰۱۰. Grain and its products, measurement method, moisture, Iran Standard No. 2705.1-27 .[In persian]
29. Sheikholeslami Z, Karimi M, Hejrani T. Utilization concentrate of smoked and sun dried raisin as a natural humectant on quality and shelf life of taftoon bread. Journal of Food and Bioprocess Engineering. 2018 Dec 1;1(2):103-8. [In persian]
30. Khaki,M,.Barzegar,M,. and Sahari, M,. Evaluation of antioxidant and antimicrobial effect of chamomile essential oil (Matricaria chamomilla L.) and spring orange (Citrus bigadia Duh) on cake shelf life. Journal of Medicinal Plants. 2012 ;11(43),10page.
31. Czerwińska E, Szparaga A. Antibacterial and antifungal activity of plant extracts. Rocznik Ochrona Środowiska. 2015;17(1), 209-229.
32. Kordsardoui H,Barzegar M,Sahari M. A. 1389, Evaluation of antifungal properties and sensory characteristics of Shirazi thyme essential oil in cake. National Conference of Medicinal Plants, Sari,2010. https://civilica.com/doc/342078[In persian]

Survey of antifungal effect of extract and essential oil of Lavender and the effect of each on physicochemical and sensory properties of toast bread

Shabnam Haji Hosseini[1], Fatemeh Hosseinmardi [2*], Alireza Rahman[3]
1. M.S, Department of of Food Science & Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Lecturer, Department of Food Science & Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Assistant professor , Department of Food Science & Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
* Corresponding Author: fh5074@yahoo.com
Received: 19/5/2023, Accepted: 3/7/2023

Abstract

In the current research, the effect of lavender essential oil and extracts (aqueous, alcoholic and hydroalcoholic) on Penicillium expansum and Aspergillus niger molds was investigated. Then, a concentration of the obtained essential oil and extracts according to their Minimum lethal and Inhibitory concentration was added to the bread formulation. Chemical, Microbial and Sensory characteristics (General Acceptance Rate) of bread samples were measured in time intervals of 3, 6 and 9 days after production. The prepared toast samples included control, containing 0.016% essential oil containing 1.66% aqueous-ethanolic extract, containing 3.2% ethanolic extract , containing 4.26% aqueous extract . In surveying the results , pH and Humidity of the samples were observed within the standard range during storage. Regarding the Minimum Inhibitory and Lethal Concentration of the investigated fungi, the lowest and highest amount was obtained for the essential oil and the aqueous extract respectively ($p\leq0.05$). On the third day of bread storage, the control sample had the highest total microbial population and the other studied samples had no microbial population. On the sixth day, the highest total microbial population and mold population belonged to the control sample, and after that, the sample contained 3.2% ethanol extract and 4.26% aqueous extract. The lowest total microbial population and mold population were observed on the sixth day in the sample containing 0.016% essential oil and on the ninth day in the sample containing 1.66% water-ethanol extract ($p\leq0.05$). The sample of toast containing 66.1% water-ethanol extract of lavender plant had the highest sensory score (General Acceptance) ($p\leq0.05$).

Keywords: Lavender, Toast, Essential oil, Extract