

بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره آبی مرزنگوش و اثر آن بر زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم در ماست پروبیوتیک کم چرب

فریده وحیدمقدم^{1*}، سید علی مرتضوی²، زهره قلعه موسیانی³

- 1- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
- 2- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، مشهد، ایران
- 3- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: 1396/04/24

تاریخ دریافت: 1395/08/05

چکیده

با توجه به بروز و گسترش انواع بیماری ها، استفاده از فرآورده های غذایی فراسودمند، همچون محصولات پروبیوتیک، به دلیل دارا بودن اثرات سلامت بخش، بیش از پیش ضروری به نظر می رسد. گیاهان دارویی که غنی از ترکیبات فنلی و معطر هستند، علاوه بر اینکه می توانند به عنوان بهبود دهنده رشد پروبیوتیک عمل نمایند، می توانند به عنوان آنتی اکسیدان های طبیعی نیز مورد استفاده قرار بگیرند. در همین راستا از عصاره آبی مرزنگوش در غلظت های 3% و 5% وزنی/وزنی در ماست حاوی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم استفاده گردید. (نمونه شاهد بدون افزودن عصاره مذکور در نظر گرفته شد.) و اثر عصاره بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک مورد نظر و فعالیت آنتی اکسیدانی در بازه های زمانی 1، 7، 14 و 21 روز در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تعداد باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست با افزودن عصاره مرزنگوش نسبت به ماست شاهد به طور معنی دار افزایش یافت ($p < 0/05$). تعداد باکتری های پروبیوتیک مورد نظر، با گذشت زمان نگهداری، بطور معنی دار کاهش یافتند ($p < 0/05$). در حالیکه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در نمونه های مورد بررسی ابتدا روند نزولی معنی دار ($p < 0/05$) و در ادامه روند صعودی داشت ($p < 0/05$). در پایان دوره نگهداری در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی تیمارهای شاهد و A_1 تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($p > 0/05$) در حالیکه در تیمار A_2 از این میزان به طور معنی دار کاسته شد ($p < 0/05$).

واژه های کلیدی: عصاره مرزنگوش، فعالیت آنتی اکسیدانی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم، ماست پروبیوتیک.

1-مقدمه

امروزه به دلیل تغییر در رژیم غذایی و کمبود تحرک و افزایش میزان استرس، انسان به بیماری های گوناگون نظیر بیماری های قلبی، انواع سرطان از قبیل سرطان سینه، سرطان پروستات، سرطان کولون و همچنین پوکی استخوان مبتلا می شود (34). با ایجاد چنین وضعیتی در سه دهه اخیر، به ویژه در کشور های توسعه یافته، نوعی گرایش به خود پایی از نظر تغذیه ای پدید آمده است (7). به همین دلیل مواد غذایی تولید شده اند که حاوی ترکیباتی هستند که علاوه بر ارزش تغذیه ای دارای اثراتی مثبت بر روی سلامت انسان می باشند از این محصولات غذایی تحت عنوان مواد غذایی فراسودمند یاد می شود (34). پروبیوتیک ها به عنوان یکی از نوظهورترین و محبوب ترین فرآورده های فراسودمند، از اهمیت خاصی در این ارتباط برخوردارند. طبق تعریف FAO، باکتری های پروبیوتیک عبارتند از میکروارگانیسم های زنده ای که پس از مصرف، در روده ساکن شده و از طریق بهبود میکرو فلور طبیعی روده، اثرات مفیدی در سلامتی انسان بر جای می گذارند (34). از جمله باکتری های پروبیوتیک می توان به لاکتوباسیلوس پلانٹاروم اشاره کرد که دارای فواید بی شماری از جمله اثر کاهش دهندگی کلسترول و فیبرینوژن خون، اثر آنتی پاتوژنیک در نتیجه تولید باکتریوسینی تحت عنوان پلانٹاریسین و کاهش نفخ شکم در سندروم روده تحریک پذیر در انسان می باشد. با وجود اینکه انواع مختلفی از فرآورده های لبنی به عنوان حامل های پروبیوتیک استفاده گردیده اما ماست و شیر های تخمیری جزء حامل های اصلی پروبیوتیک محسوب می گردند (15 و 35). گیاهان دارویی و ادویه ها عوامل بسیار مهمی در حفظ سلامت بشر در طی زمان و در فرهنگ های مختلف بوده اند. ادویه ها و گیاهان دارویی در غذا به عنوان ایجاد کننده طعم مورد استفاده قرار می گیرند. همچنین دارای ویژگی های ضد میکروبی، ضد اکسیداسیون، دارویی و تغذیه ای هستند (6). اخیراً تمرکز تحقیقات بر روی پیدا کردن ترکیبات پری بیوتیک در عصاره های گیاهی قرار گرفته است. اما در مطالعات

اندکی ویژگی های کاربردی و پری بیوتیکی عصاره های گیاهی در ماست نشان داده شده اند. عصاره های گیاهی خواص سلامت بخش از قبیل اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی را نشان می دهند. بنابراین ترکیبات پری بیوتیک جدید که از عصاره های گیاهی مشتق شده اند جهت رشد باکتری های مفید مورد نیاز می باشند (32). در پژوهشی اثر عصاره برگ زیتون بر رشد و متابولیسم باکتری بیفیدوباکتریوم اینفنتیس و لاکتوباسیلوس بروی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیبات پلی فنلیک موجود در عصاره برگ زیتون، تحریک رشد و متابولیسم باکتری های پروبیوتیک را در پی دارد (21). در مطالعه دیگری به بررسی اثر عصاره گیاهی بر روی زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پرداخته شد و علت افزایش تعداد این باکتری در ماست های حاوی عصاره های گیاهی نسبت به ماست شاهد، توانایی بافری بالاتر ماست های غنی شده با عصاره های گیاهی گزارش شد (22). گزارش شده است که ظرفیت بافری یک پارامتر حیاتی در رشد باکتری های ماست در طول تخمیر است علاوه بر این ترکیبات مغذی موجود در مخلوط ماست نیز می تواند رشد را تحت تاثیر قرار دهند (46). در پژوهشی تأثیر عصاره زرشک بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تأثیر مقادیر مختلف عصاره زرشک (4% و 5%) بر روی رشد باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه های ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده غنی شده با عصاره زرشک در طی مدت زمان نگهداری 21 روزه در روزهای 1، 7، 14 و 21 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که افزودن عصاره زرشک تأثیر معنی داری در روند افزایشی رشد باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی مدت زمان نگهداری داشته است (6). در تحقیق دیگری سه فاکتور اسانس های آویشن و آلوئه ورا و مدت زمان نگهداری در دمای 4°C در روزهای اول، یازدهم و بیست و یکم را بر روی رشد و بقای

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) در دوغ پروبیوتیک طعم دار مورد بررسی قرار دادند. اضافه کردن اسانس آلوئه ورا و آویشن باعث افزایش تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گردید (2). در مطالعه دیگری اثر افزودن اسانس کاکوتی و زمان نگهداری بر زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئیرا بررسی کردند. مقدار اسانس کاکوتی در محدوده 0-6 میکروگرم بر لیتر و زمان در محدوده 6-54 روز بود. نتایج حاصل نشان داد که اسانس کاکوتی بسته به درصد مورد استفاده و مدت زمان نگهداری باعث کاهش یا افزایش زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی شد. به طوریکه با افزایش غلظت اسانس از 0 به 3 $\mu\text{g/L}$ تعداد لاکتوباسیلوس کازئی 2/75 سیکل لگاریتمی افزایش یافت اما افزایش بیشتر غلظت اسانس از 3 به 6 میکروگرم بر لیتر، جمعیت پروبیوتیک ها 2/2 سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد ($p < 0/05$). در طول زمان نگهداری نیز تعداد پروبیوتیک ها به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0/05$) (5). علاوه بر ارزش تغذیه ای ماده غذایی، نگهداری ماده غذایی و جلوگیری از فساد آن نیز می بایست مورد توجه قرار بگیرد. می دانیم که اکسیداسیون مشکل اصلی فساد شیمیایی است که منجر به از بین رفتن کیفیت تغذیه ای، رنگ، طعم، بافت و سلامت ماده غذایی می شود (12). علاوه بر آن، رادیکال های آزاد حاصل از اکسایش، هنگامیکه در زنجیره غذایی قرار می گیرند تاثیرات ناگواری بر سلامت انسان می گذارند (44). در حقیقت با توسعه علم بیوشیمی نقش موثر رادیکال های آزاد و اکسیژن فعال در بیماری هایی مثل تصلب شراین، سرطان و پیری زود رس مورد توجه است. مناسب ترین راه برای جلوگیری از اکسیداسیون لیپید ها و یا حفاظت در برابر آسیب های ناشی از رادیکال های آزاد استفاده از آنتی اکسیدان هاست (22). در میان آنتی اکسیدان ها، آنتی اکسیدان های سنتزی با توجه به مشخص شدن اثرات سویی که بر روی مصرف کنندگان دارند از قبیل ایجاد اثرات سمی و مختل نمودن فعالیت آنزیم های کبدی و ایجاد سرطان (10) و کاهش رشد سلول ها (43)،

کاربردشان در دنیا در حال محدود شدن است (10). با این اوصاف تلاش ها برای یافتن جایگزین های طبیعی به جای آنتی اکسیدان های سنتزی امری منطقی به نظر می رسد (19). در همین راستا در در دهه های اخیر در جهت حذف یا کاهش ترکیبات سنتزی، تحقیقات زیادی برای جایگزینی مواد شیمیایی با طبیعی انجام شده و در گزارش های متعددی بیان شده که گیاهان دارویی، دارای ترکیبات با خاصیت آنتی اکسیدانی و یا آنتی رادیکالی می باشند (25). گروه بزرگی از این ترکیبات، متابولیت های ثانویه گیاهان با ساختمان های پلی فنلی هستند که در مواجهه گیاهان با اشکال فعال اکسیژن تولید می شوند (31). این ترکیبات تقریباً در تمام گیاهان و تمام قسمت های آن ها می توانند ساخته شوند (41). مرزنگوش وحشی با نام علمی *Origanum vulgare L.* از خانواده نعنائیان، گیاه پایا و علفی به ارتفاع حدود 100 سانتی متر با ساقه راست و کرک دار و به رنگ سبز مایل به خاکستری تا سبز زیتونی است. برگ ها دارای پهنکی تخم مرغی یا بیضوی، نوک تیز یا نوک گرد به رنگ سبز تیره و پوشیده از کرک در سطح تحتانی پهنک و در کناره های آزاد آن است. اندام های دارویی گیاه شامل تمام قسمت های هوایی گیاه به ویژه برگ های خشک شده آن است (10، 40 و 48). تحقیقات و مطالعات فراوانی اثر فعالیت های ضد قارچی، ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس گونه های مختلف سرده مرزنگوش (به دلیل وجود تیمول و کارواکرول موجود در آن ها) را نشان داده اند (20 و 29). در تحقیقی در باغ گیاه شناسی ملی ایران، مهمترین ترکیبات غالب در مرزنگوش (*O. vulgare*) بتاکاریوفیلین (24/5%)، -D-جرماکرن (15/2%) و ترانس - ساینین هیدرات (9%) بود (13). فلاونوئیدها بخش مهمی از آنتی اکسیدان های طبیعی این گیاه را در بر می گیرند. مهم ترین ترکیبات دارویی مرزنگوش از گروه فلاونوئید هایی مانند کوئرستین، لوتئولین، آپی ژنین، دیوسمتین و اسیدهای فنلی شامل رزمارینیک اسید و تری ترپنوئید هایی مانند ارسولیک اسید و اولتانولیک اسید و ترپنوئید های فنلی مانند کارواکرول

نشان داد پودر عصاره برگ توت سفید در ماست قالبی تخمیر شده در مقایسه با نمونه کنترل، سبب افزایش قابل توجهی در رشد باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس شد. ماست های حاوی عصاره گیاهی برگ توت سفید به طور قابل توجهی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر نسبت به ماست شاهد بود (32). هدف از این تحقیق بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و نیز زنده ماننی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم زیرگونه پلانتروم در ماست پروبیوتیک حاوی عصاره آبی مرزنگوش بود.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد مصرفی

باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم زیرگونه پلانتروم (PTCC 1745) به صورت سوش خالص از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و استارتر ماست به صورت DVS از شرکت CHR-HANSEN دانمارک، شیر کم چرب (1/5% چربی) از شرکت میهن، شیر خشک بدون چربی از شرکت Saya اکرین، محیط کشت MRS-Agar، هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک از شرکت Merck آلمان و Bile و رادیکال DPPH از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا خریداری شد.

2-2- تهیه عصاره آبی

گیاه مورد بررسی از باغ گیاهشناسی دارویی فیروزه تهیه شد. سپس در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی و تعیین هویت گردید. پس از تأیید گونه گیاهی به دور از نور مستقیم خورشید و در دمای اتاق خشک شد. سپس برگ های خشک شده توسط آسیاب برقی به پودری با ذرات کاملاً ریز تبدیل شدند. در مرحله بعد به ازای هر گرم پودر گیاه خشک، 10 میلی لیتر آب مقطر استریل که دمای آن، 80-70 °C رسیده است، اضافه شد. سپس مخلوط داخل ارلن که با فویل پوشانده شده بود داخل بن ماری 70-60 °C به مدت 24 ساعت قرار داده شد (39). در نهایت با استفاده از سانتریفیوژ (rpm

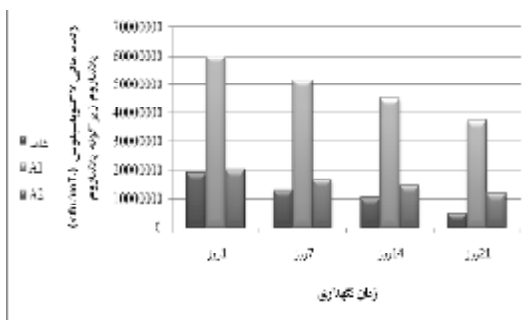
و تیمول و تانن ها، هیدروکوئینون ها و فنل های گلیکوزیدی مانند آربوتین، متیل آربوتین، ویتکسین، اورینتین و تیمونین می باشد (26). در تحقیقی به ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک طعم دار غنی شده با عصاره زرشک پرداخته شد و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست پروبیوتیک همزده و قالبی و نمونه شاهد در طی مدت زمان نگهداری 21 روزه در روزهای صفر، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم از طریق روش مهار رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد افزودن عصاره زرشک تأثیر معنی دار در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست داشت (2). در پژوهش دیگر فعالیت آنتی اکسیدانی بالای ماست حاوی عصاره های ریحان، نعناع و شوید به ترکیبات فیتوشیمیایی منحصر به فرد گیاهی (ترکیبات فنولی) و متابولیت های حاصل از فعالیت باکتریها نسبت داده شد (11). در مطالعه دیگری تأثیر افزودن عصاره آبی چای سبز، سفید و سیاه را بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک در طی بیست و یک روز نگهداری در دمای 4 °C مورد بررسی قرار دادند. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از مهار رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفت. عصاره برگ چای به میزان 2% w/v به ماست افزوده شد. نتایج نشان داد که ماست حاوی چای سبز بالاترین محتوای فنلی را دارد و بعد از آن ماست حاوی چای سفید و ماست حاوی چای سیاه قرار داشتند و کمترین میزان مهار DPPH مربوط به ماست حاوی چای سیاه بود که دارای درصد مهار 97/71% می باشد و بالاترین میزان درصد مهار مربوط به ماست حاوی چای سبز با مهار 98/53% بود (رفرنس). در بررسی دیگری به بررسی خصوصیات عملکردی ماست قالبی تخمیر شده با مواد بالقوه پری بیوتیک در عصاره برگ توت سفید (Cudraniatricuspidata) پرداخته شد. در این پژوهش پودر عصاره گیاهی به میزان 2% w/w مورد استفاده قرار گرفت و سپس زنده ماننی استارتر و فعالیت آنتی اکسیدانی در روزهای 1، 7، 14، 21 و 28 ارزیابی شد. نتایج

2-5- روش آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام شد در سه تکرار انجام شد. آنالیز واریانس و آزمون دانکن برای تجزیه و تحلیل داده ها به کار برده شد. نرم افزار آماری SAS 9.3 مورد استفاده قرار گرفت.

3- نتایج

زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم در نمودار 1، جمعیت باکتری پروبیوتیک مورد نظر در طول زمان نگهداری در نمونه های ماست مشخص شده است. پس از گذشت 21 روز از دوره نگهداری بالاترین میزان زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم مربوط به تیمار A1 بود که با سایر تیمارها تفاوت معنی دار داشت ($p < 0/05$) و کمترین تعداد این باکتری پروبیوتیک مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت ($p < 0/05$). در واقع می توان گفت، در پایان دوره نگهداری، در کلیه تیمارها جمعیت باکتری پروبیوتیک به طور معنی دار کاهش یافته است ($p < 0/05$).



نمودار 1- مقادیر زنده مانی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم در نمونه های مورد بررسی در طول زمان نگهداری

A1: 3% عصاره مرزنگوش، A2: 5% عصاره مرزنگوش، شاهد: فاقد عصاره

3-1- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

در نمودار 2، میزان مهار رادیکال DPPH و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی در نمونه های ماست نشان داده شده است. بالاترین میزان مهار رادیکال DPPH مربوط به A2 است که

2000، 15 دقیقه) عصاره آبی به دست آمد که در واقع همان فاز رویی تمیز بود (2) سپس عصاره بدست آمده با فیلتر سر سرنگی 0/45µm استریل شد (16).

2-3- تهیه ماست پروبیوتیک طعم دار

ابتدا، شیری که به لحاظ ماده خشک بدون چربی (10/5w/w) استاندارد شده بود در دمای 90°C به مدت 5 دقیقه پاستوریزه شد و تا دمای 43°C سرد شد. سپس استارتر ماست (لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس و استریتوکوکوس ترموفیلوس) به همراه استارتر پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم)، به شیر اضافه شد. در همین مرحله عصاره آبی مرزنگوش در دو سطح 3(w/w)% و 5% اضافه شدند (نمونه شاهد بدون افزودن عصاره های آبی مرزنگوش در نظر گرفته شد). در مرحله بعد محصول بدست آمده در ظروف 100 گرمی بسته بندی گردید و سپس گرمخانه گذاری در دمای 43°C تا رسیدن به pH=4/7 انجام شد و در سردخانه 4°C نگهداری شدند و نهایتاً آزمون های مورد نظر در فواصل زمانی 1، 7، 14 و 21 روز با سه تکرار انجام شدند. شمارش باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم شمارش باکتری پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم) در نمونه های مورد بررسی، هر کدام در روز های 1، 7، 14 و 21 که در دمای 4°C نگهداری شده بودند، با استفاده از محیط کشت MRS-Bile Agar و گرمخانه گذاری در دمای 37°C به مدت 72 ساعت با روش pour plate بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره 11325 انجام گرفت (8 و 38).

2-4- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH انجام شد و کاهش جذب در محلول DPPH و عصاره ماست مورد نظر در طول موج 517 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در روزهای 1، 7، 14 و 21 ارزیابی گردید (12 و 47).

باکتریهای پروبیوتیک (27) می گردند در تیمارهای حاوی عصاره مرزنگوش، با افزایش غلظت عصاره، تعداد باکتری پروبیوتیک کاهش معنی داری یافته است ($p < 0/05$) که علت آن می تواند به اثر مهار کنندگی برخی ترکیبات فنولی موجود در عصاره مرزنگوش، از قبیل تیمول و کارواکرول، بتاکاریوفیلین، D-جرماکرن مربوط باشد که اثرات ضد باکتریایی قابل قبولی دارند (36). جمعیت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم در پایان دوره نگهداری در کلیه تیمارها نیز به طور معنی داری کاهش می یابد ($p < 0/05$) که علت آن می تواند تجمع اسید در نتیجه تولید اسید لاکتیک و سایر اسید های آلی نظیر اسید استیک، اسید فرمیک، استالدهید و غیره توسط باکتری های آغازگر ماست باشد که منجر به کاهش pH و افزایش اسیدیته می گردد (24). هم چنین افزایش پتانسیل اکسیداسیون احیا (E_{H}) و نیز افزایش غلظت هیدروژن پراکسید حاصل از فعالیت متابولیکی باکتری ها (17) از عوامل کاهش جمعیت باکتری های پروبیوتیک در ماست در طول زمان نگهداری می باشد (28). Michael et al. (2010) به بررسی اثر عصاره های گیاهی در افزایش زنده مانگی لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک بدون جربی پرداختند و به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج نشان داد که در پایان دوره نگهداری تعداد باکتری های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست های غنی شده با عصاره های گیاهی بالاتر از ماست ساده بود و در طی زمان نگهداری، تعداد لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست ساده و ماست حاوی عصاره گیاهی به طور قابل توجهی در 29 روز نگهداری کاهش پیدا کرد (28). Jaziriet al., (2009) به بررسی اثر چای سبز و سیاه بر روی میکروفلور ماست در طی زمان تخمیر و زمان نگهداری پرداختند و به نتایج غیر مشابهی دست یافتند. در این پژوهش اسیدیته و زنده مانگی فلور میکروبی ماست در طی 42 روز نگهداری و در دمای 4 درجه سانتی گراد

با سایر تیمارها دارای تفاوت معنی دار می باشد ($p < 0/05$) و پایین ترین میزان مهار مربوط به تیمار شاهد می باشد که با سایر تیمارها تفاوت معنی دار دارد ($p < 0/05$). در طول دوره نگهداری میزان فعالیت آنتی اسیدانی در تیمارهای شاهد و A₁ ابتدا به طور معنی دار کاهش یافت ($p < 0/05$) و سپس به طور معنی دار افزایش پیدا کرد ($p < 0/05$) و در آخرین روز نگهداری تفاوت معنی داری از نظر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در این تیمارها مشاهده نشد ($p > 0/05$). در حالیکه این میزان در تیمار A₂ ابتدا به طور معنی دار کاهش یافت ($p < 0/05$) سپس به طور معنی دار افزایش پیدا کرد ($p < 0/05$) و در آخرین روز نگهداری از میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی دار کاسته شد ($p < 0/05$).



نمودار 2-مقادیر مهار رادیکال DPPH (درصد) در نمونه

های مورد بررسی در طول زمان نگهداری

A₁: 3% عصاره مرزنگوش، A₂: 5% عصاره مرزنگوش، شاهد: فاقد عصاره

4-بحث

زنده مانگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم نتایج حاصل از تحقیق حاکی از آن است که افزودن عصاره های گیاهی به ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیر گونه پلانتاروم موجب افزایش معنی دار زنده مانگی باکتری پروبیوتیک مورد نظر نسبت به ماست شاهد (ماست پروبیوتیک فاقد عصاره) می گردد ($p < 0/05$). علت آن ترکیبات فنولی موجود در عصاره های گیاهی است که نقش تحریک کنندگی داشته و باعث بهبود رشد باکتری های آغازگر ماست (32) و

مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور چای سبز تأثیر معنی داری بر روی ویژگی های میکروارگانیسم های ماست نداشت. ($p > 0/05$) (23).

(Marhamatizadehet al., (2013) به بررسی تأثیر عصاره برگ گیاه زیتون بر روی رشد و زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتريوم بیفیدوم در شیر و ماست پروبیوتیک در طی 21 روز نگهداری در یخچال پرداختند و به نتایج مشابهی دست یافتند. در این تحقیق عصاره برگ زیتون در غلظت های 2%، 4% و 6% به نمونه های مورد نظر اضافه شدند. نتایج این گونه نشان داد که تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتريوم بیفیدوم در نمونه های حاوی عصاره برگ گیاه زیتون به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه کنترل بود. هم چنین رابطه مثبتی بین رشد باکتری و افزایش غلظت عصاره برگ زیتون وجود دارد (21). در پژوهشی حسنی و همکاران، (1393) تأثیر عصاره زرشک بر زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده مورد را مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند. تأثیر مقادیر مختلف عصاره زرشک (4% و 5%) بر روی رشد باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه های ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده غنی شده با عصاره زرشک در طی مدت زمان نگهداری 21 روزه در روزهای 1، 7، 14 و 21 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که افزودن عصاره زرشک تأثیر معنی داری در روند افزایشی رشد باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در طی مدت زمان نگهداری داشته است و افزایش رشد سریع این باکتری در ماست پروبیوتیک با 5% عصاره زرشک بیشتر از 4% عصاره مشاهده شد (3). در تحقیق دیگری توکلی و همکاران، (1393) سه فاکتور اسانس های آویشن، آلوئه ورا و مدت زمان نگهداری در دمای 4°C در روزهای اول، یازدهم و بیست و یکم را بر روی رشد و بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) در دوغ پروبیوتیک طعم دار مورد بررسی قرار دادند و به نتایج غیر مشابهی دست پیدا کردند. اضافه کردن

اسانس آلوئه ورا و آویشن باعث افزایش تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گردید، تأثیر اسانس آلوئه ورا در روزهای 11 و 21 به طور معنی داری بیشتر از اسانس آویشن بود. هم چنین این تحقیق نشان می دهد که با افزایش مدت زمان نگهداری تا روز یازدهم تعداد باکتری La-5 در دوغ پروبیوتیک طعم دار افزایش و در روز بیست و یکم تعداد این باکتری نسبت به روز یازدهم کاهش یافت (1). در مطالعه دیگری داوودی و زمردی، (1392) اثر افزودن اسانس کاکوتی و زمان نگهداری بر زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئیرا بررسی کردند و به نتایج مشابهی دست یافتند. مقدار اسانس کاکوتی در محدوده 6-0 میکروگرم بر لیتر و زمان در محدوده 54-6 روز بود. نتایج حاصل نشان داد که اسانس کاکوتی بسته به درصد مورد استفاده و مدت زمان نگهداری باعث کاهش یا افزایش زنده مانی لاکتوباسیلوس کازئی شد. به طوریکه با افزایش غلظت اسانس از 0 به 3 $\mu\text{g/L}$ تعداد لاکتوباسیلوس کازئی 2/75 سیکل لگاریتمی افزایش یافت اما افزایش بیشتر غلظت اسانس از 3 به 6 میکروگرم بر لیتر، جمعیت پروبیوتیک ها 2/2 سیکل لگاریتمی کاهش پیدا کرد ($p < 0/05$). در طول زمان نگهداری نیز تعداد پروبیوتیک ها به طور معنی داری کاهش یافت ($p < 0/05$) (5).

4-1- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

نتایج حاصل از تحقیق حاکی از آن است که، افزودن عصاره های گیاهی به ماست پروبیوتیک، میزان مهار رادیکال DPPH و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی آن را به طور معنی داری نسبت به ماست شاهد افزایش می دهد ($p < 0/05$). که علت آن می تواند به ترکیبات فیتوشیمیایی منحصر به فرد گیاهی (ترکیبات فنولی) و متابولیت های حاصل از فعالیت باکتریها نسبت داده شود (42). فلاونوئیدها بخش مهمی از آنتی اکسیدان های گیاه مرزنگوش را در بر می گیرند که شامل کوئرستین، لوتئین، آپی ژنین طبیعی و اسیدهای فنلی شامل اسید رزماریک می باشند (26). لازم به ذکر است که در ابتدای دوره نگهداری در تیمارهای شاهد، A₁ و

نسبت به ماست شاهد در پایان دوره تخمیر و نگهداری بالاتر بود (11). در مطالعه دیگری Muniandyet al., (2016) تأثیر افزودن عصاره آبی چای سبز، سفید و سیاه را بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک در طی بیست و یک روز نگهداری در دمای 4°C مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از مهار رادیکال DPPH مورد بررسی قرار گرفت. عصاره برگ چای به میزان 2% w/v به ماست افزوده شد. نتایج نشان داد که ماست حاوی چای سبز بالاترین محتوای فنلی را دارد و بعد از آن ماست حاوی چای سفید و ماست حاوی چای سیاه قرار داشتند و کمترین میزان مهار DPPH مربوط به ماست حاوی چای سیاه بود که دارای درصد مهار 97/71% می باشد و بالاترین میزان درصد مهار مربوط به ماست حاوی چای سبز با مهار 98/53% بود (30).

Oh et al., (2016) به بررسی خصوصیات عملکردی ماست قالبی تخمیر شده با مواد بالقوه پری بیوتیک در عصاره برگ توت سفید (Cudraniatricuspidata) پرداختند. در این پژوهش پودر عصاره گیاهی به میزان 2% w/w مورد استفاده قرار گرفت و سپس زنده ماننی استارتر و فعالیت آنتی اکسیدانی در روزهای 1، 7، 14، 21 و 28 ارزیابی شد و به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج نشان داد پودر عصاره برگ توت سفید در ماست قالبی تخمیر شده در مقایسه با نمونه کنترل، سبب افزایش قابل توجهی در رشد باکتری استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس شد. ماست های حاوی عصاره گیاهی برگ توت سفید به طور قابل توجهی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر نسبت به ماست شاهد بود (32).

5- نتیجه گیری

از آنجائی که، بالا بودن جمعیت اولیه باکتری های پروبیوتیک، منجر به حفظ خواص سلامت بخش فرآورده های پروبیوتیک تا آخرین روز انقضای محصول می گردد، استفاده از عصاره های گیاهی به عنوان محرک رشد پروبیوتیک ها بسیار توصیه می شود. نمونه حاوی 3%

A₂ و نیز در آخرین روز نگهداری در تیمار A₂ میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به طور معنی دار کاهش می یابد (p<0/05). کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی در طول زمان نگهداری یخچالی ممکن است به افزایش تخریب ترکیبات فنولی نسبت داده شود و یا می تواند به علت افزایش واکنش بین پروتئین های شیر و پلی فنول ها باشد (45). به عبارت بهتر بین گروه های هیدروکسیل ترکیبات موجود در عصاره با اسید آمینه پرولینو پروتئین کازئین که در شیر غنی می باشد، واکنش اتفاق می افتد (18). در ادامه نگهداری یخچالی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در کلیه تیمارها افزایش معنی دار یافت (p<0/05) علت آن است که ادامه رشد میکروبی در طول نگهداری، ممکن است موجب تغییر در برخی ترکیبات فنولی و از این رو افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی گردد (14). هم چنین می توان گفت تجزیه پروتئین های شیر توسط باکتری های ماست به افزایش محتوای فنلی کل کمک می کند زیرا به عنوان مثال اسید آمینه تیروزین که پس از تجزیه پروتئین های شیر به وجود می آید دارای یک زنجیره فنلی جانبی می باشد (37). حسنی و همکاران، (1392) به ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ماست پروبیوتیک طعم دار غنی شده با عصاره زرشک پرداختند و فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست پروبیوتیک همزده و قالبی و نمونه شاهد را در طی مدت زمان نگهداری 21 روزه در روزهای صفر، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم از طریق روش مهار رادیکال DPPH مورد بررسی قرار دادند و به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج نشان داد افزودن عصاره زرشک تأثیر معنی دار در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ماست داشت ولی بر روی نوع ماست (قالبی و همزده) تأثیر معنی داری نداشت. در نمونه ها با افزایش مدت زمان نگهداری تا روز 21 این ویژگی کاهش معنی داری را نشان داد (1). Amirdivani and Baba, (2011) به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ماست حاوی نعناع، شوید و ریحان پرداختند و به نتایج مشابهی دست یافتند. نتایج نشان داد فعالیت آنتی اکسیدانی ماست های گیاهی

ماست پروبیوتیک. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، دانشگاه شیراز.

5- داوودی، س. و زمردی، ش. 1392. بررسی تأثیر اسانس کاکوتی بر میزان زنده مانیا لکتوباسیلوسکازیدردوغ پروبیوتیک ایرانی. دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

6- صمصام شریعت، س.ه. 1370. گیاهان و داروهای طبیعی. انتشارات مشعل، اصفهان، صفحات 65-20.

7- مرتضویان، ام. و سهراب وندی، س. 1385. مروری بر پروبیوتیک ها و فرآورده های غذایی پروبیوتیک (با تأکید بر فرآورده های لبنی). انتشارات آتا، تهران، صفحات 130-74.

8- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، 1387. ماست پروبیوتیک- ویژگی ها و روشهای آزمون. استاندارد ملی ایران، شماره 11325، چاپ اول.

9- مهراب محسنی، پ.، اسماعیل زاده کناری، ر.، رجایی، پ.، مقیمی، ع. 1392. اثر آنتی اکسیدانی عصاره ریحان بر پایدار سازی روغن آفتابگردان، دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد قوچان.

10- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I. B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(9): 4168-4170.

11- Amirdivani, S. and Baba, A.S. 2011. Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and invitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 1458-1464.

12- Apostolidis, E., Kwon, Y.I. and Shetty, K. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 46-54.

13-Barazandeh, M. M. 2000. Identification of the essential oil composition from *Origanum Vulgare* L. Cultivated in Iran Botanical Garden. *Pajohesh and Sazandegi Journal*, 14(4): 38-40.

عصاره مرزنگوش بیشترین تأثیر را بر افزایش رشد باکتری های پروبیوتیک در محصول نسبت به سایر نمونه ها داشت. که علت آن مربوط به وجود ترکیبات فنولی موجود در عصاره مرزنگوش است که در این غلظت بیشترین اثر را بر تحریک رشد باکتری پروبیوتیک مورد نظر داشته است. ضمن آنکه افزودن عصاره های گیاهی به ماست پروبیوتیک منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به ماست شاهد شد و نمونه حاوی 5% عصاره مرزنگوش بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را به خود اختصاص داد که علت آن وجود ترکیبات فنلی بیشتر در غلظت بالاتر این عصاره می باشد.

6-منابع

1- تولکی، ر.، کرمی، م.، درویشی، ش. و قصری، ش. 1393. بررسی تأثیر اسانس های گیاهی آویشن و آلوئه ورا بر روی زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ویژگی های فیزیکیوشیمیایی و خواص حسی در دوغ. اولین همایش ملی میان وعده ای غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد.

2- حسنی، م.، محمدی ثانی، ع.، شریفی، ا. و حسنی، ب. 1392. تأثیر عصاره زرشک بر زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده با عصاره زرشک و بررسی ویژگی های فیزیکیوشیمیایی آن. سومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

3- حسنی، م.، محمدی ثانی، ع.، شریفی، ا. و حسنی، ب. 1393. تأثیر عصاره زرشک بر زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماست پروبیوتیک طعم دار قالبی و همزده با عصاره زرشک و بررسی ویژگی های فیزیکیوشیمیایی آن. سومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان.

4- دهداری، ل. و حاجی زاده، م. 1392. بررسی اثر گیاهان دارویی بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک در

- Food Science of Animal Resources, 36(1): 90-99.
- 25- Kulisic, T., Radonic, A. and Katalinic, V. 2004. Use of different methods for testing antioxidative of oregano essential oil. Food Chemistry, 85: 633-640.
- 26- Lagouri, V. and Boskou, D. 1996. Nutrient antioxidants in oregano. International Journal Food Science Nutrition, 47(6): 493-497.
- 27- Marhamatizadeh, M.H., Ehsandoost, E., Gholami, P. and DavanyanMohaghegh, M. 2013. Effect of olive leaf Extract on Growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifido bacterium bifidum* for production of probiotic Milk and Yogurt. International Journal of farming and Allied Sciences. 2(17): 572-578.
- 28- Michael, M., Phebus, R.K. and Schmidt, K.A. 2010. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* and *Streptococcus thermophiles* in nonfat yogurt. International Dairy Journal, 20: 665-672.
- 29- Muller, J., Reisinger, G. and Muhlbauer, W. 1989. Drying of medicinal and aromatic plants in a greenhouse solar dryer. Landtechnik, 2: 58-65.
- 30- Muniandy, P., Shori, A.B. and Baba, A.S. 2016. Influence of green, white and black tea addition on antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. Food Packaging and Shelf Life, 8: 1-8.
- 31- Muret, K., Sevgi, K., Sengul, K., Ersa, U., Cemalettin, B. and Fedra, V. 2007. Biological activities and Chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry, 100: 526-534.
- 32- Oh, N.S., Lee, J.Y., Joung, J.Y., Kim, K.S., Shin, Y.K. and Lee, K.W. 2016. Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates *Cudratriacuspida* and *Morus alba* L. leaf extracts. Journal of Dairy Science, 99: 1-12.
- 33- Qari, S.H. 2008. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of *Origanum majorana* aqueous extract using in vitro assay. Saudi Journal Biological Science, 15: 207-212.
- 34- Rosemont, I.L. 1990. Yogurt; its nutritional and health benefits. National Dairy Council, 61(2): 7-12.
- 35- Saad, S. M. I., Castro, I. A. and Harami, J.B. 2008a. Avaliac, aosenatorial de uma nova sobremesa 1 acteacongela dasimbiotica. In: 14- Blum, U. 1998. Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. Journal of Chemical Ecology, 24(4): 685-708.
- 15- Champange, C. P., Roy, D. and Gardner, N. J. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 61-84
- 16- Das, K., Tiwari, R.K.S. and shrivastava, D.K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2): 104-111.
- 17- Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7(1): 31-41.
- 18- Dubeau, S., Samson, G. and Tajmir-Riahi, H. 2010. Dual effects of milk on the antioxidant capacity of green: Darjeeling and English breakfast teas. Food Chemistry, 122: 539-545.
- 19- Erkan, N. and Ayranci, G. 2008. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed and (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, 110(1): 76-82.
- 20- Gouladis, M., Tzakoy, O., Verykokidoy, E. and Harvala, C. 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. Phytotherapy Research, 17(2): 194-195.
- 21- Haddadian, M. 2010. Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. Pakistan Journal of Nutrition, 9(8), pp. 787-793.
- 22- Halliwell, B., Aeschbach, R., Lolinger, J. and Aruoma, O.A. 1995. The characterization of antioxidant. Food and Chemical Toxicology, 33(7): 601-617.
- 23- Jaziri, I., Ben Salma, M., Mhadhbi, H. Urdaci, M.C. and Hamdi, M. 2009. Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. Food Chemistry, 112: 614-620.
- 24- Joung, J.Y., Lee, J.Y., Ha, Y.S., Shin, Y.K., Kim, S.H. and Oh, N.S. 2016. Enhanced Microbial, Functional and Sensory Properties of Herbal Yogurt Fermented with Korean Traditional Plant Extracts. Korean Journal for

- 46- Zare, F., Boye, J.I., Orsat, V., Champagne, C. & Simpson, B. K. 2011. Microbial physical and sensory properties of yogurt supplemented lentil flour. *Food Research International Journal*, 44 (8), pp. 2480-2488.
- 47- Zainoldin, K.H. and Baba, A.S. 2009. The effect of *Hyllocereuspolyrhizus* and *Hyllocereusundatus* on Physicochemical, proteolysis and antioxidant activity in yogurt. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 76: 361-366.
- 48- Zargari, A. 1968. *Medicinal plants*. AmirkabirPress, 320 p.
- Proceedings of XXI Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte.
- 36- Sahin, F., Gulluce, M., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G. and Ozer, H. 2004. Biological activities of essential oils and methanol extract of *Origannumvulgaresspvulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15: 549-557.
- 37- Shah, N.P. 2001. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy food. *Journal of Dairy Science*, 83(4): 849-907.
- 38-Sivakumar, N. and Kalaiarasu, S., 2010. Microbiological approach of curd samples collected from different locations of Tamilnadu India. *International Journal of current Research*, 27-30.
- 39-Shori, A.B. and Baba, A.S. 2011. Viability of lactic acid bacteria and sensory evaluation in *cinnamomumverum* and *Allium staviumbioyogurts* made from camel and cow milk. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Science*, 11: 50-55.
- 40- Snogerup, S. 1971. Evolutionary and plant geographical aspects of chasmophytic communities. *Plant life of south-west Asia*. In-Davis, P.H., Harper, P.C. and Hedge, I.C., pp.157-170.
- 41-Stoilova, A., Krastano, A., Dtoyanova, P., Senev, P. and Farfova, S. 2007. Antioxidant activity of ginger extract (*Zingiberofficinale*). *Food Chemistry*, 10: 764-770.
- 42- Thompson, J.L., Lopetcharat, K. and Drake, M.A. 2007. Preferences for commercial strawberry drinkable yogurts among African American, Caucasian, and Hispanic consumers in the United States. *Journal of Dairy Science*, 90(11): 4974-4987.
- 43-Yasin, N. and Abou-Taleb, M. 2007. Antioxidant and antimicrobial effects of marjoram and thyme in coateg refrigerated semi fried mullet fish fillets. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2(1): 1-9.
- 44-Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90(1): 199-206
- 45- Yuksel, Z., Arci, E. and Erdem, Y.K. 2010. Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry*, 121: 450-456.