

میکروبی شناسی مواد غذایی



فهرست

مطالعه ی اثر نانولیپوزوم اسانس بیدمشک بر زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی پروبیوتیک

فاطمه امینی، حمدالله مشتاقی، مریم عباس والی ۳

اثر فیلم کیتوزان – آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج

(*Citrus aurantium*) بر رفتار رشد باکتری ویبریو پارهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

نگین غلامی، لاله رومیانی، مهرنوش تدینی..... ۱۸

بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica L*) بر القای آپوتوز و

پرولیفراسیون انگل لیشمانیا مازور در شرایط آزمایشگاهی

مهناز کریمی، الهه تاج بخش، حسن ممتاز..... ۳۷

بررسی خصوصیات عملکردی ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما در مقایسه با عصاره

چای سبز بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک منتخب

مزگان مقدم، مهرنوش تدینی، علی فضل ارا..... ۵۴

مطالعه ی اثر نانولیپوزوم اسانس بیدمشک بر زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی پروبیوتیک

فاطمه امینی^۱، حمدالله مشتاقی^{۲*}، مریم عباس والی^۳

^۱ دانش آموخته ی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

^{۲*} گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

^۳ گروه بهداشت مواد غذایی و کنترل کیفی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول: moshtaghi@sku.ac.ir

چکیده

Salix aegyptiaca گیاهی گل داراست که با نام بیدمشک شناخته می شود. بیدمشک از دیرباز در طب سنتی برای بهبود کم خونی و سرگیجه، همچنین یک تقویت کننده قلب و عروق مورد استفاده قرار می گیرد و در صنعت غذا به عنوان یک افزودنی معطر در تهیه آب نبات های محلی استفاده می شود. کپسولاسیون مواد در نانولیپوزوم ها می تواند به عنوان یک سیستم محافظتی از ترکیبات طبیعی در طی فرآوری و نگهداری آن ها مورد استفاده قرار گیرد. امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به صورت مکمل های خوراکی و یا فراورده های غذایی در حال افزایش است. در میان محصولات پروبیوتیک، بستنی پروبیوتیک محبوبیت زیادی به دست آورده است. در این مطالعه علاوه بر تهیه نانولیپوزوم های اسانس بیدمشک به روش Ethanol Injection، به بررسی و مطالعه ی اثر آن بر باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی پروبیوتیک پرداخته شد. در این مطالعه به بستنی حاوی 10^9 cfu/ml باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس میزان ۱ درصد و ۲ درصد اسانس آزاد و نانولیپوزوم بیدمشک افزوده شد و در دمای 4 ± 1 درجه سانتیگراد نگهداری شد و در نهایت اثر آن در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۶۰ مورد مطالعه قرار گرفت. بیفیدوباکتریوم لاکتیس در گروه های حاوی ۱ و ۲ درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک زنده مانی قابل توجهی را طی نگهداری در ۹۰ روز نشان داد. در صورتی که این باکتری در نمونه بستنی شاهد بدون اسانس کاهش محسوسی داشت. طبق نتایج بدست

آمده استفاده از اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک به جهت تاثیر مثبت بر افزایش زنده مانی باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در تولید بستنی پروبیوتیک توصیه می شود.

کلمات کلیدی: اسانس بیدمشک، نانولیپوزوم، کپسولاسیون، بیفیدوباکتریوم لاکتیس، *Salix aegyptiaca*

مقدمه

Salix aegyptiaca L گیاهی گل دار است که با نام

بیدمشک شناخته می شود. بیدمشک یک درختچه‌ی برگریز از خانواده سالیانسه‌آز راسته مالفیجیالس^۲ است. گونه های بیدمشک احتمالا از خاورمیانه خصوصا مصر، ترکیه، ایران، عراق، ارمنستان، ترکمنستان و افغانستان سرچشمه می‌گیرند (Asgarpanah, 2012; Karimi et al, 2011). از اسانس و عرق گل آذین نر گیاه مدت هاست که در طب سنتی ایران به عنوان تقویت کننده قلب، درمان کم خونی و سرگیجه و همچنین افزودنی معطر در نوشیدنی ها استفاده می‌شود (Akin et al, 2007; Sonboli et al, 2010). از جوشانده برگ یا پوست آن نیز برای دردهای روماتیسمی و به عنوان ماده‌ی ضد عفونی کننده و داروی ضد کرم (کرم روده) استفاده می‌شود. علاوه بر این، از بیدمشک به عنوان ملین، آرامبخش، تب بر، ضد فشارخون، خواب آور، مسکن و محافظ معده و بادشکن و تقویت قوای جنسی استفاده می‌گردد. خواص ضد التهابی و ضد دردی عصاره‌های خانواده سالیکس ممکن است به مواد شیمیایی آن از جمله سالیسین^۴، میریستین^۵، کامفرول^۶، کوئرستین^۷، روتین^۸، لوتئولین^۹ و کاتچین^{۱۰}

امروزه، ترکیبات طبیعی به دلیل داشتن خواص مفید و نداشتن عوارض جانبی مواد شیمیایی مشابه، مورد توجه مصرف کنندگان قرار گرفته و به همان میزان کاربرد این ترکیبات طبیعی در صنایع غذایی به عنوان مواد ضد میکروب و نگهدارنده روبه افزایش است. اما با این وجود چالش‌هایی در زمینه استفاده مستقیم از اسانس‌های دارای ترکیبات شیمیایی فعال مانند ترکیبات فنولیک در سیستم‌های غذایی پیچیده وجود دارد که شامل تاثیرات منفی بر پایداری فیزیکی و شیمیایی غذا و از سویی از بین رفتن فعالیت زیستی (biological activity) ترکیبات موجود در اسانس می‌باشد (Sawale et al., 2017). افزایش تقاضا برای ترکیبات آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی و یا ترکیبات پری‌بیوتیکی طبیعی، همراه با آگاهی مصرف کنندگان از مضرات ترکیبات شیمیایی، باعث شکل‌گیری گرایش جدیدی به نام مصرف‌گرایی سبز در صنایع غذایی شده است که مبنای توسعه رویکردهای جایگزین برای نگهداری مواد غذایی است (Imran et al., 2012).

⁷ Quercetin

⁸ Rutin

⁹ Luteolin

¹ Catechin

¹ Musk willow

² Salicaceae

³ Malpighiales

⁴ Salicin

⁵ Myricetin

⁶ Kaempferol

درون پوشانی فرآیندی است که در آن ماده زیست فعال (جامد، مایع یا گاز) در داخل ماده دیگر (ماده دیواری) محصور می‌شود تا از آن در برابر شرایط نامساعد محیطی محافظت شود؛ در نتیجه ماندگاری و انتشار کنترل شده ماده زیست فعال در ریزپوشش افزایش می‌یابد (Hernandez et al, 2020; Zandi et al, 2020; Bastos et al, 2020). این روش جدید (نانوکپسولاسیون) از طریق بهبود پایداری اکسیداتیو عناصر یک راه بالقوه برای غلبه بر چنین چالش‌هایی است که از ترکیبات زیست فعال در برابر واکنش‌های ناخواسته و عوامل محیطی محافظت می‌کند و واکنش احتمالی آن‌ها را با مواد مغذی محدود می‌کند، بنابراین ثبات غذا را در طول پردازش و ذخیره‌سازی حفظ می‌نماید و باعث اثربخشی کنترل‌شده یا هدفمند می‌شود (Mozafari et al, 2007; Noori et al, 2017). در واقع کپسوله شدن از مواد فعال زیستی در مقابل هضم در دستگاه گوارش محافظت کرده میزان جذب گوارشی را افزایش داده که در نهایت باعث افزایش فراهمی زیستی و فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود (Takahashi et al, 2009; Wu et al, 2015). در این متد با دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها ساختارهایی در اندازه نانو ایجاد شده (اغلب ۹۶۶ نانومتر یا کمتر) که باعث حفظ ویژگی‌های آن نیز می‌شود (Noori et al, 2017). ترکیبات نانوکپسوله به دلیل اندازه کوچکتر از سلولشان، فعالیت زیستی بالاتری دارند همچنین از این فناوری به منظور پوشاندن طعم و بوی نامطلوب نیز استفاده می‌شود (Gortzi et al, 2007; Noori et al, 2017). یکی از روش‌های کپسوله نمودن نانوساختارهایی تحت عنوان نانو لیپوزوم‌ها است. نانولیپوزوم‌ها، ذرات کروی متشکل از چربی‌های قطبی (فسفاتیدیل کولین یا فسفاتیدیل اتانول آمین) یا ترکیبی چربی‌های قطبی با کلسترول یا ارگسترول

مربوط باشد (Zandi et al, 2023; Asgarpanah, 2011; Sayyari, 2017). چندین ترکیب شیمیایی مانند فلاونوئیدها و مواد فرار از قسمت‌های مختلف گیاه بیدمشک شناسایی شده است. گل‌های نر بیدمشک غنی از اجزای فرار مانند *p*-متوکسی بنزن، اوژنول، کارون و ژرانیول هستند (Enayat and Banerjee, 2009; Karimi et al, 2011). اسانس‌ها، مایعات فرار معطر طبیعی هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان مانند گل‌ها، جوانه‌ها، دانه‌ها، برگ‌ها، ساقه‌ها و پوست استخراج می‌شوند. ترکیب و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی اسانس‌ها تحت تأثیر نوع گیاه، بخشی از گیاه که اسانس‌گیری انجام می‌شود، منشا جغرافیایی، زمان برداشت، مرحله رشد، سن گیاهان و روش استخراج قرار دارد (Bastos et al, 2020). این اجزاء فرار به راحتی در معرض نور و تحت تأثیر گرما تجزیه می‌شوند و درون پوشانی آن‌ها با هدف محافظت از خصوصیات عملکردی و همچنین تعدیل انتشار صورت می‌گیرد (Faidi et al, 2019). از سوی دیگر، به‌رغم اثرات سودمند، ترکیبات اسانس‌ها فراهمی زیستی پایینی دارند و همچنین ناپایدار بودن در طی فرآیند تولید و نگهداری و عدم تحمل شرایط نامساعد محیطی باعث محدودیت استفاده از آن می‌شود. بنابراین استفاده از روش‌های جدید جهت محافظت انتخابی ترکیبات طبیعی در پروسه تولید و نگهداری، ضروری به‌نظر می‌رسد. روش‌های متفاوتی مانند کپسوله کردن ترکیبات اصلی، نظیر نانو ذرات، میکرو ذرات، لیپوزوم‌ها (Elabbadi et al, 2011; Gulseren, 2013; Lu et al, 2011; Corredig; Liang et al, 2011).

به موارد زیر اشاره کرد: کمک به هضم لاکتوز، جذب کلسیم، مقاومت در برابر پاتوژن های روده ای، بهبود و جلوگیری از اسهال ویروسی و باکتریایی، کاهش وقوع یبوست، اثر مہاری بر سرطان مٹانه و کولون، تقویت سیستم ایمنی، رشد باکتری های روده باریک، کاهش لیپیدهای خون و بیماری های قلبی عروقی، بهبود بیماری های مجاری ادراری تناسلی، درمان عفونت های ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) و پیشگیری از انسفالوپاتی هپاتیک. بنابراین تولید و عرضه محصولات دارای پروبیوتیک ها به بازار مصرف از نظر ارزش غذایی مفید است (Javaheri et al., 2009). فدراسیون بین المللی وجود حداقل 10^6 باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از محصولات لبنی را در هنگام مصرف لازم دانسته است (Di Criscio et al., 2010). امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به صورت مکمل های خوراکی و یا فراورده های غذایی در حال افزایش است. در میان محصولات پروبیوتیک، بستنی پروبیوتیک محبوبیت زیادی به دست آورده است. بستنی را می توان مدت زیادی بدون تغییر در ویژگی های آن ذخیره کرد (Akin et al., 2007). بستنی به دلیل pH خنثی و مقدار زیاد مواد جامد کل قابلیت بالایی در زنده مانی پروبیوتیک ها دارد و همچنین به سبب دارا بودن خواص حسی ویژه و طرفداران زیاد این محصول لبنی، فراورده غذایی مناسبی برای انتقال پروبیوتیک ها به بدن است (Hekmat and McMahon., 1992; Kailasapathy and Chin., 2000; Akin et al., 2007; Golestani et al., 2016; Noori et al., 2017). بازدهی پروبیوتیک ها در محصول غذایی به تعداد اولیه پروبیوتیک های زنده، مدت زمان نگهداری محصول و نوع ماده غذایی بستگی دارد. با مصرف میزان

می باشند که به فراوانی در طبیعت یافت می شوند. در حلال های قطبی مانند آب عموماً تمایل دارند که به فرم غشاهای دو لایه ای دربیایند. اندازه این ذرات کروی شکل بستگی به روش ساخت آن ها داشته و می تواند از چند ده نانومتر تا چند ده میکرومتر متفاوت باشد. ساختار لیپوزوم ها از مولکول هایی آمفیفیلیک تشکیل شده است که دارای یک-سر آب دوست و یک سر آب گریز می باشند. متأسفانه امروزه به دلیل تفاوت در عادات غذایی، کمبود تحرک و افزایش استرس انسان درگیر بیماری های گوناگونی نظیر بیماری های قلبی، انواع سرطان از قبیل سرطان سینه، پروستات و کولون و همچنین بیماری های استخوانی می شود (Vahidmoghaddam et al., 2018). از این روی مواد غذایی تولید شده که دارای ترکیباتی هستند که علاوه بر ارزش تغذیه ای نتایج مثبتی بر سلامتی انسان دارند. از این محصولات غذایی تحت عنوان محصولات فراسودمند، عمل گرا و یا کاربردی یاد می شود. در واقع غذا های عمل گرا بخشی از رژیم غذایی انسان هستند که دارای فوایدی برای سلامتی و پیشگیری از ابتلا به بیماری های مزمن (فرا تر از آنچه توسط تغذیه مناسب فراهم می شود) هستند (Al-Sheraji et al., 2013). این نوع مواد غذایی امروزه با توجه به آگاهی مردم از اهمیت مواد غذایی در سلامت انسان توجه روزافزونی را به خود جلب کرده است (Siró et al., 2008). این مسئله منجر به افزایش تولید مصرف مواد غذایی غنی شده با اجزای بیولوژیکی فعال مانند پروبیوتیک ها و پری بیوتیک ها شده است (Rouhzadeh and Bahramian., 2020).

طبق تعریف FAO پروبیوتیک ها باکتری هایی هستند که پس از مصرف و رسیدن به روده از طریق بهبود فلور میکروبی طبیعی روده باعث ایجاد اثرات مثبتی در سلامتی انسان می شود (Aghajani et al., 2010). از جمله این اثرات می توان

سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جدا گردید. پس از دو بار شستشو به وسیله سرم فیزیولوژی استریل رسوب باکتری پروبیوتیک جدا شد و در بستنی استفاده گردید (Homayouni Rad et al., 2012).

- تهیه میزان تلقیح باکتری ها

جهت آماده کردن میزان تلقیح باکتری از روش جذب نوری استفاده شد. پس برای این منظور از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده مقدار مناسبی به داخل کووت منتقل کردیم و جذب نوری باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر nm روی عدد تنظیم شد. سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰ برابر جذب نوری تهیه شد. پس از تهیه سری رقت در پلیت های حاوی محیط MRS Agar به صورت سطحی و پورپلیت کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباتور گذاری کلنی ها شمارش شدند. تعداد باکتری ها در در CFU/ml^{۱۰۹} استفاده شد (Noori et al., 2017).

-تهیه بستنی

برای تهیه بستنی یک لیتر شیر استریل و هموژنیزه را با ۴۰۰ گرم خامه ۳۰٪ مخلوط کرده و روی شعله قرار دادیم تا درجه حرارت مخلوط به ۴۰ درجه سانتی گراد برسد، سپس مواد خشک شامل ۱۰۰ گرم پودر شیرخشک، ۲۷۰ گرم شکر، ۰/۹ گرم وانیل و ۱۰ گرم پایدارکننده (کربوکسی متیل سلولز) را با همزن برقی مخلوط و درجه حرارت را به ۸۰ درجه سانتی گراد رساندیم (Noori et al., 2017). سپس مخلوط در این دما به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. مخلوط بستنی را به پنج گروه A, B, C, D, E تقسیم گردید. به هر کدام از گروه- های A, B, C به میزان ۱٪ w/v باکتری بیفیدوباکتریوم

مشخص و استاندارد بستنی (۸۰ گرم در روز) کسب حداقل CFU/ml^{۱۰۷} از باکتری پروبیوتیک در روز ممکن می شود (Golestani et al., 2016). از جمله باکتری های پروبیوتیک می توان به بیفیدوباکتریوم لاکتیس *Bifidobacterium lactis* اشاره کرد.

مواد و روش کار:

- تهیه نانولیپوزوم اسانس بیدمشک

اسانس بیدمشک مورد استفاده تولید شرکت البریشت آلمان می باشد که از طریق شرکت نیکوشیمی در ایران تهیه شد. برای تولید نانولیپوزوم های حاوی اسانس بیدمشک از روش Ethanol injection استفاده گردید. ابتدا ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر فسفولیپید، ۵ میلی گرم بر میلی لیتر کلسترول و مقادیر مورد نظر از غلظت اسانس بیدمشک در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل و توسط همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به داخل ۲۰ میلی لیتر فاز آبی که روی همزن مغناطیسی با دور ۴۰۰ rpm قرار دارد، تزریق شد. پس از تشکیل لیپوزوم ها، محلول به مدت ۱۵ دقیقه دیگر روی هم زن قرار گرفته و در نهایت با استفاده از روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، فاز آبی و اتانول جدا گردید. سوسپانسیون حاوی اسانس نانولیپوزومی در دمای یخچال نگهداری شد (Sebaaly et al., 2015).

- تهیه و آماده سازی پروبیوتیک ها

باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس از شرکت کریستین هانسن دانمارک به صورت لیوفیلیزه، خریداری شد. سپس باکتری مذکور در شرایط استریل در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت فعال شدند. سلول های پروبیوتیکی در انتهای فاز لگاریتمی رشد به وسیله

اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک طی ۹۰ روز نگهداری در شرایط انجماد نشان می‌دهد. همانطور که داده‌ها نشان می‌دهند در گروه‌های A و B حاوی ۱ درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک کاهش قابل توجهی طی ۹۰ روز نگهداری در تعداد بیفیدوباکتریوم‌ها انجام نشد. با توجه به نمودار شماره ۱ گروه‌های A و B روند کاهشی با شیب بسیار کمی داشته است و تغییر محسوس در لگاریتم باکتری‌ها صورت نگرفته است به طوری که در طی نگهداری در مدت زمان ۹۰ روز این کاهش کمتر از یک لگاریتم بوده است. در صورتی که در نمونه‌ی شاهد که فاقد اسانس بود کاهشی در حدود ۲ لگاریتم در تعداد باکتری‌ها صورت گرفت. جدول و نمودار شماره ۲ شمارش تعداد باکتری‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس را در نمونه‌های بستنی حاوی ۲ درصد اسانس بیدمشک آزاد و لیپوزومی (گروه D و E) طی ۹۰ روز نگهداری در حالت انجماد نشان می‌دهد. داده‌ها نشان می‌دهد که کاهش قابل توجهی در نمونه‌های گروه E و D که حاوی ۲ درصد اسانس آزاد و لیپوزومی بیدمشک هستند صورت نگرفت. همان‌گونه که از نمودار شماره ۲ قابل دریافت است گروه E و D روند کاهشی با شیب بسیار کم داشته به طوری که این کاهش کمتر از یک لگاریتم طی ۹۰ روز نگهداری بوده است و تقریباً از هفته‌ی سوم تعداد باکتری‌ها بصورت ثابت باقی ماند ولی در مورد گروه C که نمونه شاهد فاقد اسانس است روند کاهشی با سرعت زیاد و بصورت محسوس قابل مشاهده می‌باشد. با توجه به این نکته که فدراسیون بین‌المللی وجود حداقل 10^6 باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از محصولات لبنی را در هنگام مصرف لازم دانسته است می‌توان بیان کرد که افزودن اسانس بیدمشک به صورت آزاد و یا لیپوزومی به بستنی حاوی باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس برای حفظ و زنده

لاکتیس اضافه شد. شمارش اولیه باکتری‌ها را به دست آوردیم. به گروه A ۱٪ اسانس آزاد بیدمشک و به گروه B ۱٪ اسانس لیپوزومی بیدمشک اضافه شد و به گروه C هیچ اسانسی اضافه نگردید. مخلوط در دستگاه بستنی ساز در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه منجمد شد و سپس در ظروف ۵۰ گرمی بسته بندی و برای تکمیل فرآیند سخت شدن در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید (Noori et al., 2017; Mahdian and Karazhian., 2020).

- ارزیابی اثر اسانس آزاد و نانولیپوزومی بیدمشک بر رشد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی

تعداد باکتری‌های زنده بلافاصله پس از انجماد و نیز پس از گذشت ۹۰، ۶۰، ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷ روز نگهداری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد شمارش شدند. برای این منظور از یک گرم نمونه سری رقت تهیه کرده و در محیط کشت MRS agar به روش پورپلیت کشت داده شد. آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام گردید (۱۳ و ۲۷). سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی برای بیفیدوباکتریوم لاکتیس گرمخانه گذاری شد. در نهایت کلنی‌های رشد کرده شمارش شدند (Noori et al., 2017).

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی Tukey با استفاده از نرم افزار Sigma Stat2 انجام شد.

- نتایج

جدول و نمودار شماره ۱ زنده مانگی باکتری پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس را در نمونه‌های حاوی ۱ درصد

مانی پروبیوتیک ها در طی نگهداری و تا زمان مصرف مفید و حتی ضروری می باشد.

جدول ۱. زنده مانی بیفیدوباکتریوم/لاکتیس همراه با ۱ درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی طی ۹۰ روز نگهداری در شرایط انجماد (Log 10 CFU/g

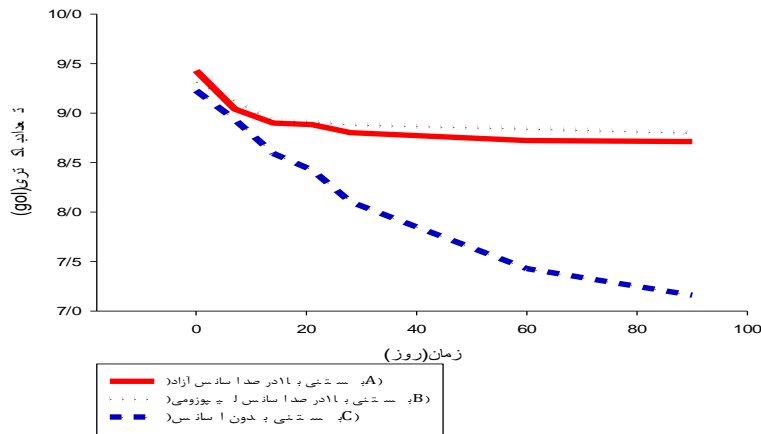
زمان (روز)	صفر	۷	۱۴	۲۱	۲۸	۶۰	۹۰
بستنی پروبیوتیک + ۱ درصد اسانس آزاد (A)	۹/۴۳ ^{Ac}	۹/۰۴۱ ^{Ac}	۸/۹۰ ^{Ac}	۸/۸۸۴ ^{Ac}	۸/۸۰۳ ^{Ac}	۸/۷۲۳ ^{Ac}	۸/۷۱۳ ^{Ac}
بستنی + ۱ درصد نانو اسانس لیپوزومی (B)	۹/۳۱۴ ^{Bc}	۹/۱۲۱ ^{Bc}	۸/۹۲۴ ^{Bc}	۸/۹۱۱ ^{Bc}	۸/۸۸۴ ^{Bc}	۸/۸۴۲ ^{Bc}	۸/۸۰۱ ^{Bc}
بستنی بدون اسانس (C)	۹/۲۲۸ ^{Cab}	۸/۹۳۵ ^{Cab}	۸/۵۹۳ ^{Cab}	۸/۴۲۷ ^{Cab}	۸/۱۰۳ ^{Cab}	۷/۴۲۸ ^{Cab}	۷/۱۶۰ ^{Cab}

*حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنادار با آن گروه می باشد (p>0.05).

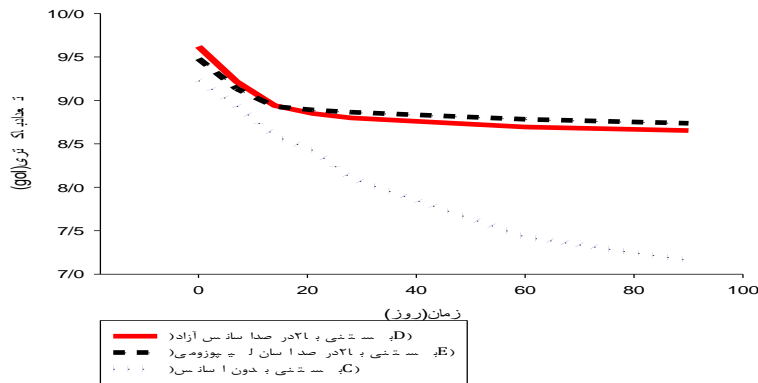
جدول ۲. زنده مانی بیفیدوباکتریوم/لاکتیس همراه با ۲ درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزوم شده در بستنی طی ۹۰ روز نگهداری در شرایط انجماد (Log 10 CFU/g

زمان (روز)	صفر	۷	۱۴	۲۱	۲۸	۶۰	۹۰
بستنی پروبیوتیک + ۲ درصد اسانس آزاد (D)	۹/۶۲۱ ^{Dc}	۹/۲۱۵ ^{Dc}	۸/۹۴۰ ^{Dc}	۸/۸۴۹ ^{Dc}	۸/۷۹۹ ^{Dc}	۸/۶۹۴ ^{Dc}	۸/۶۵۳ ^{Dc}
بستنی + ۲ درصد نانو اسانس لیپوزومی (E)	۹/۴۸۰ ^{Ec}	۹/۱۳۵ ^{Ec}	۸/۹۳۱ ^{Ec}	۸/۸۹۰ ^{Ec}	۸/۸۶۵ ^{Ec}	۸/۷۸۳ ^{Ec}	۸/۷۳۷ ^{Ec}
بستنی بدون اسانس (C)	۹/۲۲۸ ^{Cde}	۸/۹۳۵ ^{Cde}	۸/۵۹۳ ^{Cde}	۸/۴۲۷ ^{Cde}	۸/۱۰۳ ^{Cde}	۷/۴۲۸ ^{Cde}	۷/۱۶۰ ^{Cde}

*حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنادار با آن گروه می باشد (p>0.05).



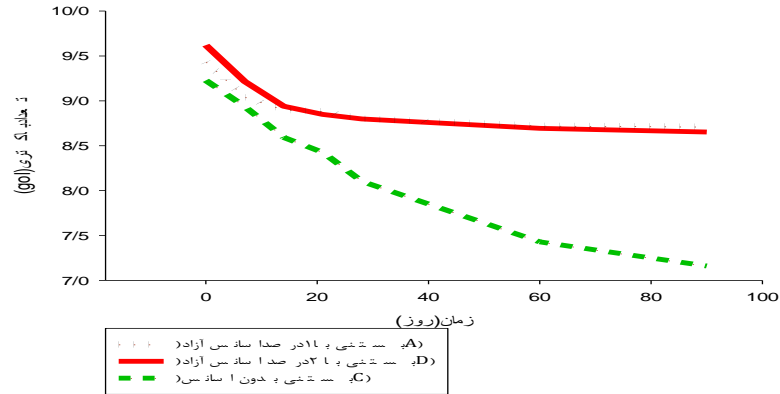
نمودار ۱: میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱ درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد



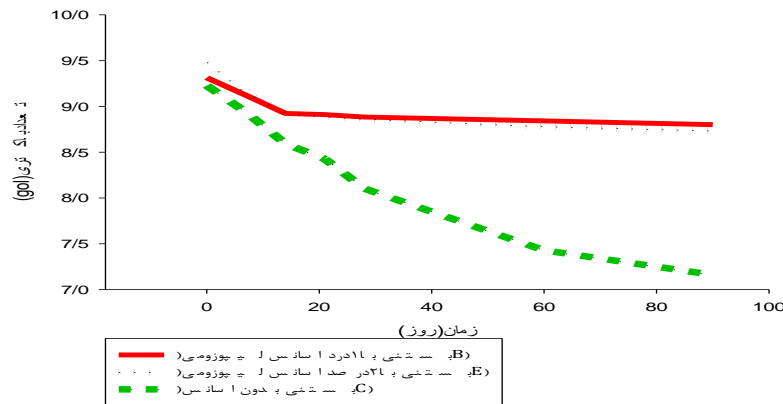
نمودار ۲: میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۲ درصد اسانس بیدمشک آزاد و نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد

تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). همین مقایسه بین گروه های B و E در نمودار شماره ۴ انجام گرفت. آنالیز داده ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین این گروه ها وجود ندارد ($p > 0.05$). ولی بین گروه های B و C و همچنین گروه های E و C از لحاظ آماری تفاوت معناداری وجود داشت ($p < 0.05$).

در نمودار شماره ۳ مقایسه ای بین نمونه های حاوی اسانس بیدمشک آزاد در غلظت های ۱ و ۲ درصد انجام گرفت. باتوجه به این نمودار و آنالیز داده ها می توان نتیجه گرفت که تفاوت معنی داری بین گروه A و D یعنی نمونه های حاوی غلظت ۱ و ۲ درصد اسانس آزاد وجود ندارد ($p > 0.05$). ولی بین گروه A و C و همچنین بین گروه های D و C از لحاظ آماری



نمودار ۳: مقایسه ی میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱۱ درصد و ۲۱ درصد اسانس بیدمشک آزاد در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد



نمودار ۴: مقایسه ی میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس همراه با ۱۱ درصد و ۲۱ درصد اسانس بیدمشک نانولیپوزومی در بستنی طی نگهداری در ۹۰ روز در حالت انجماد

بحث:

در طی نگهداری دچار کاهش محسوسی شد. در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۵ توسط نوری و همکاران روی بستنی سین بیوتیک انجام شد به بررسی اثر عصاره ی نانوکپسوله شده ی عصاره چای سبز بر زنده مانی باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس پرداخته شد. نتایج نشان داد که کمترین کاهش در میانگین لگاریتم تعداد لاکتوباسیلوس کازئی در طول مدت زمان نگهداری در بستنی

در مطالعه ی حاضر که برای اولین بار به تاثیر اسانس آزاد و نانولیپوزوم شده ی بیدمشک در بستنی و روی بیفیدوباکتریوم لاکتیس انجام گرفت نتایج نشان داد که اسانس بیدمشک در هر دو حالت آزاد و کپسوله در زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی طی مدت زمان ۹۰ روز نگهداری اثر مثبتی داشت در صورتی که این باکتری در نمونه های فاقد اسانس

علاوه بر این مطالعه ای در سال ۹۱ توسط ابراهیم زادگان و همکاران روی پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم لاکتیس و در محصول دوغ انجام گرفت. در این مطالعه باکتری پروبیوتیک را به دو صورت آزاد و کپسوله به محصول اضافه کردند. نتایج نشان داد که در طول نگهداری تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در حالت آزاد ۰/۲۶ سیکل کاهش و در حالت کپسوله شده ۰/۳۶ سیکل لگاریتمی افزایش یافت. با اینکه تعداد باکتری های پروبیوتیک زنده در هر دو حالت کپسوله شده و آزاد، در دوغ بالاتر از حداقل مقدار توصیه شده از طرف کمیته بین المللی لبنیات بود (۱۰^۷ واحد کلنی در گرم) اما شکل کپسوله در حفظ تعداد پروبیوتیک ها بیشتر از نوع آزاد مؤثر بود (Ebrahimzadegan et al., 2015).

نتیجه گیری:

مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اسانس بیدمشک بصورت آزاد و نانولیپوزوم شده بر زنده مانی باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی پروبیوتیک و برای اولین بار انجام گرفت. اسانس بیدمشک در حالت آزاد و لیپوزومی در هر دو غلظت ۱ و ۲ درصد باعث افزایش زنده مانی بیفیدوباکتریوم لاکتیس طی مدت زمان نگهداری ۹۰ روزه در حالت انجماد گردید، در صورتی که بیفیدوباکتریوم در نمونه های بستنی فاقد اسانس به صورت محسوسی کاهش یافتند. باتوجه به نتایج به دست آمده در طی این پژوهش با توجه به محبوبیت زیاد محصول لبنی بستنی و آثار سودمند پروبیوتیک ها بر سلامت مردم می-توان این محصول را بصورت پروبیوتیک تولید کرد. همچنین با توجه به مدت ماندگاری زیاد بستنی در حالت انجماد می توان از اسانس بیدمشک جهت افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها تا زمان مصرف استفاده نمود.

های حاوی ۱ درصد عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل ۱/۵۹ لگاریتم و بیشترین کاهش در بستنی های گروه کنترل برابر با ۴/۱۶ لگاریتم مشاهده شد همچنین کمترین اختلاف در میانگین لگاریتم تعداد بیفیدوباکتریوم لاکتیس در بستنی های حاوی ۱ درصد عصاره چای سبز نانولیپوزومی معادل ۰/۸۴ لگاریتم و بیشترین اختلاف در بستنی های گروه شاهد برابر با ۴/۴ لگاریتم به دست آمد. این تحقیق نشان داد که نانو کپسولاسیون عصاره چای سبز اثر معنی داری در رشد و زنده مانی پروبیوتیک ها در محیط کشت و بستنی دارد و می توان از این ترکیب به منظور افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها طی فرایند تولید و نگهداری مواد غذایی استفاده کرد (Noori et al., 2017).

همچنین در مطالعه ای که در سال ۱۳۹۰ توسط عزیز همایونی انجام گرفت به بررسی انتخاب گونه باکتری پروبیوتیک مناسب در تولید بستنی فراسودمند پرداخته شد. نتایج نشان داد که در غلظت های مختلف ساکارز، بیشترین رشد مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی در غلظت های ۱۰ درصد و ۲۰ درصد است. در بین باکتری های مورد آزمایش، لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در مقایسه با بقیه از مقاومت خوبی در برابر سرما و pH شبیه سازی شده دستگاه گوارشی و شرایط شبیه سازی شده بستنی برخوردار بودند و همچنین سرعت رشد بالایی داشتند (Homayouni., 2011). این نتیجه در این مطالعه که روی باکتری بیفیدوباکتریوم لاکتیس و در بستنی انجام گرفت نیز تایید شد و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در حضور اسانس بیدمشک زنده مانی قابل توجهی نشان داد.

منابع:

- Aghajani, A.R., Pourahmad, R. & Mahdavi Adeli, H.R. (2010). The Effect of Prebiotics on Probiotic Yogurt Containing *Lactobacillus casei*. *Food Technology & Nutrition*, 8(4), 73-83.
- Akın, M., Akın, M., & Kırmacı, Z. (2007). Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food chemistry*, 104(1), 93-99.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1542-1553.
- Asgarpanah, J. (2012). Phytopharmacology and medicinal properties of *Salix aegyptiaca* L. *African Journal of Biotechnology*, 11(28), 7145-7150.
- Bastos, L. P. H., Vicente, J., dos Santos, C. H. C., de Carvalho, M. G., & Garcia-Rojas, E. E. (2020). Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. *Food Hydrocolloids*, 102, 105605.
- Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E., & Servin, A. L. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4573-4580.
- Di Criscio, T., Fratianni, A., Mignogna, R., Cinquanta, L., Coppola, R., Sorrentino, E., & Panfili, G. (2010). Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. *Journal of dairy science*, 93(10), 4555-4564.
- Ebrahimzadegan, S., Zomorodi, S.H., Hojjatoleslami, M., & Khosroshahi Asl, A. (2015). The shelf life of free and encapsulated *Bifidobacterium lactis* and its effect on the physicochemical and sensory properties of Iranian buttermilk. *Innovation magazine in food science and technology*, 5(4), 105-114.
- Elabbadi, A., Jeckelmann, N., Haefliger, O. P., & Ouali, L. (2011). Complexation/encapsulation of green tea polyphenols in mixed calcium carbonate and phosphate micro-particles. *Journal of Microencapsulation*, 28(1), 1-9.
- Enayat, S., & Banerjee, S. (2009). Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food chemistry*, 116(1), 23-28.
- Faidi, A., Lassoued, M. A., Becheikh, M. E. H., Touati, M., Stumbé, J.-F., & Farhat, F. (2019). Application of sodium alginate extracted from a Tunisian brown algae *Padina pavonica* for essential oil

encapsulation: Microspheres preparation, characterization and in vitro release study. *International journal of biological macromolecules*, 136, 386-394.

Golestani, M., Pourahmad, R. & Mahdavi Adeli, H.R. (2016). The effect of inulin on the survival of probiotic bacteria, physical, chemical and sensory characteristics of fermented and non-fermented synbiotic ice cream. *Food Technology & Nutrition*, 13(3), 25-32.

Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*, 12(5), 932-945.

Gülseren, I. b., & Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(13), 3242-3251.

Haynes, I. N., & Playne, M. J. (2002). Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(1), 10.

Hekmat, S., & McMahon, D. J. (1992). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of dairy science*, 75(6), 1415-1422.

Hernández-Nava, R., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N., & Jiménez-

Munguía, M. T. (2020). Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocolloids*, 109, 106077.

Homayouni, A. (2011). Selection of suitable probiotic species for use in the production of ultra-beneficial ice cream. *Scientific-Research Journal of Microbial Biotechnology of Islamic Azad University*, 3(8), 49-56.

Homayouni, A., Rezaie Mokarram, R., Norouzi, S., Dehnad, A., & Barkhordari, A. (2015). Evaluation of physicochemical, sensory properties and survival of *Lactobacillus casei* in synbiotic soy-based ice-cream. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 11(1), 56-62.

Homayouni Rad, A., Javadi, M., Ghasemnezhad Tabrizian, V. & Alizadeh, A. (2012). Increasing the probiotic survival in functional ice cream by microencapsulation. *Journal of Food Industry Research*, 22(1), 97-102.

Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E... Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407-419.

- Javaheri, A., Khoshvaghti, A. & Marhamatizadeh, M.H. (2018). Probiotic yogurt production by hydroalcoholic extract of *Gundelia tourneforti* and probiotic kefir and evaluate its effect on probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*) activity. *Journal of Veterinary Microbiology*, 14(2), 15-23.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and cell biology*, 78(1), 80-88.
- Karimi, I., Hayatgheybi, H., Kamalak, A., Pooyanmehr, M., & Marandi, Y. (2011). Chemical composition and effect of an essential oil of *Salix aegyptiaca* L., Salicaceae, (musk willow) in hypercholesterolemic rabbit model. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21, 407-414.
- Lu, Q., Li, D.-C., & Jiang, J.-G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13004-13011.
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., . . . Hu, Q. (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 297-301.
- Mahdian, E., & Karazhian, R. (2020). Study on rheological, physicochemical and sensory properties of synbiotic ice cream using fibers from some fruit peels and *Lactobacillus casei* LC-01. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 15(6), 103-112.
- Mozafari, M. R. (2007). *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*: Springer.
- Noori, N., Noudoost, B., Gandomi Nasrabadi, H., & Akhondzadeh Basti, A. (2017). Effects of green tea extract nanoencapsulation on the survival of *Lactobacillus Casei* and *Bifidobacterium lactis* in symbiotic ice cream. *Journal of Veterinary Research*, 72(2), 195-205.
- Rouhzadeh, S., & Bahramian, S. (2020). Effect of Aloe vera gel on chemical, sensorial and viability of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* in low fat ice cream. *Journal of Food Hygiene*, 10(38), 109-117.
- Sanchez, B., De Los REYES-GAVILÁN, C. G., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2009). Probiotic fermented milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 472-483.
- Sawale, P. D., Patil, G. R., Hussain, S. A., Singh, A. K., & Singh, R. R. B. (2017). Release characteristics of polyphenols from microencapsulated *Terminalia arjuna* extract: Effects of simulated gastric

fluid. *International journal of food properties*, 20(12), 3170-3178.

Sayyari, Z., & Farahmandfar, R. (2017). Stabilization of sunflower oil with pussy willow (*Salix aegyptiaca*) extract and essential oil. *Food science & nutrition*, 5(2), 266-272.

Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *Food chemistry*, 178, 52-62.

Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456-467.

Sonboli, A., Mojarrad, M., Ebrahimi, S. N., & Enayat, S. (2010). Free radical scavenging activity and total phenolic content of methanolic extracts from male inflorescence of *Salix aegyptiaca* grown in Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 9(3), 293.

Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 9141-9146.

Wu, J., Liu, H., Ge, S., Wang, S., Qin, Z., Chen, L..., Zhang, Q. (2015). The

preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427-435.

Vahidmoghaddam, F., Mortazavi, S.A., & Ghale mousiani, Z. (2018). Investigating the antioxidant activity of marjoram aqueous extract and its effect on the survival of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* in low-fat probiotic yogurt. *Journal of innovation in food science and technology*, 10(1), 25-32.

Zandi, M., Dardmeh, N., Pirsá, S., & Almasi, H. (2017). Identification of cardamom encapsulated alginate-whey protein concentrates microcapsule release kinetics and mechanism during storage, stew process and oral consumption. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12314.

Zandi, M., Ganjloo, A., & Bimakr, M. (2022). Encapsulation of musk willow (*Salix aegyptiaca* L.) essential oil with sodium alginate and whey protein: Characterization, controlled release and mathematical modeling. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 19(125), 121-133.

Zandi, M., Ganjloo, A., & Bimakr, M. (2023). Kinetic modeling and optimization of musk willow (*Salix aegyptiaca* L.) essential oil extraction process of using ultrasound assisted hydrodistillation. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 121(18), 93-106.

The study of the effect of free and nanoliposome *Salix aegyptiaca* essential oil on the survival of *Bifidobacterium lactis* in probiotic ice cream

Amini, F.¹, Moshtaghi, H.^{2*}, Abbasvali, M.³

1. Ph.D. Student of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord , Shahrekord, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran.
3. Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Nutrition and Food Sciences, University of Shiraz, Shiraz, Iran.

*Corresponding author: moshtaghi@sku.ac.ir

Abstract:

Salix aegyptiaca is a flowering plant known as Musk Willow. For a long time *S. aegyptiaca* has been used in traditional medicines for the relief of anemia and vertigo, as a cardiogenic agent, as well as a fragrance additive in the preparation of local candies in the food industry. Encapsulation of materials in nanoliposomes can be used as a protective system of natural compounds during their processing and storage. Today, the using of probiotics in the form of food supplements or food products is increasing. Among probiotic products, ice cream has gained a lot of popularity. In this study, in addition to preparing the nanoliposomes of musk willow essential oil by ethanol injection method, its effect on the *Bifidobacterium lactis* in ice cream was studied. In this study, 1% and 2% free essential oil and its nanoliposome were added to ice cream containing 10^9 cfu/ml *Bifidobacterium lactis* and stored at -18 degrees Celsius, finally its effect was observed on days 0, 7, 14, 21, 28, 60 and 90 were studied. *Bifidobacterium lactis* in the groups containing 1% and 2% of free essential oil and Musk willow essential oil nanoliposomes showed significant survival during storage for 90 days. But, *Bifidobacterium lactis* was significantly reduced in the control group (ice cream without essential oil). According to the obtained results, the use of free and nanoliposome Musk willow essential oil is recommended for the positive effect on increasing the survival of *Bifidobacterium lactis* bacteria in the production of probiotic ice cream.

Keywords: Musk willow essential oil, nanoliposome, encapsulation, *bifidobacterium lactis*, *Salix aegyptiaca*

اثر فیلم کیتوزان – آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج

(Citrus aurantium) بر رفتار رشد باکتری ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنزدر میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)نگین غلامی^۱، لاله رومیانی^{۲*}، مهرنوش تدینی^۳

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

Lroomiani@iauahvaz.ac.ir*

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج (*Citrus aurantium*) به منظور کنترل رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده به میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) و نیز خواص فیلم در شرایط یخچالی به مدت ۱۵ روز مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم، فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۱۰/۵ و ۲ درصد اسانس نارنج بود. نتایج نشان داد که کمترین میزان مقاومت کششی (۱۴/۷۷ درصد)، حلالیت در آب (۱۵/۳۱ درصد) و بیشترین میزان نفوذپذیری به بخار آب ($10^{-10} \times 1/79$ g/msPa) در تیمار فیلم با ۲ درصد اسانس نارنج مشاهده شد. همچنین افزودن اسانس به فیلم میزان ضخامت (۰/۱۷۱ میلی متر) و کشش (۵۹/۳۷ درصد) در مقایسه با شاهد را افزایش داد ($p < 0/05$). کمترین میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج اندازه گیری شد ($p < 0/05$). در طول ۱۵ روز نگهداری، فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی اسانس توانست باعث کاهش ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با تیمار شاهد در میگوی وانامی شود ($p < 0/05$). فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج نسبت به تیمار کنترل، ۹ روز رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز را به تاخیر انداخت.

کلید واژه ها: اسانس نارنج، فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم، میگوی وانامی.

مقدمه

خواهد شد و مرگ و میری در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد دارد (Di Pinto et al., 2010).

با توجه به وجود باکتری‌ها درون مواد غذایی، استفاده از روش‌هایی که بتوانند باکتری‌ها با منشاء غذایی را کنترل و یا کاهش دهند، می‌توان سلامت مصرف‌کننده غذاهای دریایی را تامین کند. کیتوزان یکی از فراوانترین ترکیباتی است که از منابع طبیعی تجدید شدنی همانند سخت پوستان (لابستر، خرچنگ و میگو)، حشرات و قارچ‌ها بدست می‌آید (Sun et al., 2021). به دلیل ویژگی‌های ذاتی قابل توجه کیتوزان همانند فعالیت ضد باکتریایی و قابلیت فرم-گیری عالی، کیتوزان می‌تواند به عنوان یک ماده بسته بندی فعال برای محافظت از غذاها استفاده شود (Salama, et al., 2023).

ویبریوها پاتوژن‌های انسانی هستند که به شکلی وسیع، در محیط‌های دریایی منتشر شده‌اند. بخش عمده‌ای از گونه‌های جنس ویبریو، بومی محیط‌های آبی مناطق گرم یا معتدل بوده و به شکل گسترده‌ای از فرآورده‌های دریایی خام جدا می‌شوند (Liu et al., 2021). گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس از بین ۱۲ گونه ویبریو مولد بیماری‌های غذا در انسان، بیشترین اهمیت را در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. این باکتری گرم منفی، تخمیرکننده بی‌هوازی و نمک دوست است. قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی آب‌های شور باشد (Ming et al., 2018). ویبریو پاراهمولیتیکوس مسئول ۷۰-۵۰ درصد از موارد گاستروانتریت و اسهال در کشورهای آسیایی است. این باکتری پس از تهاجم به کولون باعث ایجاد بیماری و عامل عفونت‌های متفاوتی در انسان است که به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرم‌تنان، صدف‌ها، ماهیان، میگو، لابستر و خرچنگ آلوده ایجاد گاستروانتریت می‌نماید (Zhang et al., 2021).

همچنین مطالعات متعددی بر روی بهبود فعالیت ضد میکروبی فیلم کیتوزان از طریق ترکیب با اسانس‌ها انجام شده است. امروزه به دلیل استفاده از مواد نگهدارنده ناسالم و سنتتیک، عصاره‌های استخراج شده از گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات پلی فنولیک، به جای این ترکیبات مورد توجه و مطالعه قرار گرفته‌اند (Hadidi et al., 2020) که می‌توان به مطالعات Sayadi و همکاران (۲۰۲۱) بر تاثیر نانوکامپوزیت آلژینات پوشیده شده با اسانس زیره بر روی

بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های پاتوژن‌زاد، موجب نگرانی در سلامت عمومی جامعه شده است. سالانه ۴۲۰ هزار مرگ و میر انسانی به علت بیماری‌های غذا در جهان اتفاق می‌افتد. یکی از استراتژی‌های بالقوه برای کاهش عفونت‌های ناشی از غذا، توسعه سیستم‌های نگهداری کارآمد است که قادر به کاهش آلودگی میکروبی مواد غذایی هستند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها به دلیل استفاده گسترده از آنها متداول و تهدیدی برای سلامت عمومی بشمار می‌رود. در نتیجه، نیاز اساسی به روش‌های جایگزین احساس می‌شود (Rai et al., 2023).

ویبریوها پاتوژن‌های انسانی هستند که به شکلی وسیع، در محیط‌های دریایی منتشر شده‌اند. بخش عمده‌ای از گونه‌های جنس ویبریو، بومی محیط‌های آبی مناطق گرم یا معتدل بوده و به شکل گسترده‌ای از فرآورده‌های دریایی خام جدا می‌شوند (Liu et al., 2021). گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس از بین ۱۲ گونه ویبریو مولد بیماری‌های غذا در انسان، بیشترین اهمیت را در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. این باکتری گرم منفی، تخمیرکننده بی‌هوازی و نمک دوست است. قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی آب‌های شور باشد (Ming et al., 2018). ویبریو پاراهمولیتیکوس مسئول ۷۰-۵۰ درصد از موارد گاستروانتریت و اسهال در کشورهای آسیایی است. این باکتری پس از تهاجم به کولون باعث ایجاد بیماری و عامل عفونت‌های متفاوتی در انسان است که به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرم‌تنان، صدف‌ها، ماهیان، میگو، لابستر و خرچنگ آلوده ایجاد گاستروانتریت می‌نماید (Zhang et al., 2021).

لیستریا مونوسیتوژنز یک مشکل بهداشتی جهانی، باکتری فرصت طلب و پاتوژن درون سلولی است (Liu, 2006) که به دلیل ایجاد عفونت‌های انسانی و علائمی شبیه آنفولانزا منجر به مننژیت، سقط جنین و انسفالوپاتی در کودکان

رسیدند. سپس به مدت یک روز اجازه داده شد تا پوسته خشک شود. بعد از آن با اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط مخلوط گردید تا مواد معدنی از کیتین جدا شد. طبق مرحله قبل، فیلتراسیون و خنثی سازی pH و نیز خشک کردن باقیمانده فیلتر انجام پذیرفت. در مرحله آخر کیتوزان با NaOH پنجاه درصد به نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط و فیلتراسیون انجام شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد تا کیتوزان خشک شود (مودنی جول و رومیانی، ۱۳۹۶).

تهیه فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم

فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم مطابق با روش Nowzari و همکاران (۲۰۱۳) آماده شد. ۲ گرم از پودر کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر گلاسیال استیک اسید ۱ درصد حل و با دور ۱۵۰۰ rpm بهم زده شد، سپس در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز جهت شکل گیری فیلم نگهداری شد. به منظور تهیه فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم، محلول آلژینات سدیم (شرکت BDH انگلستان) ۳۰ گرم پودر آلژینات سدیم در ۱ لیتر آب مقطر (محلول ۳ درصد آلژینات سدیم) حل گردید. سپس گلیسرول (شرکت Merck آلمان) جهت شکل پذیر کردن فیلم، به غلظت های ۷۵ درصد کیتوزان و آلژینات سدیم اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه هم زدن، توئن ۸۰ یا Polyoxyethylene sorbitan monooleate (شرکت Tianjin Guangfu Fine Chemical Research Institute، چین) در ۰/۲۵ میلی مول/۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان و آلژینات سدیم حل شد. جهت تهیه فیلم حاوی اسانس، اسانس نارنج در سطح ۱ و ۲ درصد همراه با گلیسرول به فیلم اضافه و با دور ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. فیلم نهایی با قطر ۴۰ میلی لیتر در ظروف پتری دیش ریخته و بعد از ۴۸ ساعت، فیلم از پتری-ها خارج گردید.

اندازه گیری ضخامت فیلم

از دستگاه میکرومتر دیجیتال با دقت نزدیک به ۰/۰۱ میلی-متر استفاده شد. در هر فیلم حداقل ۱۰ نقطه تصادفی اندازه گیری و ضخامت فیلم به شکل میانگین ارائه شد.

ماندگاری گوشت، Moradi و همکاران (۲۰۲۰) تاثیر پوشش کیتوزان- پکتین- اسانس لیمو و فلفل قرمز بر روی کیفیت فیله قزل آلی رنگین کمان، Maghami و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر نانوذرات کیتوزان دارای اسانس *Foeniculum vulgare* بر روی ماندگاری *Huso huso* و کاهش فعالیت باکتریایی مواد غذایی در طول زمان نگهداری، اشاره کرد. با توجه به مقاومت و ماهیت بیماری زایی باکتری ویبریو و لیستریا در غذاهای دریایی، هدف از انجام این تحقیق، افزایش فعالیت ضد میکروبی فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج جهت مقابله با ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیئوژنز موجود در میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei* بود.

مواد و روش کار

تهیه اسانس

برگ های نارنج از باغات اطراف دزفول جمع آوری و برای شناسایی به آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول ارسال شدند. برگ ها با آب مقطر شسته و سپس خرد شدند. ۱۰۰ گرم برگ خرد شده به همراه یک لیتر آب در دستگاه کلونجر منتقل و به مدت ۳ ساعت، اسانس گیری انجام شد. پس از آبگیری اسانس تقطیر شده با سولفات سدیم انیدرید، اسانس به یک شیشه تیره و بدون تماس با نور و هوای آزاد منتقل و تا زمان استفاده در یخچال (۴ °C) نگهداری شد. آنالیز اسانس توسط دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 5973 با ستون BPX5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی °C ۵۰ تا ۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (دهقان و رومیانی، ۱۳۹۸).

تهیه کیتوزان

ابتدا ضایعات میگوی خشک شده آسیاب و در مرحله اول با NaOH یک نرمال به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و به نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط شد تا مواد آلی و گوشتی از آن جدا شوند. مواد با فیلتر صاف و با آب مقطر به pH خنثی

نقطه شکست که برابر با افزایش طول تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰ است از روی منحنی‌های نیرو/تغییر شکل بدست آمد.

مقاومت کششی = (ضخامت فیلم × عرض فیلم) / حداکثر نیرو در لحظه پاره شدن

آماده‌سازی میگو

میگوی وانامی (*L. vannamei*) به شکل تازه از بازار آبادان تهیه و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. میگوهای پاک شده با آب مقطر شسته شدند. در هر کیسه استومیکر ۱۰ گرم میگو قرار داده شد. سپس میگوها در کیسه‌های استومیکر همراه با یخ به منظور استریل و از بین بردن کامل فلور باکتریایی، به سازمان انرژی اتمی جهت تابش اشعه گاما به میزان ۵ کیلوگری ارسال و مجدداً در مجاورت یخ و در دمای صفر تا ۲ °C به آزمایشگاه منتقل شدند. در تیمار آزمایشی حاوی اسانس بدون فیلم، میگوها در محلول آب نمک استریل حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شدند. برای ایجاد پوشش فیلم، فیلم‌ها پس از خشک شدن از قالب جدا شده و به دور میگوها پیچانده شدند.

تیمارهای آزمایش

تیمار ۱: فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم

تیمار ۲: فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۰/۵ درصد اسانس نارنج

تیمار ۳: فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۱ درصد اسانس نارنج

تیمار ۴: فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج

طول دوره آزمایش ۱۵ روز و نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ انجام شد. هر تیمار دارای ۳ تکرار بود.

تلقیح ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا

مونوسیتوزنز به میگو

ویبریو پاراهمولایتیکوس ATCC 17802 و لیستریا مونوسیتوزنز ATCC 7644 از گروه بهداشت و بیماری‌های آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جهت تلقیح در شرایط استریل، میگوها در زیر هود

اندازه‌گیری حلالیت در آب

تکه‌های فیلم با ابعاد ۲×۵ سانتی‌متر مربع به منظور رسیدن به یک وزن ثابت، در آون با دمای ۱۰۵ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس فیلم‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شده، سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. فیلم‌ها پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ °C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت دوباره وزن شدند. درصد حلالیت با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Zolfi et al., 2014).

درصد حلالیت = ((وزن خشک نهایی - وزن خشک

اولیه) / (وزن خشک اولیه) × ۱۰۰

نفوذپذیری نسبت به بخار آب

این آزمون با استفاده از روش ASTM E96-95 سنجش شد. درون ظروف شیشه‌ای با قطر ۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۳ سانتی‌متر، کلرید کلسیم ریخته شد، سپس سطح ظرف به وسیله فیلم و با استفاده از گریس و گیره فلزی پوشانده شد. ظروف درون دسیکاتوری حاوی محلول اشباع کلرید سدیم (دمای ۲۵ °C و رطوبت ۷۵ درصد) قرار گرفتند. تغییرات وزن ظروف طی زمان با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. نفوذپذیری بخار آب بر حسب g/m.s.pa با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{\Delta R}$$

ΔR : اختلاف فشار جزئی بین درون و بیرون فنجانک بر حسب پاسکال، X: ضخامت فیلم بر حسب متر

اندازه‌گیری خواص مکانیکی

مقاومت کششی و کرنش تا نقطه شکست با استفاده از دستگاه سنجش بافت Stable Micro Systemr مدل TA.XT.PLUS ساخت کشور انگلستان و بر اساس روش استاندارد ASTM D882-02 اندازه‌گیری شد. نمونه‌های فیلم به مدت ۷۲ ساعت در رطوبت نسبی ۵۳ درصد که توسط محلول اشباع نیترات منیزم ایجاد شده بود قرار گرفتند. سپس فیلم‌های بریده شده در ابعاد ۱×۶ سانتی-متر مربع بین دو فک دستگاه با فاصله اولیه ۴۰ میلی‌متر قرار گرفتند و فک بالا با سرعت ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه شروع به حرکت کرد. مقاومت کششی فیلم‌ها از رابطه ۳ و کرنش تا

لیستریا مونوسیژنوز بر روی پلیت‌های محیط آگار BHI کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده در دمای 30°C و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد باکتری به صورت Log cfu/g بیان شد (Roomiani et al., 2017).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی و سپس آزمون آماری آنالیز واریانس و جهت مقایسه میانگین‌ها آزمون تعقیبی دانکن در نرم افزار SPSS20 و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کلیه نمودارها با اکسل ۲۰۱۰ رسم گردید.

نتایج

ترکیب شیمیایی اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium*) با استفاده از GC-MS با توجه به نتایج جدول ۱، لینالول (۳۴/۶۸ درصد)، آلفاترپینئول (۷/۵۳ درصد)، نئوفیتادین (۵/۷۳ درصد)، کاریوفیلین (۴/۵۸ درصد)، بنزن (۴/۳۶ درصد)، اکتاترین (۲/۳۲ درصد) و بتامیرسین (۲/۰۳ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس برگ نارنج بودند.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium L*) با استفاده از GC-MS

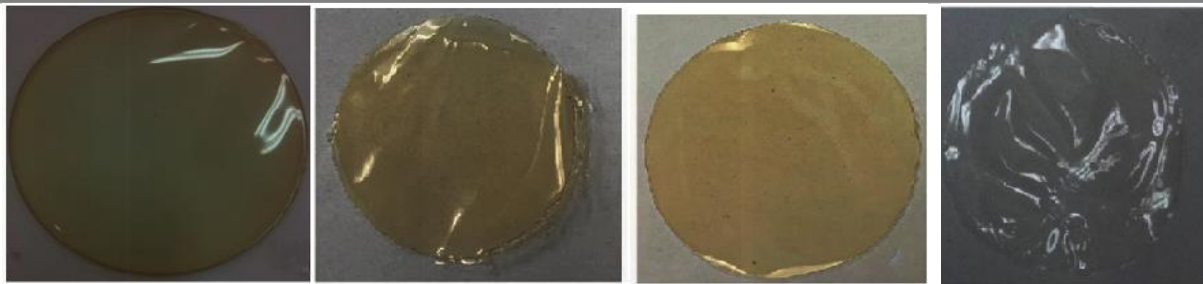
ترکیبات	درصد	زمان جداسازی
بتامیرسن	۲/۰۳	۹
اکتاترین	۲/۳۲	۱۰/۹۹
لینالول	۳۴/۶	۱۳/۰۲
آلفاترپینئول	۷/۵۳	۱۶/۱۴
دلناکارن	۱۴/۷۵	۱۸/۳۳
کاریوفیلین	۴/۵۸	۲۳/۶۵
نئوفیتادین	۵/۷۳	۳۸/۸۱
بنزن	۴/۳۶	۴۷/۰۳

نتایج فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با اسانس نارنج

در شکل ۱، تصویر فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد نشان داده شده است. با توجه به تصویر با افزایش سطح اسانس نارنج پیوستگی در ساختار فیلم افزایش یافته و رنگ آن تیره‌تر شده است.

بیولوژیک از کیسه خارج و در پلیت استریل قرار داده شدند. باکتری در زیر هود به صورت نقطه‌ای در ۱۰ نقطه و جمعاً به میزان ۱۰۰ میکرومتر به میگوها تلقیح شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش لوله کووت حاوی تقریباً 10^5 باکتری در هر میلی‌لیتر بود. در شیشه زیمکس ۱ میلی‌لیتر از کووت برداشته شده و ۳۹ میلی‌لیتر آب استریل به آن افزوده گردید تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس $10^8 \times 1/4$ باکتری موجود باشد. در زمان تلقیح میگوها از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده شد تا در هر سانتی‌متر مربع از برش میگو $10^2 \times 1$ باکتری موجود باشد. سپس میگوها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در زیر هود نگهداری شدند تا باکتری‌ها جذب بافت شوند. کیسه‌های حاوی میگوی تلقیح شده به یخچال با دمای 4°C منتقل شدند (Roomiani et al., 2017).

اندازه‌گیری بار میکروبی در میگو ۵ گرم میگو با ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر به کیسه استریل منتقل و توسط دستگاه استومیکر به صورت هموژن در آمدند. کشت از نمونه‌های هموژن شده باکتری ویبریو پاراهمولایتیکوس با استفاده لوپ استریل و بر روی محیط کشت TCBS (تیوسولفات سترات بیلی سوکروز آگار) با شوری ۲-۱/۵ درصد و باکتری



شاهد
فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۰/۵ درصد اسانس نارنج
فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۱ درصد اسانس نارنج
فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۲ درصد اسانس نارنج

شکل ۱- فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج در غلظت‌های مختلف

کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس کمترین حلالیت در آب ($0.49 \pm 0.31/15$ درصد) را داشت ($p < 0.05$). نفوذپذیری به بخار آب تاثیر استفاده از کیتوزان، آلژینات سدیم و اسانس نارنج و ترکیب آنها بر روی نفوذپذیری به بخار آب در جدول ۲، نشان داده شده است. نفوذپذیری به بخار آب برای فیلم شاهد 0.87×10^{-10} g/msPa بود و با افزایش غلظت اسانس، نفوذپذیری به بخار آب افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان می‌دهد ترکیب کیتوزان - آلژینات-سدیم و اسانس نارنج میزان نفوذپذیری به بخار آب را نیز افزایش داد به این ترتیب کمترین میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج 1.79×10^{-10} g/msPa بود ($p < 0.05$).

ضخامت فیلم

همانطور که جدول ۲ نشان می‌دهد، ضخامت فیلم از 0.98 میلی‌متر در تیمار شاهد به 0.171 میلی‌متر در تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با اسانس ۲ درصد رسید. ضخامت فیلم تیمارهای حاوی اسانس دارای اختلاف معنی‌دار با هم بودند ($p < 0.05$). هرچقدر میزان اسانس در فیلم بیشتر شود، میزان ضخامت آن افزایش می‌یابد.

درصد حلالیت

در جدول ۲، درصد حلالیت در آب فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم و نیز ترکیب آنها با اسانس نارنج نشان داده شده است. با توجه به نتایج، افزایش سطح اسانس به فیلم، میزان حلالیت در آب را کاهش داد، به این ترتیب که تیمار شاهد با ($0.48 \pm 0.72/49$ درصد) بالاترین درصد حلالیت و فیلم

جدول ۲- نتایج اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با اسانس نارنج

فیلم	ضخامت (میلی‌متر)	حلالیت در آب (درصد)	نفوذپذیری به بخار آب ($g/msPa \times 10^{-10}$)	میزان کشش (درصد)	مقاومت کششی (MPa)
شاهد	0.98 ± 0.06^a	$49.0 \pm 72/48^g$	0.87 ± 0.4^a	$37.0 \pm 89/23^a$	$39.1 \pm 85/8^h$
فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم	0.171 ± 0.06^b	$30.0 \pm 28/27^e$	$1.0 \pm 21/0.4^c$	$48.2 \pm 71/0.8^c$	$31.0 \pm 54/76^f$
فیلم با اسانس ۰/۵ درصد	0.13 ± 0.06^d	$21.1 \pm 20/88^c$	$1.0 \pm 31/0.3^d$	$53.1 \pm 33/53^e$	$20.0 \pm 11/88^c$
فیلم با اسانس ۱ درصد	0.14 ± 0.04^e	$17.0 \pm 58/46^b$	$1.0 \pm 42/0.2^e$	$56.1 \pm 94/19^f$	$16.0 \pm 0.3/22^b$
فیلم با اسانس ۲ درصد	0.17 ± 0.03^f	$15.0 \pm 31/49^a$	$1.0 \pm 79/1.0^f$	$59.1 \pm 37/34^g$	$14.0 \pm 77/99^a$

حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح 0.05 است ($p < 0.05$)

خواص مکانیکی

خواص مکانیکی فیلم شامل میزان کشش و مقاومت فیلم در جدول ۲ مشاهده می‌شود. بالاترین میزان کشش در بین تیمارهای مورد بررسی با $59/37$ درصد به فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج تعلق داشت.

همچنین کمترین میزان مقاومت کششی با $14/77$ مگاپاسکال به این تیمار اختصاص داشت ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که تیمار شاهد با $37/89$ درصد و $39/85$ مگاپاسکال به ترتیب کمترین میزان کشش و بالاترین مقاومت کششی را از خود نشان داد ($p < 0.05$).

افزایش سطح اسانس به فیلم میزان کشش افزایش و مقاومت کششی کاهش یافت ($p < 0/05$).

اثر اسانس نارنج و ترکیب آن با فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم بر رفتار رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگوی وانامی

نتایج تاثیر اسانس نارنج بر ویبریو پاراهمولایتیکوس در میگوی وانامی در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج این جدول، به جز روز اول، بار میکروبی در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ در تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج با یکدیگر و با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت ($p < 0/05$) و در تمام روزهای بررسی، تیمار ۲ درصد اسانس نارنج، کمترین بار میکروبی و تیمار شاهد بالاترین میزان را داشت ($p < 0/05$). روند افزایش میزان باکتری با افزایش زمان در هر سه تیمار اسانس نارنج و شاهد قابل مشاهده بود و کمترین بار میکروبی در تمامی تیمارها در روز صفر و بیشترین بار میکروبی در تمام تیمارها در روز پانزدهم در میگوی وانامی اندازه گیری شد ($p < 0/05$).

در جدول ۴، میزان تاثیر فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی سه تیمار ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج با تیمار شاهد مقایسه شده است. در روز صفر بین چهار تیمار، در مورد میزان هر دو باکتری در میگو، اختلاف معنی دار وجود نداشت ($p > 0/05$). با افزایش زمان نگهداری میگو، میزان باکتری در چهار تیمار دارای اختلاف معنی دار آماری بود ($p < 0/05$) و بالاترین میزان باکتری ها در تمام تیمارها در روز پانزدهم اندازه گیری شد ($p < 0/05$). در تمامی روزهای بررسی بالاترین و کمترین میزان باکتری در تیمار شاهد و با اختلاف معنی دار در تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات ۲ درصد اسانس نارنج اندازه گیری شد ($p < 0/05$).

در انتهای دوره نگهداری، در تیمارهای فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی اسانس نارنج، میزان باکتری لیستریا مونوسیتوزنز در مقایسه با نمونه شاهد کمتر بود و نتایج نشان داد با افزایش سطح اسانس میزان باکتری نیز کاهش معنی داری داشت. در هر دو باکتری، تیمار شاهد تا روز ششم توانست سبب کنترل آنها در میگوی وانامی شود. فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج توانست تا روز پانزدهم میزان ویبریو و لیستریا در میگوی وانامی را کنترل کند ($p < 0/05$).

جدول ۳- اثر اسانس نارنج بر رفتار رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگوی وانامی (LogCFU/g)

تیمار / روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
<i>ویبریو پاراهمولایتیکوس</i>						
شاهد	۳/۰ ± ۲۵/۰۴ ^{Aa}	۴/۰ ± ۹۹/۰۷ ^{Ab}	۶/۰ ± ۷۵/۰۲ ^{Ac}	۷/۰ ± ۵۰/۱۰ ^{Ad}	۸/۰ ± ۶۹/۰۳ ^{Ae}	۹/۰ ± ۷۵/۱۰ ^{Af}
اسانس ۰/۵ درصد	۳/۰ ± ۲۰/۰۸ ^{Aa}	۴/۰ ± ۰۸/۰۶ ^{Bb}	۵/۰ ± ۶۵/۲۰ ^{Bc}	۶/۰ ± ۴۹/۰۳ ^{Bd}	۷/۰ ± ۸۳/۰۲ ^{Be}	۸/۰ ± ۰۴/۱۱ ^{Bf}
۱ درصد	۳/۰ ± ۲۳/۰۱ ^{Aa}	۴/۰ ± ۰۰/۰ ^{Cb}	۵/۰ ± ۲۰/۰۳ ^{Cc}	۶/۰ ± ۲۸/۰۵ ^{Cd}	۷/۰ ± ۱۴/۱۲ ^{Ce}	۷/۰ ± ۲۲/۰۹ ^{Cf}
۲ درصد	۳/۰ ± ۲۶/۰۵ ^{Aa}	۳/۰ ± ۶۹/۰۱ ^{Db}	۴/۰ ± ۱۵/۰۳ ^{Dc}	۵/۰ ± ۹۴/۰۸ ^{Dd}	۶/۰ ± ۳۳/۱۹ ^{De}	۷/۰ ± ۱۰/۰۴ ^{Df}
<i>لیستریا مونوسیتوزنز</i>						
شاهد	۳/۰ ± ۴۰/۵۲ ^{Aa}	۴/۰ ± ۸۱/۱۳ ^{Ab}	۶/۰ ± ۵۷/۰۲ ^{Ac}	۷/۰ ± ۱۰/۰۷ ^{Ad}	۷/۰ ± ۸۰/۱۱ ^{Ae}	۹/۰ ± ۹۱/۰۷ ^{Af}
اسانس ۰/۵ درصد	۳/۰ ± ۳۷/۱۷ ^{Aa}	۴/۰ ± ۷۴/۲۳ ^{Bb}	۶/۰ ± ۱۰/۰۵ ^{Bc}	۶/۰ ± ۷۷/۱۶ ^{Bd}	۷/۰ ± ۷۷/۱۵ ^{Be}	۸/۰ ± ۱۷/۱۰ ^{Bf}
۱ درصد	۳/۰ ± ۲۰/۲۳ ^{Aa}	۳/۰ ± ۹۸/۰۹ ^{Cb}	۴/۰ ± ۷۸/۱۹ ^{Cc}	۵/۰ ± ۴۱/۴۰ ^{Cd}	۷/۰ ± ۰۹/۰۶ ^{Ce}	۷/۰ ± ۳۹/۱۷ ^{Cf}
۲ درصد	۳/۰ ± ۵۱/۱۴ ^{Aa}	۳/۰ ± ۷۰/۱۱ ^{Db}	۴/۰ ± ۳۵/۴۲ ^{Dc}	۵/۰ ± ۱۰/۰۶ ^{Dd}	۶/۰ ± ۱۶/۰۴ ^{De}	۷/۰ ± ۰۸/۰۹ ^{Df}

حروف کوچک اختلاف معنی دار بین روزها در هر تیمار و حروف بزرگ اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می دهد ($p < 0/05$).

جدول ۴- اثر فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج بر رفتار رشد ویبریو پاراهمولاینتیکوس و لیستریا مونوسیٹوژنز در میگوی وانامی (LogCFU/g)

تیمار	روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
<i>ویبریو پاراهمولاینتیکوس</i>							
شاهد		۲/۰۰±۰/۰۲ ^{A a}	۴/۹۱±۰/۰۷ ^{A b}	۶/۵۰±۰/۰۲ ^{A c}	۷/۴۷±۰/۰۲ ^{A d}	۸/۱۹±۰/۰۱ ^{A e}	۹/۱۵±۰/۱۲ ^{A f}
فیلم و اسانس ۰/۵ درصد		۲/۰۱±۰/۰۱ ^{A a}	۳/۷۱±۰/۰۸ ^{B b}	۵/۲۰±۰/۰۱ ^{B c}	۶/۷۴±۰/۰۴ ^{B d}	۷/۲۷±۰/۱۳ ^{B e}	۸/۰۱±۰/۱۸ ^{B f}
فیلم و اسانس ۱ درصد		۲/۱۵±۰/۰۴ ^{A a}	۳/۴۶±۰/۰۳ ^{C b}	۴/۱۱±۰/۰۵ ^{C c}	۵/۱۹±۰/۰۴ ^{C d}	۷/۱۲±۰/۱۹ ^{C e}	۷/۰۴±۰/۰۸ ^{C f}
فیلم و اسانس ۲ درصد		۲/۰۴±۰/۰۱ ^{A a}	۳/۳۸±۰/۰۲ ^{D b}	۴/۰۲±۰/۰۲ ^{D c}	۴/۳۹±۰/۰۵ ^{D d}	۶/۳۱±۰/۰۷ ^{D e}	۶/۹۷±۰/۰۵ ^{D f}
<i>لیستریا مونوسیٹوژنز</i>							
شاهد		۳/۰۱±۰/۱۲ ^{A a}	۳/۹۹±۰/۰۱ ^{A b}	۶/۳۰±۰/۰۷ ^{A c}	۷/۴۲±۰/۰۱ ^{A d}	۷/۷۲±۰/۰۱ ^{A e}	۸/۱۱±۰/۰۵ ^{A f}
فیلم و اسانس ۰/۵ درصد		۳/۰۲±۰/۱۱ ^{A a}	۳/۶۵±۰/۰۳ ^{B b}	۶/۲۰±۰/۰۵ ^{B c}	۶/۱۵±۰/۰۱ ^{B d}	۷/۱۷±۰/۱۱ ^{B e}	۷/۸۷±۰/۱۵ ^{B f}
فیلم و اسانس ۱ درصد		۳/۰۴±۰/۰۳ ^{A a}	۳/۳۳±۰/۰۴ ^{C b}	۴/۰۸±۰/۰۱ ^{C c}	۵/۱۱±۰/۰۲ ^{C d}	۷/۰۱±۰/۰۴ ^{C e}	۷/۱۹±۰/۱۴ ^{C f}
فیلم و اسانس ۲ درصد		۳/۰۱±۰/۱۱ ^{A a}	۳/۲۱±۰/۰۱ ^{D b}	۳/۱۱±۰/۰۲ ^{D c}	۵/۰۱±۰/۰۱ ^{D d}	۶/۲۵±۰/۰۲ ^{D e}	۶/۷۰±۰/۰۸ ^{D f}

حروف کوچک اختلاف معنی دار بین روزها در هر تیمار و حروف بزرگ اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می دهد ($p < 0/05$).

بحث

است. Alizadeh و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی خواص

فیلم خوارکی حاوی اسانس صمغ بنه، نیز افزایش ضخامت فیلم در اثر افزودن اسانس را ناشی از محبوس شدن ذرات اسانس دانستند.

از طرفی افزودن اسانس به فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم درصد حلالیت در آب را کاهش داد که آن را می توان ناشی از ایجاد پیوندهای عرضی بین ترکیبات اسانس و نیز گروه-های آمیدی و استری کیتوزان دانست که با کاهش گرایش کیتوزان به آب، حلالیت فیلم را در آب کاهش داده است (Liu et al., 2021). Song و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تاثیر افزودن اسانس منگول به فیلم کیتوزان نیز کاهش حلالیت را مربوط به ایجاد پیوندهای فیلم با اسانس گزارش کردند که با یافته های مطالعه حاضر هم خوانی دارد. این کاهش نفوذپذیری با افزایش توانایی بخار آب در فیلم کیتوزان - آلژینات حاوی اسانس همراه بود که نشان دهنده کاهش پیوستگی و ایجاد منافذ ریز در ساختار فیلم در حضور اسانس است که با یافته های Bonilla و همکاران (۲۰۱۲) در مورد فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن هم-خوانی دارد.

با توجه به نتایج جدول ۲، مقاومت کششی و میزان کشش روندی عکس با یکدیگر داشتند به این ترتیب با افزایش اسانس به فیلم مقاومت کششی کاهش ولی میزان کشش

بر اساس آنالیز اسانس برگ نارنج (جدول ۱)، فراوان ترین ترکیب موجود در اسانس نارنج، لینالول با ۳۴/۶۸ درصد بود. Oulebsir و همکاران (۲۰۲۲) ترکیبات آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان اسانس نارنج را لینالول، لینالیل استات و آلفا ترپینئول گزارش کردند. همچنین Lin و همکاران (۲۰۲۱)، در بررسی ترکیبات اسانس چند گونه نارنج، ذکر کردند که اسانس استخراج شده به سبب داشتن ترکیبات لیمونن، ترپینئول و لینالول، دارای فعالیت ضدباکتریایی بالایی است. شرایط جغرافیایی، فصل، زمان، مکان برداشت و استفاده از روش های مختلف استخراج می تواند بر نتایج تاثیر بگذارد (Azhdarzadeh and Hojjati, 2016).

دانستن اطلاعات در مورد شاخص های مکانیکی جهت طراحی فرآیند بسته بندی و پیش بینی توانایی آن ها در حفظ یکپارچگی فیلم در زمان بسته بندی، اهمیت بالایی دارد (Shojaee-Aliabadi et al., 2013). در مطالعه حاضر تاثیر افزودن اسانس به فیلم کیتوزان-آلژینات بر روی خواص فیلم تاثیر گذاشته است. یافته ها نشان داد که با افزایش سطح اسانس، ضخامت فیلم به طور معنی داری افزایش یافت که می توان آن را ناشی از گرفتار شدن ریز قطرات اسانس در فیلم و تشکیل ماتریس نرم و ساختار بیرون زده نسبت داد که منجر به افزایش ضخامت فیلم شده

باکتریایی اسانس نارنج علیه *Saccharomyces cerevisiae* را ناشی از وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مونوترپن‌ها بخصوص لینالول (۵۹/۸۸ درصد اسانس) موجود در اسانس نارنج دانستند که با افزایش غلظت اسانس، قدرت ضدباکتری آنها نیز افزایش یافت که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

Benzaid و همکاران (۲۰۲۱) کاهش میزان *Streptococcus mutans* موجود در گوشت با افزودن اسانس نارنج را گزارش کردند که نشان دهنده تاثیر اسانس‌های گیاهی در کاهش بار میکروبی مشابه یافته‌های تحقیق حاضر است.

روند افزایش میزان باکتری‌ها با افزایش زمان نگهداری در فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم نیز قابل مشاهده بود. Chidanandaiah و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی تاثیر پوشش خوراکی سدیم آلژینات بر میزان باکتری موجود در گوشت، عنوان کردند که سدیم آلژینات سبب از بین بردن میکروارگانیسم‌های عامل مسمومیت غذایی در مقایسه با شاهد شد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. آلژینات توانایی تولید کپسول‌هایی کوچک مقیاس (۱۰۰ میکرون با منافذ ۱۷ نانومتری) جهت ذخیره مواد آنتی‌اکسیدانی یا ضدباکتریایی نظیر اسانس را دارد. آلژینات سبب کاهش نسبت اسیدگلوکورونیک به اسیدمنورونیک در ساختار ژل، سبب افزایش تخلخل در ژل آلژینات شده و این امر لایه‌ای نیمه تراوا را ایجاد می‌کند که از نفوذ میکروارگانیسم‌ها به بافت پوشش‌دار جلوگیری می‌کند (Fujki et al., 2009). فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج، بالاترین فعالیت ضدباکتریایی بر ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسی‌توزنز را داشت و توانست تا پایان روز پانزدهم نگهداری میزان آنها را در میگوی وانامی در محدوده مجاز برای مواد غذایی نگه دارد. Benavides و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر فیلم آلژینات حاوی اسانس نارنج بر *E. coli*، *S. monocytogenes*، *Salmonella enteritidis* و *aureus* عنوان کردند که ترکیب اسانس نارنج و آلژینات به طور موثری قادر به کنترل رشد عوامل بیماری‌زا در مواد

افزایش یافت به این ترتیب کمترین میزان مقاومت کششی و بیشترین میزان کشش در فیلم کیتوزان-آلژینات حاوی ۲ درصد اسانس نارنج اندازه‌گیری شد. Shojaee- Aliabadi و همکاران (۲۰۱۳) تبدیل پیوندهای قوی پلیمر-پلیمر کیتوزان با پیوندهای سست پلیمر-روغن در حضور اسانس، منجر به کاهش مقاومت کششی فیلم می‌شود. Alizadeh و همکاران (۲۰۱۷) افزودن اسانس بنه به فیلم کیتوزان را عامل افزایش کشش گزارش کردند.

میانگین مقدار اولیه ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسی‌توزنز در میگوهای مورد بررسی به ترتیب در محدوده $3/61 \text{ Log CFU/g}$ و $3/52 \text{ Log CFU/g}$ بود که بر اساس (Nowzari et al., 2013) میزان مناسب باکتری فیله $3-4 \text{ Log CFU/g}$ گزارش شده است، در محدوده موردنظر بود. این میزان اولیه ناشی از آلودگی در طول صید، برداشت و عمل‌آوری است. در میگوهای هر ۳ تیمار ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج، روند افزایش بار باکتریایی ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسی‌توزنز با افزایش زمان نگهداری قابل مشاهده بود. در تیمار ۲ درصد اسانس نارنج، میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس تا روز دوازدهم نگهداری و لیستریا مونوسی‌توزنز تا روز پانزدهم نگهداری در محدوده مجاز کمیته بین‌المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی یا (ICMSF) Log (7 CFU/g) قرار داشت. در دو تیمار ۰/۵ و ۱ درصد اسانس نارنج، بار میکروبی ویبریو پاراهمولایتیکوس در میگو تا روز نهم و پانزدهم و تیمار شاهد تا روز ششم در محدوده مجاز قرار داشت. در مورد لیستریا مونوسی‌توزنز تیمار ۰/۵ و ۱ درصد اسانس تا روز نهم و شاهد تا روز ششم در محدوده مجاز قرار داشتند. مکانیسم فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به حمله این اسانس‌ها به فسفولیپیدهای موجود در دیواره سلولی باکتری مربوط می‌شود که سبب افزایش نفوذ و تراوش سیتوپلاسم به خارج از سلول می‌شود (Degirmenci and Erkurt, 2020). همکاران (۲۰۲۲) حضور ترکیبات فنولی و فلانوئیدی را به عنوان ترکیبات ضدباکتری کنترل رشد آنها ذکر کردند. Azhdarzadeh و Hojjati (۲۰۱۶) فعالیت ضد

(۲۰۲۰) عنوان کردند که پلی فنول‌ها به سلول‌های انتقال-دهنده پروتئین و کربوهیدرات‌هایی که مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند متصل و از رشد آنها جلوگیری می‌کند و این امر به دلیل کارایی بالاتر فیلم کیتوزان-آلژینات همراه با اسانس‌های *Artemisia dracunculus* و *Zataria multiflora* در افزایش ماندگاری فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

محلول بودن در آب و وزن مولکولی پایین کیتوزان (Qiu et al., 2022) و پایداری آلژینات (Ramos et al., 2023) ترکیبی کارآمد را برای تولید فیلم ایجاد می‌کنند. این موضوع در کنار خواص ضدباکتریایی اسانس و خاصیت هیدروفوبیک طبیعی، سبب می‌شود پروتئین درون فیلم مقاومت بیشتری به آب پیدا کرده و خاصیت انعطاف فیلم افزایش یابد (Yao et al., 2017) که این امر خود ماندگاری بالاتر مواد غذایی را ضمانت و تایید کننده نتایج یافته‌های تحقیق حاضر است. همچنین با توجه به دوست‌دار محیط زیست بودن این ترکیبات و از بین رفتن سریع آنها در محیط‌زیست می‌توان عنوان کرد که استفاده از فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج به شکل موثری قادر به کاهش میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در میگو وانامی شده و می‌توان از آن در صنعت غذا استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزودن آلژینات سدیم و اسانس نارنج در غلظت‌های مختلف به فیلم کیتوزان، به طور معنی‌داری بر خصوصیات فیلم تاثیر گذاشت. افزودن اسانس و آلژینات سدیم باعث افزایش ضخامت، کشش و نفوذپذیری به بخار آب شد. هم‌چنین ویژگی ضدباکتریایی فیلم در مقابل ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در میگو نیز افزایش یافت. افزایش سطح اسانس نارنج به خاطر وجود میزان ماده فعال لینالول در اسانس، سبب شد که بالاترین قدرت ضدباکتریایی به تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم در ترکیب با ۲ درصد اسانس نارنج

غذایی است. Ramos و همکاران (۲۰۲۳) اثرات ضدباکتریایی پوشش آلژینات سدیم را بررسی کردند و نشان دادند که ترکیب آلژینات سدیم و عصاره هیدروالکلی *Macrocystis pyrifera* فعالیت ضدباکتری فیلم را افزایش می‌دهد که در اثر مواد فنولی موجود در اسانس است. Kakaei و Shahbazi (۲۰۱۶) در بررسی تاثیر فیلم کیتوزان-ژلاتین در ترکیب با عصاره دانه انگور قرمز و اسانس *Ziziphora clinopodioides* بر بقای *Listeria monocytogenes* در فیله قزل‌آلا، عنوان کردند که این ترکیب کارایی بالایی در افزایش ماندگاری فیله قزل‌آلا داشته و توانست تقریباً بار باکتریایی را به میزان ۱-۳ Log CFU/g در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Yao و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تاثیر فیلم کیتوزان-ژلاتین و اسانس لیمو افزایش خاصیت ضد میکروبی در مقابل *E. coli* را با افزایش غلظت اسانس گزارش کردند و آنها این امر را به افزایش قدرت ضد میکروبی اسانس لیمو مرتبط دانستند، زیرا مواد موجود در اسانس لیمو از دیواره سلولی باکتری عبور کرده و بر روی بقای سلول تاثیر می‌گذارد. Sayadi و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تاثیر فیلم سدیم-آلژینات و اسانس زیره‌سبز، افزایش فعالیت ضد میکروبی این فیلم را در مقابل *Enterobacteriaceae*، *Pseudomonas spp.* و *L. monocytogenes* ناشی از افزایش غلظت اسانس گزارش کردند که هر دو مطالعه با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

نتایج نشان داده که مکانیسم فعالیت کیتوزان به برهم‌کنش بین گروه آمین و شارژ منفی غشاء دیواره سلولی که سبب گسسته شدن پروتئین سلولی و الکترولیت‌ها می‌شود، همچنین این عملکرد همانند سدی در برابر اکسیژن عمل می‌کند و سبب به دام افتادن مواد مغذی و فلزات ضروری می‌شود (Hadidi et al., 2022). ترکیب کیتوزان با اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن محتوی پلی‌فنولیکی شامل هیدروکویانونون، کافئیک‌اسید، گالیک‌اسید و رسوراترول است. چنین نتیجه‌ای در مطالعات Rezaeian و همکاران (۲۰۲۱) نیز دیده شد. Raeisi و همکاران

تعلق گیرد که توانست سبب کاهش باکتری‌ها در میگوی وانامی تا پایان روز پانزدهم شود.

منابع

1. ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95, Annual book of ASTM, Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
2. ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, In Annual book of ASTM standards designation D882, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
3. Alizadeh V. Baezagarm H. Nasehi B and Samavati V. 2017. Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing *Pistacia atlantica* gum essential oil. Iran Food Sci Tech Res J. 13: 584-593.
4. Azhdarzadeh F and Hojjati M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. Nut Food Sci Res. 3:43-50.
5. Benavides S. Villalobos-Carvajal R and Reyes J. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. J Food Engin, 110 (2): 232-239.
6. Bonilla J. Atarés L. Vargas M and Chiralt A. 2012. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food Hydrocolloids. 26(1): 9-16.
7. Benzaid C. Belmadani A. Tichati L. Djeribi R and Rouabhia M. 2021. Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil on *Streptococcus mutans* growth, biofilm formation and virulent genes expression. Antibiotics. 10: 54-60.
8. Chidanandaiah H. Keshri R.C and Sanyal M.K. 2007. Effect of sodium alginate coating with preservatives on the quality of meat paties during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage. J Muscle Foods. 20: 275-292.
9. Degirmenci H and Erkurt H. 2020. Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. LWT Food Sci. Technol. 126: 109273-109281.
10. Dehghan H and Roomiani L. 2020. Antimicrobial activity of nanoclay films enriched with *Citrus aurantium* essential oil against indicator foodborne pathogens in fishery products. IJNSFT. 14: 103-111.
11. Fathimoghadam F. Shahamirian M. Roomiani L and Tadayoni M. 2023. Effect of gelatin-based film activated with Persian lime (*Citrus latifolia*) essential oil on the shelf life of shrimp. Food Measurement and Characterization. doi.org/10.1007/s11694-023-01839-2
12. Feng S. Tang Q. Xu Z. Huang K. Li H and Zou Z. 2023. Development of novel Co-MOF loaded sodium alginate based packaging films with antimicrobial and ammonia-sensitive functions for shrimp freshness monitoring. Food Hydrocolloids. 135. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108193
13. Fujiki K. Matsuyama H and Yano T. 2009. Protective effect of sodium alginate against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. J Fish Dis. 17: 349 – 355

14. Hadidi M. Pouramin S. Adinepour F. Haghani S and Jafari S. 2020. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbo Pol.* 236: 116075- 116085.
15. ICMSF. 1986. *Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*, 2th ed, Toronto: University of Toronto Press, 1986
16. Kakaei S and Shahbazi Y. 2016. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT - Food Sci Technol.* 72: 432-438.
17. Khorrami N. Radi M. Amiri S. and Julian Mc Clements D. 2021. Fabrication and characterization of alginate-based films functionalized with nanostructured lipid carriers. *Inter J Biol Macromol.* 182: 373-384.
18. Lin X. Cao S. Sun J. Lu D. Zhong B and Chun J. 2021. The chemical compositions, and antibacterial and antioxidant activities of four types of citrus essential oils. *Molecules.* 26: 3412
19. Liu D. 2006. Identification subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes* an important foodborn pathogen. *J Med Microbiol.* 55: 645-659
20. Liu M. Zhu X. Zhang C. Zhao Z. and Lux Q. 2021. LuxQ- LuxU-Lux-O pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Res.* 250: 126791.
21. Liu T. Liu L. Gong X. Chi F. Ma Z. 2021. Fabrication and comparison of active films from chitosan incorporating different spice extracts for shelf life extension of refrigerated pork. *LWT.* 135: 110181
22. Maghami M. Motalebi A.A and Anvar S.A.A. 2019. Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of *Huso huso* fish fillets during the storage. *Food Sci Nutr.* 7: 3030–3041.
23. Ming Z. Su Y.C. DeWitt C.M. and Waite-Cusic J. 2018. Flow rate of depuration system has minimal impact on *Vibrio parahaemolyticus* decontamination in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J Food Saf.* 38: 12531-12541.
24. Moazeni Jola B and Roomiani L. 2018. The effect of chitosan extracted from *Metapenaeus affinis* on the shelf life of grass carp fillets packed in vacuum. *Fisheries.* 3:295-308.
25. Moradi T. Sharifan A and Larijani K. 2020. The effect of multilayered chitosan–pectin–*Mentha piperita* and lemon essential oil on oxidation effects and quality of rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigeration at 4±1°C storage. *Iran J Fish Sci.* 19: 2544-2559.
26. Nehchiri N. Amiri S. and Radi M. 2021. Improving the water barrier properties of alginate packaging films by submicron coating with drying linseed oil. *Pack Technol Sci.* 34 (5): 283-295.
27. Nowzari F. Shabanpour B and Ojagh S.M. 2013. Comparison of chitosan-gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.* 141(3): 1667-1672
28. Oulebsir C. Mefti-Korteby H. Djazouli Z.E. Zebib B and Merah O. 2022. Essential oil of *Citrus aurantium* L. leaves: composition, antioxidant activity, elastase and

- collagenase inhibition. *Agronomy*. 12: 1466.
29. Qiu L. Ma H. Luo Q. Bai C. Xiong G. Jin S. Wang J. Zu X. Li H and Liao T. 2022. Preparation, characterization and application of modified starch/chitosan/sweet orange oil microcapsules. *Food*. 11: 2306.
30. Rai S. Tyagi A. Kumar B.T.N and Reddy V.K. 2023. Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila* lytic phage, and evaluation of a phage cocktail against *A. hydrophila* contamination in fish fillet. *Food Control*. 145: 109460.
31. Raeisi M. Hashemi M. Aminzare M. Ghorbani Bidkorpeh F. Ebrahimi M. Jannat B. Tepe B and Noori S.M.A. 2020. Effects of sodium alginate and chitosan coating combined with three different essential oils on microbial and chemical attributes of rainbow trout fillets. *J Aquatic Food Prod Technol*. 29 (3): 253-263.
32. Ramos J. Villacrés N.A Cavalheiro É.T.G Alarcón H.A and Valderrama A.C. 2023. Preparation of sodium alginate films incorporated with hydroalcoholic extract of *Macrocystis pyrifera*. *Food Raw Mater*. 11(1): 64–71.
33. Rezaeian M. Khanzadi S. Hashemi M and Azizzadeh M. 2021. Antimicrobial Effect of gel-type nanoemulsion of chitosan coating containing essential oils of *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* on *Pseudomonas* artificially inoculated on to salmon fillets. *Mljgoums*. 15(3): 13-20.
34. Rhim J.W. 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technol*. 37: 323-330.
35. Roomiani L. Soltani M. Akhondzadeh Basti A and Mahmoodi A. 2017. Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System. *Aquatic Food Pro Tech*. 26: 1189- 1198
36. Salama A and Hasanin M. 2020. Synthesis and antimicrobial properties of new chitosan derivatives containing guanidinium groups. *Carbohydr Polym*. 241: 116363
37. Sayadi M. Mojaddar Langroodi A. Amiri S and Radi M. 2022. Effect of nanocomposite alginate- based film incorporated with cumin essential oil and TiO₂ nanoparticles on chemical, microbial, and sensory properties of fresh meat/beef. *Food Sci Nutri*. 10: 1401– 1413
38. Shojaee-Aliabadi S. Hosseini H. Mohammadifar M.A. Mohammadi A. Ghasemlou M. Ojagh S.M and Khaksar R. 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-Carrageenan films containing satureja hortensis essential oil. *Inter J Biol Macromol*. 52: 116-124.
39. Song X. Liu L. Wu X. Liu Y. Yuan J. 2021. Chitosan-Based Functional Films Integrated with Magnolol: characterization, antioxidant and antimicrobial activity and pork preservation. *Int J Mol Sci*. 2021, 22: 7769.
40. Sun X. Liu Y. Jiang P. Song S. and Ai C. 2021. Interaction of sulfated polysaccharides with intestinal Bacteroidales plays an important role in its biological activities. *Int J Biol Macromol*. 168: 496–506.
41. Yao Y. Shao H. Peng Q and Huang Y. 2017. Antibacterial activity and physical properties of fish Gelatin-chitosan edible films supplemented with D-Limonene. *Inter J Poly Sci*. 5: 1-9
42. Zhang X. Sun J. Han Z. Chen F. Lv A. Hu X. Sun X. Qi H. and Guo Y. 2021. *Vibrio*

-
- parahaemolyticus* alters the community composition and function of intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 544: 737061.
43. Zhang B. Peng H. Lin Y and Cai K. 2023. Effects of ginger essential oil on physicochemical and structural properties of agar-sodium alginate bilayer film and its application to beef refrigeration. Meat Science. 198. doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109051
44. Zolfi M. Khodaiyan F. Mousavi M and Hashemi M. 2014. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation, Carbo Poly. 109: 118-125.

The effect of chitosan-sodium alginate film containing citrus essential oil on the growth behavior of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in *Litopenaeus vannamei*

Negin Gholami¹, Roomiani Laleh^{2*}, Tadayoni Mehrnosh³

1-Msc, Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2- Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

3- Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Abstract

In this study, the antibacterial activity of chitosan-sodium alginate film in combination with *Citrus aurantium* essential oil in order to control the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* inoculated to *Litopenaeus vannamei* and also the properties of the film under refrigerated conditions for 15 days, was investigated. The treatments included chitosan-sodium alginate film, chitosan-sodium alginate film containing 0.5, 1 and 2% citrus essential oil. The results showed that the lowest amount of tensile strength (14.77%), water solubility (15.31%) and the highest amount of permeability to water vapor (1.79×10^{-10} g/msPa) in the film treatment with 2% citrus essential oil was observed. Also, adding essential oil to the film increased the thickness (0.171 mm) and elasticity (59.37%) compared to the control ($p < 0.05$). The lowest amount of *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* was measured in the chitosan-sodium alginate film treatment containing 2% citrus essential oil ($p < 0.05$). During 15 days of storage, chitosan-sodium alginate film containing essential oil could reduce *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* compared to the control treatment in shrimp ($p < 0.05$). Chitosan-sodium alginate film containing 2% citrus essential oil delayed the growth of *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* by 9 days compared to the control treatment.

Keywords: *Citrus aurantium* essential oil, Chitosan- sodium alginate film, *Litopenaeus vannamei*

بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica L*) بر القای آپونتوز و پرولیفراسیون انگل لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی

مهناز کریمی^{۱*}، الهه تاج بخش^{۲*}، حسن ممتاز^۲

۱- دانش آموخته ی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نویسندگان مسئول:

karimimahnaz72@gmail.com

ee_tajbakhsh@yahoo.com

چکیده

با توجه به شیوع لیشمانیوز در مناطق مختلف جهان و ایران و نظر به اینکه ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی موان برای درمان بیماری دارای عوارض جانبی متعددی می باشد، استفاده از گیاهان دارویی مورد تأکید قرار گرفته است. این تحقیق به منظور تعیین تأثیر عصاره گیاه دارویی بادرشبی (*Dracocephalum moldavica L*) بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی به روش رنگ سنجی انجام گرفت.

در این مطالعه تجربی لیشمانیا ماژور (*Lishmania Major*) سویه استاندارد به محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی FBS و آنتی بیوتیک های پنی سیلین- استرپتومایسین کشت داده شد و تا زمان رشد کامل در دمای ۳۷ درجه و فشار ۵ درصد CO₂ انکوباتور در مدت ۳-۴ روز در شرایط استریل نگهداری شد. سپس در مرحله ثابت رشد تأثیر غلظت های مختلف عصاره های گیاه بادرشبی در مقایسه با داروی کنترل بر روی آماستیگوت های لیشمانیا ماژور در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش رنگ سنجی MTT، مورد بررسی قرار گرفت.

درصد انگل های زنده در حضور غلظت های مختلف عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی پس از گذشت زمان های مختلف از کشت انگل کاهش چشمگیری داشتند. میزان IC₅₀ عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشبی در زمان های مختلف در مهار لیشمانیا ماژور اثر چشمگیری نشان داد.

واژه های کلیدی: آپونتوز، لیشمانیا ماژور، گیاه بادرشبی، پرولیفراسیون.

مقدمه

بیماری‌های مهم انگلی بوده و می‌توان گفت بعد از مالاریا مهم‌ترین بیماری منتقله توسط بندپایان است. در مناطق اندمیک به‌طور معمول کودکان بیشتر به این بیماری گرفتار می‌شوند، ولی در مناطق غیراندمیک در سنین مختلف مشاهده می‌شود. از آن جایی که لیشمانیوز جلدی یکی از اولویت‌های بهداشتی و پژوهشی سازمان جهانی بهداشت به خصوص در ارتباط با کشورهای در حال توسعه است، لذا در ایران نیز مورد توجه قرار گرفته است و در برنامه‌های پژوهشی متعددی و در جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد (Ivens, et al., 2005 and Alrajhi, et al., 2002).

در سال‌های اخیر به دلیل ظهور مقاومت علیه داروهای استاندارد که عمدتاً ترکیبات پنج ظرفیتی آنتی‌موان می‌باشند، درمان لیشمانیوز با دشواری‌های فراوانی مواجه شده است. گزارش‌های پزشکان معالج حاکی از عود، عدم بهبود و یا تأثیر نامناسب این داروها در بیماران است و از طرف دیگر، این درمان‌ها به ویژه در مناطق روستایی به خاطر هزینه سنگین و عدم دسترسی به آن مناسب نیست. تحقیقات اخیر بر ترکیبات طبیعی گیاهی، اثرات ضدلیشمانیایی کینولین، آلکالوئیدها، ایزوکینولین آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، نفتوکینون‌ها و ترپن‌ها را در برخی از گونه‌های لیشمانیا نشان داده است. گیاهانی که دارای فلاونوئید، آلکالوئید و ترپنوئید هستند، خاصیت ضدالتهابی دارند (Singh, et al., 2014). با توجه به اینکه مصرف داروهای صنعتی با عوارض جانبی زیادی همراه است، توجه به اهمیت گیاهان دارویی و تولید داروهای از آن‌ها برای درمان بیماری‌ها پیوسته تأکید می‌شود. این گیاهان با داشتن ساختمان گسترده شامل سلول‌ها، پروتئین، قند، آنزیم و چربی دارای خاصیت درمانی بر روی انسان به دلیل مواد فعال درون خود می‌باشند (Kobets, et al., 2012). از این‌رو نیاز به استفاده از ترکیبات و داروهای ضدلیشمانیایی مؤثر، با سمیت کم، کم هزینه و همچنین با قابلیت تجویز به صورت خوراکی بیش از پیش احساس می‌شود. در همین راستا با توجه به تنوع

لیشمانیوز در شمار بیماری‌های مشترک انسان و حیوان قرار دارد و به ۳ فرم لیشمانیوز پوستی، احشایی و پوستی-مخاطی بروز می‌کند. شایع‌ترین فرم پوستی به ۲ صورت خشک یا شهری و مرطوب یا روستایی مشاهده می‌شود که عامل آن‌ها به ترتیب لیشمانیا تروپیکا (*L. tropica*) و لیشمانیا مائژور (*L. major*) می‌باشند. عامل بیماری لیشمانیوز یک انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی اجباری از جنس لیشمانیا است. این انگل برحسب محیط زندگی خود به دو شکل بدون تاژک (آماستیگوت) و تاژک‌دار (پروماستیگوت) دیده می‌شود. شکل بدون تاژک این انگل در بدن مهره‌داران و در سلول‌های تک‌هسته‌ای بیگانه‌خوار رشد و تکثیر می‌یابد، اما نوع دارای تاژک آزاد، در بدن پشه خاکی و محیط‌های کشت مصنوعی یافت می‌شود (Mougneau, et al., 2011).

امروزه با وجود پیشرفت‌های فراوانی که در علم پزشکی و به ویژه در کنترل بیماری‌های عفونی حاصل شده است، هنوز هم برخی از بیماری‌های عفونی به عنوان یکی از معضلات بهداشتی در نظر گرفته می‌شوند. سازمان جهانی بهداشت به دلیل اهمیت بهداشتی، این بیماری را در ردیف ۶ بیماری حائز اهمیت در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری معرفی نموده است (Adler, 1964). لیشمانیوز را می‌توان از لحاظ بالینی به سه دسته لیشمانیوز جلدی، جلدی-مخاطی و احشایی تقسیم کرد که فرم جلدی آن شایع‌تر بوده و در برخی از کشورها از قبیل ایران به وفور یافت می‌شود. گستردگی این بیماری در تمام قاره‌های جهان به جز استرالیا مشهود است. طبق اطلاعات سازمان جهانی بهداشت، ۱۲ میلیون نفر در جهان به انواع مختلف لیشمانیوز مبتلا بوده و جمعیتی در حدود ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلاء به این بیماری قرار دارند. سالیانه ۲-۱/۵ میلیون نفر به این انگل مبتلا شده که حدود ۵۰۰ هزار مورد از آن مربوط به لیشمانیوز احشایی و بقیه موارد لیشمانیوز پوستی و پوستی-مخاطی است (Desjeux, 2004). در ایران لیشمانیوز پوستی از

تهیه‌ی عرقیات گرم، از سر شاخه‌های گل‌دار زرین گیاه همراه با سایر گیاهان دارویی نظیر نعنا، آویشن و گل محمدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بادرشبی به دلیل وجود ترکیب‌های فیتوشیمیایی باارزش، قرن‌هاست به عنوان داروی گیاهی در درمان بیماری‌های کلیوی و اختلالات کبدی تجویز می‌شود، علاوه بر این در سال‌های اخیر کاربرد گسترده‌ای در صنایع آرایشی-بهداشتی و غذایی پیدا کرده است. بذرها، حاوی ۲۹ - ۱۸٪ روغن زرد رنگ و معطر هستند که به طور متوسط ۹۰٪ این روغن از اسیدهای چرب غیر اشباع شامل آلفا-لینولنیک (α -Linolenic acid)، لینولئیک (Linoleic acid)، اولئیک اسید (Oleic acid)، پالمیتیک اسید (Palmitic acid)، استئاریک اسید (Stearic acid) تشکیل شده است. بذرها هم‌چنین حاوی ۱۷-۲۲٪ پروتئین، حدود ۳۰٪ فیبر خوراکی قابل حل، ۲۵٪ نشاسته و ۱۶-۱۰٪ موسیلاژ هستند. بذر بادرشبی حاوی مقادیر قابل توجهی ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی نیز است که همین موضوع ارزش قابل توجه آن را به عنوان ماده خام تهیه مکمل‌های غذایی، مشخص می‌کند.

تحقیقات زیادی در مورد شناسایی ترکیب‌های مؤثره عصاره‌های گیاهی و هم‌چنین بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ... انجام شده است، به طوری که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی به شدت تحت تأثیر قطبیت حلال استفاده شده در فرآیند عصاره‌گیری قرار دارد. به همین دلیل انتخاب حلال و روش استخراج مناسب، بسیار مهم است. حلال مناسب معمولاً با توجه به هدف عصاره‌گیری، ظرفیت قطبی ترکیب‌های مورد نظر، قطبیت ترکیب‌های غیر ضروری، هزینه کل و هم‌چنین ایمنی و سازگاری با محیط زیست انتخاب می‌گردد. عصاره‌گیری با حلال شیمیایی، به دلیل ارزان بودن و سهولت اجرا، رایج‌ترین روش استخراج ترکیب‌های فیتوشیمیایی است. به علت سمیت بالای بسیاری از حلال‌ها، مانند متانول و کلروفرم، بیشتر محققان برای استخراج ترکیب‌های فنلی از حلال‌های بی‌خطر مانند اتانول و آب استفاده می‌کنند (Acimovic, et al., 2022 and

گسترده آب و هوایی و گیاهی ایران، استفاده از گیاهان فلور طبیعی هر منطقه به عنوان منبع غنی عوامل دارویی ضدلشمانیایی ضروری می‌باشد (Tajbakhsh, et al., 2021 and Minodier, et al., 2007).

از جمله داروهای ضدلشمانیایی که منشأ گیاهی دارد، می‌توان به آرتمیزینین اشاره کرد. آرتمیزینین یک ترین است (*Artemisia annua*) لاکتون جدا شده از گیاه درمنه که به عنوان داروی ضد مالاریا و ضدلشمانیا شناخته شده است (Zhan, et al., 2023). گیاه *Dracocephalum moldavica L* که به آن اژدهای سر مولداوی یا مومیایی مولداوی نیز گفته می‌شود، گیاهی است علفی و یک‌ساله، متعلق به خانواده *Lamiaceae* این گیاه بومی آسیای مرکزی است و در اروپا نیز یافت می‌شود. به طور سنتی برای درمان سردرد، معده، کبد و ناراحتی‌های قلبی عروقی استفاده می‌شود و هم‌چنین به عنوان افزودنی غذایی استفاده می‌شود. اژدهای سر مولداوی منبع خوبی از پروتئین‌ها، لیپیدها و فیبر است. روغن آن غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده (حدود ۹۰٪)، اساساً اسیدهای لینولنیک و لینولئیک است (Dastmalchi, et al., 2007 and Golparvar, et al., 2016).

عصاره و روغن حاصل از گیاه مولداوی به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی استفاده می‌شود. برگ‌های گیاه مولداوی حاوی پلی‌فنول‌های مختلف، به ویژه اسیدهای هیدروکسی سینیامیک و فلاونوئیدها، لوتئولین و گلیکوزیدهای آن‌ها شامل کوئرستین، دیوسمتین، کامپرول، آکاسیتین، آگاستاکیوزید و سالویژنین است. *Dracocephalum moldavica L* یک داروی سنتی محبوب است که در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد که دارای طیف گسترده‌ای از اثرات دارویی است. این گیاه یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین گیاهان دارویی و معطره بومی کشور به شمار می‌آید که سر شاخه‌های گل‌دار گیاه در طب سنتی و نوین کاربردهای دارویی متعدد گزارش شده است. هم‌چنین در

درب شیشه‌ها باز و درون آن گذاشته شد تا تغلیظ و ته نشست پیدا کند (Mehsa, et al., 2020).

تهیه، تکثیر و فریز سلول‌های رده J774

سلول‌های (Murine macrophage cell line) J774 با کد C483 ثبت شده در ایران از بانک سلولی خریداری شد. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی (GIBCO- America) 10% FBS کشت داده شدند. جهت تکثیر، سلول‌ها را در انکوباتور سلولی قرار داده دادیم تا به تعداد مناسب سلول‌ها تکثیر پیدا کنند. تعویض محیط سلول‌ها هر سه روز یکبار انجام گرفت. برای انجام کشت سلولی، سلول‌ها در ظرف بزرگتر ریخته شدند، به منظور تکثیر سلولی ابتدا محیط قبلی سلول‌ها کاملاً تخلیه شد. سلول‌ها با یک میلی‌لیتر بافر PBS 1X شستشو داده شدند تا کل سرم موجود تخلیه شود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول-Trypsin (Sigma-German) EDTA (تریپسین ۰/۲۵ درصد و یک میلی‌مولار EDTA) در هر ول ریخته شد و به مدت ۳ الی ۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها از کف ظرف جدا شوند. سپس کل محلول تریپسین حاوی سلول‌های جدا شده به فالکون ۱۵ میلی‌لیتر منتقل شد و با اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی 10% FBS تریپسین آن مهار و به مدت ۵ دقیقه در RPMI ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ در یک میلی‌لیتر محیط کشت سوسپانسیس گردید و سوسپانسیس سلولی در فلاسک T₇₅ کشت داده شد (Murray, 1981).

جهت تهیه ذخیره سلولی از سلول‌های J774، سلول‌ها از کف ظرف جدا شد و بعد از انجام سانتریفیوژ، رسوب سلولی بدست آمده از یک فلاسک در ۱ میلی‌لیتر محیط فریز حاوی 90% و 10% DMSO (CATNO:BP231-100) سوسپانسیس شد. پس از توزیع در کرایوبیال‌های مخصوص فریز

(Aslanipour, et al., 2017). این گیاه از گونه‌های بومی ایران می‌باشد اما تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است. با توجه به گزارش‌ها و شواهد موجود از تاثیر گیاه مذکور بر برخی عفونت‌های میکروبی و تک‌یاخته‌ای و داشتن خاصیت ضدقارچی، در این مطالعه اثر ضدلیشمانیایی عصاره گیاه *Dracocephalum moldavica L.* پروماستیگوت لیشمانیا مازور با اندازه‌گیری به روش رنگ سنجی (MTT) مورد ارزیابی قرار گرفته است (Aslanipour, et al., 2017).

مواد و روش کار

تهیه و آماده‌سازی گیاه

گیاه بادرشبی از گونه‌های بومی ایران می‌باشد اما تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است و از ارومیه خریداری شده است. در این مطالعه اندام هوایی گیاه از هر بار یوم گیاهی آن منطقه و در شرایط بدور از نور خورشید جداسازی و به آزمایشگاه مرجع منتقل گردید. برای جلوگیری از تماس مداوم جریان هوا و عوامل طبیعی، آسیاب کردن نمونه‌ها بلافاصله کمی قبل از عصاره‌گیری انجام شد. گیاه مورد مطالعه پس از جمع‌آوری توسط متخصص گیاه شناسایی شده و یک نمونه از گیاه در پژوهشکده گیاهان دارویی ثبت و نگهداری می‌شود. غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها و ترکیبات مؤثره برای تهیه غلظت‌های مختلف از اسانس و عصاره‌ها غلظت‌های مختلف تهیه می‌شود.

تهیه‌ی عصاره و فراکسیون‌های مختلف گیاه

برای عصاره‌گیری، پودر گیاه تهیه شده در ۸ ظرف به یک میزان ریخته و به‌طور کامل فشرده شد. در هر ظرف حدود ۴۰۰ لیتر حلال ریخته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آن قرار داده شد تا تغلیظ انجام گردد. ظرف‌ها پس از ۴۸ ساعت خارج، صاف و به مدت ۲۴ ساعت

را جدا کرده به طوری که جدار فلاسک شفاف گردیده که حاکی از کنده شدن ماکروفاژها می باشد (Ilaghi, et al., 2021).

کمی محیط کامل داخل فلاسک ریخته و شستشو داده شد تا تمام ماکروفاژهای کنده شده داخل مایع قرار گیرند، سپس محلول داخل فلاسک به لوله فالکون منتقل گردید و با ۱۱۰۰-۴۵۰۰ دور در هر دقیقه (RPM) به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته و لوله به آرامی تکان داده شد تا سلول‌ها از ته لوله کنده شوند. حجم لوله با محیط کامل به ۱ سی سی رسید و خوب مخلوط گردید و به شمارش ماکروفاژها پرداخته شد. به منظور تعیین اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌ها سلول‌های J_{774} (5×10^6) در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (1, 10, 100, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$) در پلیت‌های کشت میکرولیتری ۹۶ چاهک کشت شد (Junsi, 2017 and Garcia, et al., 2017). در ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بقای سلولی با استفاده از روش رنگ‌سنجی متیل تیازول تترازولیوم (MTT) اندازه‌گیری شد. نسبت جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با نمونه PBS و آمفوتریسین B با غلظت ($\mu\text{g/ml}$) به عنوان شاهد مورد ارزیابی گردید. این نتایج به عنوان میانگین درصد کاهش ماکروفاژها در مقایسه با نمونه‌های شاهد تیمار نشده $100 \times$ نشان داده شد. در نهایت، غلظت ایجاد کننده سمیت سلولی $\mu\text{g/ml}$ (CC_{50}) ۵۰٪ تعیین شد (Junsi, et al., 2017).

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر روی پروماستیگوت‌ها (IC_{50})

اثرات افزایش غلظت عصاره‌ها (۱ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بر فاز ثابت پروماستیگوت‌های *لیشمانیا مائور* (2.5×10^6 انگل در واحد میلی‌لیتر) ۲۵۰ هزار به ازای ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ۹۶ خانه به مدت ۴۸ ساعت در

به تانک ازت مایع منتقل گردید (Geroldinger, et al., 2019).

تهیه و تکثیر انگل لیشمانیا مائور

سویه استاندارد *لیشمانیا اصلی* ایران (MHOM/IR/75/ER) از آزمایشگاه انگل شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سپس انگل‌ها به لوله‌های حاوی محیط (Novy-MacNeal-NNN (HIMEDIA) (Nicolle، هندوستان) دوفازی منتقل و به مدت پنج روز انکوبه شد و پس از تهیه لام و مشاهده پروماستیگوت متحرک، اطمینان از رسیدن انگل به فاز لگاریتمی رشد، برای تکثیر بیشتر در محیط کشت RPMI₁₆₄₀ پاساژ داده شد. فرم‌های پروماستیگوت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نسبت تجمعی پروماستیگوت‌ها هر ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. تعداد پروماستیگوت‌ها در ۱۰ میکرولیتر با استفاده از لام هموسایتمتر شمارش شد. برای سنجش سمیت عصاره بر روی پروماستیگوت با لام نئوبار و شمارش پروماستیگوت‌ها جمعیت سلولی ارزیابی شد (Rasti, et al., 2016).

بررسی اثر سمیت عصاره بر سلول ماکروفاژ (CC_{50}) سلول‌های ماکروفاژ (Dulbeco's Modified Eagle's Medium) DMEM محیط کشت را در محتوی ۱۰-۱۵٪ بافر فسفات‌سالین و ۱-۵٪ پنی‌سیلین استرپتومایسین در فلاسک‌های ۵۰ سی سی ریخته و در انکوباتور ۳۷ درجه که همراه با ۵٪ دی‌اکسیدکربن است، قرار داده شد. هر روز یا یک روز در میان محیط کشت رویی را با محیط کشت جدید عوض کرده و بعد از چند روز سطحی که همیشه بر روی صفحه انکوباتور قرار دارد، مملو از ماکروفاژهای چسبیده به سطح خواهد بود. وقتی تمام سطح فلاسک از ماکروفاژهای چسبیده انباشته شد، در زیر هود با تیغه اسکرچر و یا نوک سمپلر ماکروفاژهایی که به جدار داخلی فلاسک چسبیده‌اند

شمارش سلول ماکروفاژ، پروماستیگوت و آماستیگوت

تقسیم در تست MTT

پس از کشت سلول‌ها و بررسی با میکروسکوپ Invert بعد از رسیدن به رشد کافی و تلاقی ۸۰٪ برای سلول ماکروفاژ، ابتدا کف فلاسک با PBS استریل شستشو داده شد و با پیپتینگ ماکروفاژها از کف فلاسک جدا شد. پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه مایع رویی دور ریخته شد. در مرحله بعد با اضافه کردن محیط تازه در حضور تریپان بلو با استفاده از لام نتوبار ضمن بررسی زنده بودن ماکروفاژها، شمارش آن‌ها با لام نتوبار انجام شد (Ilaghi, et al., 2021 and Mendonça, et al., 2018). بدین ترتیب که به میزان یک دهم حجم، تریپان بلو (۰/۴ درصد) به سوسپانسیون ماکروفاژ اضافه شد و با لام نتوبار در زیر میکروسکوپ با عدسی شیئی ۱۰ بررسی ماکروفاژهای زنده و شمارش نیز انجام شد. تریپان بلو به عنوان یک رنگ حیاتی به داخل سلول‌های مرده نفوذ کرد در نتیجه سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده به صورت بیرنگ دیده شدند. برای شمارش پروماستیگوت نیز ۱۰ میکرولیتر از انگل در زیر لام نتوبار شمارش شد. در هر سه سری سلول ماکروفاژ، ماکروفاژ حاوی آماستیگوت و پروماستیگوت شمارش به صورت زیر انجام شد. شمارش در ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای لام در زیر میکروسکوپ Invert انجام شد. در نهایت عدد حاصله در عکس ضریب رقت (۱۰) و حجم (۱۰^۴) ضرب شد تا تعداد سلول در هر میلی‌لیتر بدست آمد (Bezerra, et al., 2020).

روش سنجش DPPH

از محلول DPPH ۱۰۰۰ میکرولیتر با ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (pH = 7.4) در یک لوله آزمایش اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نمونه آزمایشی اضافه شد و به سرعت مخلوط گردید. محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر

دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. حساسیت با استفاده از روش رنگ سنجی MTT در ۲۴ و ۴۸ ساعت تعیین شد و غلظت عصاره که منجر به مهار ۵۰ درصدی رشد پروماستیگوت‌ها ($\mu\text{g/ml}$) تخمین زده شد (Ilaghi, et al., 2021 and Dutta, et al., 2005).

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر روی ماکروفاژهای آلوده توسط لیشمانیا مازور (EC₅₀)

برای آلودگی ماکروفاژها توسط انگل، یک پلیت ۹۶ چاهکی در ۵٪ CO₂ به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا به ماکروفاژها اجازه چسبندگی داده شود. پروماستیگوت‌های لیشمانیا مازور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در RPMI₁₆₄₀ با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (pH 7.4) کشت داده شد. پس از رسیدن به فاز رشد ثابت، از آن‌ها برای آلوده کردن ماکروفاژهای J₇₇₄ استفاده شد (Najm, et al., 2021). به هر اسلاید محفظه و ۹۶ چاهک با نسبت انگل به سلول میزبان ۱:۱۰ انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. بلافاصله پس از آن، پروماستیگوت‌های آزاد با سه بار شستشو با استفاده از محیط بدون سرم RPMI₁₆₄₀ حذف شدند. در نهایت، ماکروفاژهای آلوده با افزایش غلظت عصاره‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵٪ CO₂ تیمار شدند. چاهک‌های حاوی محیط کشت و انگل بدون دارو به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. در نهایت، تست رنگ سنجی MTT زنده بودن سلول را اندازه‌گیری کرد (Alves, et al., 2017). داده‌ها به عنوان درصد سلول‌های مرده در کشت‌های تیمار شده با عصاره‌ها، آمفوتریسین B و مقایسه با ماکروفاژهای تیمار نشده نشان داده شد. علاوه بر آمار توصیفی از آزمون‌های ANOVA، توکی، کروسکال والیس و کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Prism مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پروماستیگوت‌ها را طی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت مهار می‌کند (IC₅₀)، محاسبه می‌گردد.

همچنین اثر حفاظتی عصاره بادرشبی بر تکثیر ماکروفاژها در ۸ حلال مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج CC₅₀ در طی ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصل از آن در جدول ۱ ارائه شده است. همان طور که مشخص است نتایج در ۴۸ ساعت کاهش یافته است. برای مشاهده تغییرات مورفولوژیک سلول‌های تیمار شده یا تیمار نشده با IC₅₀ عصاره بادرشبی، ابتدا پروماستیگوت‌ها در دور پایین ۵۰۰ و برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شوند و سپس ماده رویی دور ریخته شد و باقی‌مانده آن در محلول PBS به صورت سوسپانسیون در آمده و سپس سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و در بزرگنمایی ۱۰۰× و در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات مؤثره بر سلول‌های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت *لیشمانیا مائور* طی ۲۴ و ۴۸ ساعت در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. همچنین نتایج حاصل از بررسی مقایسه‌ای تعداد پروماستیگوت/آماستیگوت به تنهایی و در مجاورت با رده سلولی J774 ماکروفاژ در حضور عصاره/فراکسیون‌های مختلف گیاه در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان آماستیگوت در همه فراکسیون‌های گیاهی طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌طور قابل توجهی کاهش داشته است ($P < 0.0001$). درصد حرکت پروماستیگوت بعد از درمان با آمفوتریسین B در جدول ۳ نشان داده شده است.

ثابت شد. محلول مخلوط با ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول و ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl (pH = 7.4) به عنوان بلانک استفاده شد (Sifaoui, et al., 2014).

نتایج

اثر ضدلیشمانیایی عصاره گیاه بادرشبی بر پروماستیگوت خارج سلولی *لیشمانیا مائور*

از سوسپانسیون‌های انگل *لیشمانیا مائور* که حاوی 1×10^6 سلول انگلی در هر میلی لیتر که در فاز لگاریتمی رشد هستند را به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل به صورت سه بار تکرار اضافه گردید و به مدت ۶ ساعت انکوبه شد. رقت‌های مختلف از عصاره و داروی کنترل را تهیه و به میزان ۱۰ μ l از آن را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به صورت تریپلیکیت اضافه شد. علاوه بر این از شاهد (بلانک) که حاوی فقط ۱۰۰ μ l محیط کشت فاقد پروماستیگوت یا دارو است، استفاده می‌شود. همچنین به دو چاهک دیگر فقط پروماستیگوت‌های انگل *لیشمانیا مائور* به عنوان کنترل اضافه می‌شود و میکروپلیت‌ها را در زمان‌های مختلف در شرایط انکوباسیون قرار می‌گیرند. بعد اتمام زمان انکوباسیون، میکروپلیت‌ها را به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ RPM سانتریفوژ و محلول رویی را جدا و به باقی‌مانده ۲۰ μ l از محلول MTS کار به هر چاهک اضافه نمودیم. متعاقباً بعد از انکوباسیون و سانتریفوژ کردن آن محلول رویی را جدا و بعد از ۱۵ دقیقه جذب نوری را با دستگاه الیزا ریدر مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میزان غلظتی که ۵۰ درصد از

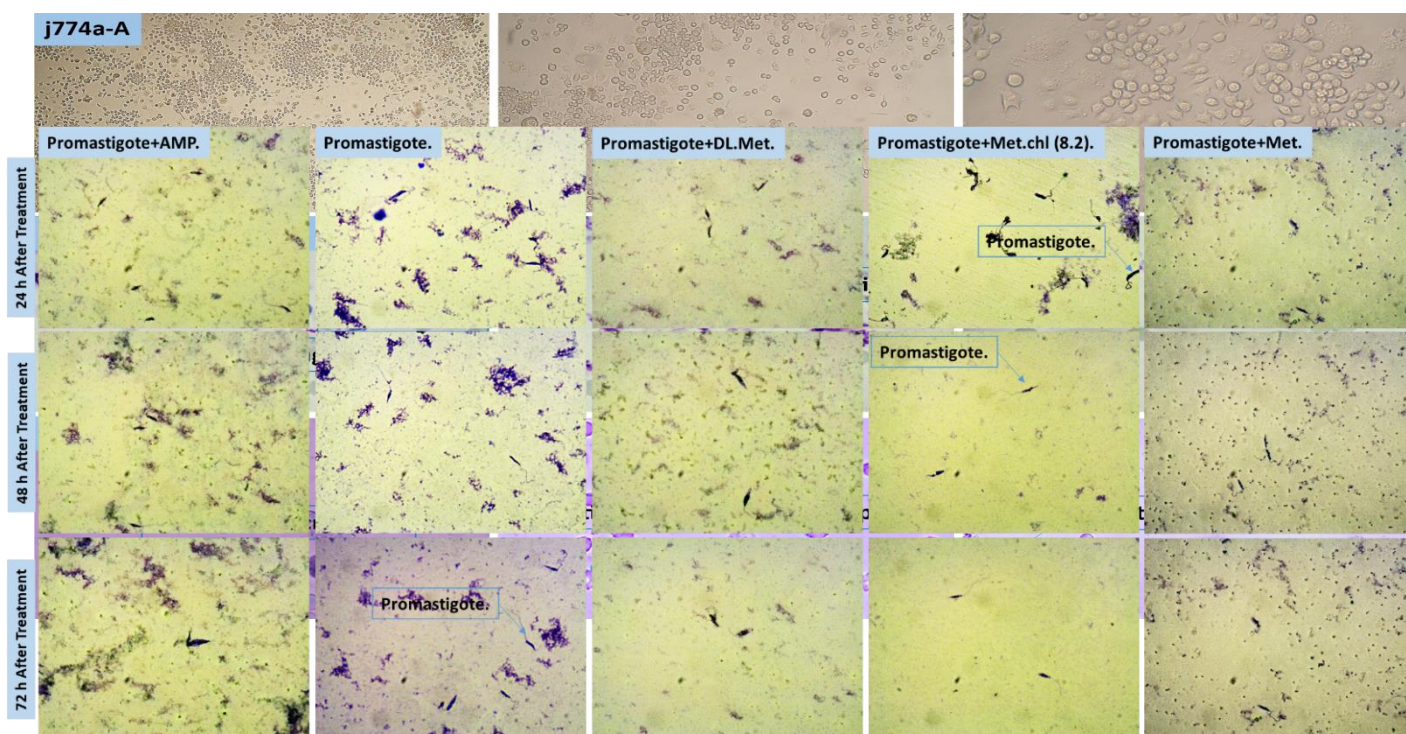
جدول ۱: بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات موثره بر سلول‌های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

عصاره/فراکسیون گیاه	آماستیگوت (۲۴ ساعت)		پروماستیگوت (۲۴ ساعت)		ماکروفاژ (۲۴ ساعت)	شاخص
	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	P-value	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	P-value	CC ₅₀ (µg/mL)	(Selectivity Index)
کلروفورم	42.44±0.65	< 0.0001	160.57± 27.98	0.0201	501.03±207.77	3.1
کلروفورم-هگزان (۱:۱)	39.06±0.06	< 0.0001	298.37±163.80	0.1040	655.43±206.66	2.2
دی کلرو متان	48.83±1.74	< 0.0001	131.77±11.77	0.0099	946.40±172.19	7.2
متانول ۸۰ درصد	39.92±4.44	< 0.0001	220.18±148.34	0.2332	505.97±167.28	2.3
متانول-کلروفورم (۸:۲)	28.85 ±0.41	< 0.0001	215.93±25.47	0.0014	329.00±138.11	1.5
هگزان	45.13±1.18	< 0.0001	186.67±37.78	0.0166	270.20±65.36	1.4
متانول-کلروفورم (۱:۱)	38.07±0.98	< 0.0001	229.9±175.9	0.2699	447.33±37.05	1.9
متانول	26.07±0.55	< 0.0001	179.6±39.6	0.0254	442.77±200.23	2.5

جدول ۲: بررسی اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات موثره بر سلول‌های شبه ماکروفاژ و پروماستیگوت لیشمانیا ماژور

عصاره/فراکسیون گیاه	آماستیگوت (۴۸ ساعت)		پروماستیگوت (۴۸ ساعت)		ماکروفاژ (۴۸ ساعت)	شاخص
	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	P-value	IC ₅₀ ± SD (µg/mL)	P-value	CC ₅₀ (µg/mL)	(Selectivity Index)
کلروفورم	36.83±0.54	< 0.0001	136.03±45.40	0.2415	612.27±347.51	4.5
کلروفورم-هگزان (۱:۱)	37.76±0.47	< 0.0001	106.52±56.81	0.8522 (ns)	529.53±275.07	5.0
دی کلرو متان	41.31±1.76	< 0.0001	141.99±60.93	0.2988 (ns)	548.77±430.21	3.9
متانول ۸۰ درصد	36.26±1.37	< 0.0001	57.96±29.59	0.0699 (ns)	318.20±147.69	5.5
متانول-کلروفورم (۸:۲)	28.14±0.62	< 0.0001	64.09±30.99	0.1157 (ns)	178.79±102.07	2.8
هگزان	43.38±1.51	< 0.0001	86.20±66.28	0.7368 (ns)	140.96±74.20	1.6
متانول-کلروفورم (۱:۱)	37.45±0.57	< 0.0001	91.0±65.6	0.8241 (ns)	506.87±334.56	5.6
متانول	24.58±1.01	< 0.0001	67.41±44.51	0.2737	184.34±137.17	2.7

شکل ۱: بررسی مقایسه ای رده سلولی J774 ماکروفاژ، به تنهایی و در حضور پروماستیگوت و آماستیگوت



شکل ۲: بررسی مقایسه ای تعداد پروماستیگوت / آماستیگوت به تنهایی و در حضور عصاره/فراکسیون های مختلف گیاه

جدول ۳: بررسی درصد حرکت پروماستیگوت بعد از درمان لیشمانیا ماژور با آمفوتریسین B

حرکت /عصاره		۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت
دی کلرو متان	Live-Medium motility	63±1 <0.0001	Low mobility	47±2 < 0.0001	Live & low mobility	23±3 < 0.0001
متانول-کلروفرم (۸:۲)	Live	84±2 0.034	Low mobility	72±2 0.0024	Dead	42±6 0.0009
متانول ۸۰ درصد	Live-Medium motility	69±5 0.0033	Low mobility	49±1 < 0.0001	Dead	1±1 < 0.0001
B آمفوتریسین	Low mobility	43±3 < 0.0001	Dead	10±2 < 0.0001	Dead	1±1 < 0.0001

اثر سمیت عصاره و ترکیبات مؤثره بر سلول های شبه ماکروفاژ رده سلولی J774 (CC₅₀)

می‌شوند و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند و سپس در حضور غلظت‌های مختلف اسانس برای ۲۴ ساعت قرار می‌گیرند. از ماکروفاژ و RPMI به عنوان کنترل استفاده می‌شود. مجموعه تست و کنترل به صورت سه بار تکرار انجام می‌شود. در روش MTT میزان رنگ تولید شده در چاهک‌ها با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر، جذب نوری قرائت شده و با سلول‌های کنترل زنده مقایسه می‌شوند. در جدول ۴ غلظت ایجادکننده سمیت سلولی ($\mu\text{g/ml}$) CC_{50} درصد (CC_{50}) تعیین و نشان داده شده است. مقادیر CC_{50} با استفاده از نرم افزار Prism 8.0 محاسبه شد.

جدول ۴: مقایسه اثر حفاظتی غلظت‌های مختلف از عصاره و ترکیبات مؤثره بر سلول‌های شبه ماکروفاژ لیشمانیا مازور

عصاره/فراکسیون گیاه	آماستیگوت (48h)	آماستیگوت (24h)
	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
کلروفرم	550.5	621.9
کلروفرم-هگزان (۱:۱)	483.2	641.2
دی کلرو متان	156.2	311.6
متانول ۸۰ درصد	440.5	435.2
متانول-کلروفرم (۸:۲)	293.9	492.8
هگزان	153.1	410.5
متانول-کلروفرم (۱:۱)	124.7	266.5
متانول	418.5	918.3
B آمفوتریسین	10	10

، قادر به مهار قابل توجهی از تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده در مقایسه با شاهد درمان آمفوتریسین B بودند ($P < 0.0001$). ارزیابی نتایج حاضر نشان دهنده کاهش چشم‌گیر تعداد آماستیگوت داخل سلولی به ویژه در حضور حلال متانولی ($P < 0.0001$)، نسبت به سایر حلال‌های فراکسیون گیاه است.

به منظور تعیین اثرات سیتوتوکسیک عصاره/فراکسیون‌های گیاه، سلول‌های J774 5×10^4 در حضور غلظت‌های مختلف عصاره، در پلیت‌های کشت ۹۶ چاهکی کشت شدند. در ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بقای سلولی با استفاده از روش رنگ سنجی متیل تiazول تترازولیوم (MTT) اندازه‌گیری شد. این نتایج به عنوان میانگین درصد کاهش ماکروفاژها در مقایسه با نمونه‌های شاهد تیمار نشده را نشان خواهد داد. از آزمون MTT طبق پروتکل مربوطه استفاده می‌شود. سلول‌های لاین J774 در پلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول اضافه

اثر سمیت عصاره و ترکیبات مؤثره بر روی آماستیگوت داخل سلولی لیشمانیا مازور

اثر عصاره گیاه بر تعداد آماستیگوت‌ها در ماکروفاژهای آلوده ارزیابی شد. غلظت‌های مختلف عصاره و فراکسیون‌های گیاه

جدول ۵: مقایسه اثر سمیت عصاره و ترکیبات موثره بر روی آماستیگوت داخل سلولی لیشمانیا ماژور

غلظت‌ها ($\mu\text{g/mL}$)	کلروفرم		کلروفرم-هگزان (۱:۱)		دی کلرو متان		متانول		متانول-کلروفرم (۸:۲)	
	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	P value	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	P value	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	P value	Mean \pm SD ($\mu\text{g/mL}$)	P value	Mean \pm S D ($\mu\text{g/mL}$)	P value
150	996 \pm 5	0.1018	985 \pm 15	0.1309	972 \pm 24	0.1005	607 \pm 17	< 0.0001	948 \pm 64	0.2247
200	870 \pm 15	0.0001	855 \pm 49	0.0069	640 \pm 106	0.0041	567 \pm 24	< 0.0001	840 \pm 79	0.024
300	787 \pm 19	< 0.0001	642 \pm 39	< 0.0001	604 \pm 15	< 0.0001	516 \pm 23	< 0.0001	261 \pm 41	< 0.0001
400	453 \pm 82	0.0003	431 \pm 11	< 0.0001	578 \pm 65	0.0004	399 \pm 20	< 0.0001	265 \pm 15	< 0.0001
500	330 \pm 45	< 0.0001	305 \pm 16	< 0.0001	549 \pm 32	< 0.0001	342 \pm 65	< 0.0001	163 \pm 14	< 0.0001

بحث

گیاهی هستند که یا مستقیماً از گیاهان عصاره‌گیری شده‌اند و یا بر اساس ترکیب گیاهی سنتز شده‌اند.

گیاهان به طور واضح به عنوان منبع بالقوه ضد تک‌یاخته‌ای هستند. فعالیت بیولوژیک عصاره گیاهان، به ترکیبات متعلق به چند گروه شیمیایی متعدد شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، استروئیدها و ... می‌باشد، که به گیاه خواص ضد باکتریایی، ضد انگلی و آنتی‌اکسیدانی می‌دهد. از جمله این گیاهان دارویی *Dracocephalum moldavica L* (گیاه بادرشبی) است که با وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در عصاره گیاه جای تحقیق و مطالعه بیشتر بر روی گیاه را باز می‌کند زیرا که ترکیبات فلاونوئیدی دارای ویژگی‌های بسیاری هستند. تاکنون مطالعه‌ای دقیق، جهت تأیید اثر ضد لیشمانیایی گیاه بادرشبی انجام نشده است. در ایران مطالعات متعددی از این روش رنگ سنجی جهت بررسی اثر ضد لیشمانیایی عصاره‌های گیاهی، به دلیل فوایدی از جمله سادگی، سهولت، تکرار پذیری، ارزانی، ایمن و قابل اطمینان بودن، مورد استفاده قرار گرفته است با توجه به گزارش‌ها و شواهد موجود از تأثیر گیاه بادرشبی بر برخی عفونت‌های

لیشمانیوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های تک‌یاخته‌ای است که توسط گونه‌های انگل لیشمانیا و گزش پشه خاکی ماده ایجاد می‌گردد. این انگل داخل سلولی اجباری دارای چرخه زندگی پیچیده‌ای از نظر ژنتیکی است که نیاز به یک میزبان مهره‌دار و هم‌چنین یک حشره دارد تا به ترتیب به فرم‌های آماستیگوت یا پروماستیگوت وجود داشته باشند. انگل لیشمانیا در خون و بافت زندگی می‌کند، در بدن مهره‌داران درون سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای به شکل آماستیگوت و در بدن پشه خاکی و محیط کشت به صورت خارج سلولی و به شکل پروماستیگوت دیده می‌شود. داروهای مختلفی برای درمان لیشمانیوز وجود دارد، اما سمیت و عوارض جانبی آن‌ها و ایجاد مقاومت دارویی از مهم‌ترین مشکلات استفاده از این داروهاست. طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی، امروزه بیش از ۸۰٪ مردم جهان (نزدیک به ۵ میلیارد نفر) برای درمان بیماری‌ها هنوز از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. تقریباً ۴۳٪ داروهای تهیه شده در دنیا داروهایی با منشاء

باقریان و همکاران (۱۳۹۳) در مطالعه تاثیر عصاره سیر بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* مطالعه درون تنی و برون تنی نشان دادند که عصاره سیر بر روی آماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* اثرات ضد لیشمانیایی مطلوبی دارد، آزمایش‌های بیشتری جهت ارزیابی این عصاره بر روی انگل *لیشمانیا* در مدل حیوانی و انسان‌های داوطلب را توصیه می‌نماید (Bagherian, et al., 2015).

ساداتی و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه‌ای تاثیر عصاره گیاه اکیناسه آ پورپورا بر لیشمانیوز جلدی در موش‌های آلوده به *لیشمانیا ماژور* را بررسی نمودند. در این مطالعه تجربی تعداد ۱۸ سر موش کوچک آزمایشگاهی به صورت تصادفی به سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول به مدت ۲ هفته عصاره هیدروالکلی گیاه اکیناسه آ پورپورا (۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) دریافت نموده سپس به انگل *لیشمانیا ماژور* آلوده شدند. گروه دوم ابتدا با انگل آلوده شده و پس از ایجاد زخم، به مدت ۲ هفته عصاره گیاه را دریافت نمودند. گروه سوم به عنوان گروه کنترل بدون دریافت عصاره به انگل *لیشمانیا* آلوده شدند. زخم‌های ایجاد شده ناشی از انگل لیشمانیا در سه ناحیه قاعده دم، پای راست و پای چپ هر موش در فواصل زمانی منظم اندازه‌گیری و ثبت شد و بر اساس این اندازه‌ها مساحت زخم‌های نواحی ذکر شده محاسبه گردید. داده‌های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری کروسکال-والیس تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین میانگین اندازه زخم‌ها در گروه‌های اول و دوم با گروه کنترل وجود ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که عصاره الکی گیاه اکیناسه آ پورپورا در غلظت ذکر شده قادر به کنترل رشد انگل *لیشمانیا ماژور* نمی‌باشد، هم چنین مصرف عصاره، قبل از تزریق انگل نیز مانع رشد انگل و ایجاد زخم نمی‌شود (Sadati, et al., 2011).

تامارگو و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ارزیابی *In vitro* و *In Vivo* روغن به دست آمده از *Artemisia*

میکروبی و تک‌یاخته‌ای، در این مطالعه سعی شد اثر ضد انگلی عصاره و فراکسیون‌های گیاه بادرشبی بر انگل *لیشمانیا ماژور* مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه تاثیرات عصاره تام و فراکسیون‌های مختلف زرین گیاه خراسانی گیاه به عنوان ترکیبات ضد لیشمانیایی در شرایط برون تنی ارزیابی شد. به دلیل اینکه بادرشبی جهت درمان بیماری‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است و دارای ترکیبات فعال موثر شناخته شده است و هم‌چنین تاکنون در ایران و سایر کشورها مطالعه-ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است، این گیاه انتخاب شد تا در صورت داشتن خاصیت ضد لیشمانیایی، علاوه بر فعالیت ضدانگلی علیه *لیشمانیا ماژور* برای ترمیم ضایعه سالک نیز مورد استفاده قرار بگیرد. در زمینه استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری لیشمانیوز، تحقیقات زیادی در کشور ما و در نقاط مختلف دنیا انجام شده است (Sacks, et al., 2002). تاکنون در ایران مطالعه‌ای در رابطه با این گیاه و فعالیت ضد لیشمانیایی آن انجام نشده است. در ارتباط با سایر گیاهان و اثر عصاره آن‌ها روی انگل *لیشمانیا ماژور* مطالعات متعددی صورت گرفته است برای مثال :

احمد و همکاران تاثیر عصاره ۱۰ گیاه را روی شکل پروماستیگوت انگل مورد بررسی قرار داده و بیشترین تاثیر را مربوط به عصاره گیاه آویشن بیان نموده است (Ahmed, et al., 2011).

قادری و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای اثر ضد لیشمانیایی عصاره گیاهی آلفاپاین را در شرایط آزمایشگاهی و موش حساس آزمایشگاهی *Balb/c* بررسی نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره آلفاپاین در شرایط برون تنی اثر ضد لیشمانیایی مناسبی بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا ماژور* نشان داد و در شرایط درون تنی نیز بر روی موش حساس آزمایشگاهی باعث محدود شدن زخم گردید (Ghaderi, et al., 2018).

زخم نیز تأثیر داشته است. این بررسی نشان داد که زین گیاه یک گیاه دارویی مهم با تعداد زیادی ترکیبات فعال و پتانسیل بالا برای حفظ سلامت انسان و دام در ایران است. با این وجود تاکنون مطالعه‌ای درباره‌ی اثرات ضد لیشمانیایی آن در ایران انجام نشده است (Heydari, et al., 2019).

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که اثربخشی عصاره گیاه بر روی سوبه استاندارد انگل *لیشمانیا ماژور* به روش رنگ سنجی MTT بررسی شد که نتایج نشان داد، عصاره/فراکسیون‌های گیاه *Dracocephalum moldavica L* با خواص ضد باکتریایی، ضد انگلی و آنتی اکسیدانی که به همراه دارد از بین آن‌ها اثربخشی غلظت عصاره متانولی گیاه موجب افزایش مهار رشد *لیشمانیا ماژور* در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد و برای ترمیم زخم سالک با سمیت و عوارض کمتر می‌تواند مؤثر واقع شود. در این مطالعه درصد انگل‌های زنده در حضور غلظت‌های مختلف عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشی پس از گذشت زمان‌های مختلف از کشت انگل کاهش چشمگیری داشتند. میزان IC₅₀ عصاره و ترکیبات مؤثره بادرشی در زمان‌های مختلف در مهار *لیشمانیا ماژور* اثر چشمگیری نشان داد. امید است در کشورمان با تحقیقات بیشتر بر روی این گیاه مؤثر با داشتن خواص ضد لیشمانیایی کار شود تا بتوان بیماران مبتلا به سالک را با هزینه و درد کمتر و بهبودی بیشتر جای زخم‌ها درمان کرد.

absinthium L فرموله شده در نانو کوکلتات‌ها را بر لیشمانیوز جلدی بررسی نمودند. نتایج نشان داد که انکوکلثاسیون EO-Aa منجر به ایجاد یک فرمول ضد لیشمانیایی پایدار و کارآمد بوده و با هدف یک استراتژی درمانی جدید برای درمان سالک می‌باشد (Tamargo, et al., 2017).

خامسی‌پور و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای فعالیت ضدلیشمانیایی زین گیاه در محیط برون‌تنی و درون‌تنی انجام شد و مشخص شد که اسانس زین گیاه نیز دارای خاصیت ضد توکسوپلاسمایی می‌باشد (Khamesipour, et al., 2020).

بصیرپور و همکارانش (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای مشخص شد اسانس زین گیاه باعث کاهش عوارض ناشی از مالاریا می‌شود و میانگین دمای بدن موش‌های آلوده که تحت درمان زین گیاه قرار گرفته بودند، پس از هفت روز کاهش معناداری داشت (Basirpour, et al., 2021).

حیدری و همکاران در سال ۲۰۱۹ با بررسی مطالعات پیشین گزارش کردند که زین گیاه دارای خواص دارویی از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد سرطانی، ضد درد، ضد هایپرلیپیدمیک، ضد گرفتگی، سیتوتوکسیک و تعدیل کننده ایمنی، است. هم‌چنین گزارش شده است که این گیاه برای دردهای التهابی، سردرد، احتقان، اختلالات کبدی، زخم، تب، درد کلیه، سوء هاضمه، درد معده، درد شکم، درد مفاصل، اسپاسم عضلانی و نفخ دارای اثرات درمانی بوده و در بهبود

1. Mougneau, E., F. Bihl, and N. Glaichenhaus, *Cell biology and immunology of Leishmania*. Immunological reviews, 2011. 240(1): p. 286-296.
2. Adler, S., *Leishmania*. Advances in parasitology, 1964. 2: p. 35-96.
3. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2004. 27(5): p. 305-318.
4. Ivens, A.C., et al., *The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major*. Science, 2005. 309(5733): p. 436-442.
5. Alrajhi, A.A., et al., *Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major*. New England Journal of Medicine, 2002. 346(12): p. 891-895.
6. Singh, N., et al., *Natural product based leads to fight against leishmaniasis*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2014. 22(1): p. 18-45.
7. Kobets, T., I. Grekov, and M. Lipoldova, *Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment*. Current Medicinal Chemistry, 2012. 19(10): p. 1443-1474.
8. Tajbakhsh, E., et al., *The effects of medicinal herbs and marine natural products on wound healing of cutaneous leishmaniasis: A systematic review*. Microbial Pathogenesis, 2021. 161: p. 105235.
9. Minodier, P. and P. Parola, *Cutaneous leishmaniasis treatment*. Travel medicine and infectious disease, 2007. 5(3): p. 150-158.
10. Zhan, M., et al., *Dracocephalum moldavica L.: An updated comprehensive review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and application aspects*. Fitoterapia, 2023: p. 105732.
11. Dastmalchi, K., et al., *Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (Dracocephalum moldavica L.) extracts*. LWT-Food Science and Technology, 2007. 40(9): p. 1655-1663.
12. GOLPARVAR, A.R., et al., *Chemical constituents of essential oil of Dracocephalum moldavica L. and Dracocephalum kotschy Boiss. from Iran*. Acta Agriculturae Slovenica, 2016. 107(1): p. 25-31.
13. Acimovic, M., et al., *Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity of Dracocephalum moldavica L. Essential oil and hydrolate*. Plants, 2022.1: Pp. 941.
14. Aslanipour, B., R. Heidari, and N. Farnad, *Phenolic Combination and Comparison of Antioxidant Activity in Three Different Alcoholic Extracts of Dracocephalum moldavica L.* Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 2017. 5(3): Pp. 199-206.
15. Mehssa, K.F., et al., *Investigating the effect of cytotoxicity of the treated leaves extract of Badrashbi (Dracocephalum moldavica L.) using different inducers on four cancer cell lines*. 2020.
16. Murray, H., *Interaction of Leishmania with a macrophage cell line. Correlation between*

- intracellular killing and the generation of oxygen intermediates.* The Journal of experimental medicine, 1981. 153(6): p. 1690-1695.
17. Geroldinger, G., et al., *Techniques to study phagocytosis and uptake of Leishmania tarentolae by J774 macrophages.* Experimental parasitology, 2019. 197: p. 57-64.
 18. Rasti, S., et al., *Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.* Journal of clinical laboratory analysis, 2016. 30(5): p. 610-615.
 19. Ilaghi, M., et al., *The potential role and apoptotic profile of three medicinal plant extracts on Leishmania tropica by MTT assay, macrophage model and flow cytometry analysis.* Parasite Epidemiology and Control, 2021. 12: p. e00201.
 20. Junsi, M., et al., *Efficacy of Thunbergia laurifolia (Rang Jued) aqueous leaf extract for specific biological activities using RAW 264.7 macrophage cells as test model.* International Food Research Journal, 2017. 24(6): p. 2317-2329.
 21. Garcia, A.R., et al., *Cytotoxicity and anti-Leishmania amazonensis activity of Citrus sinensis leaf extracts.* Pharmaceutical biology, 2017. 55(1): p. 1780-1786.
 22. Dutta, A., et al., *Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis.* Parasitology international, 2005. 54(2): p. 119-122.
 23. Najm, M., et al., *Anti-Leishmanial Activity of Artemisia persica, A. spicigera, and A. fragrance against Leishmania major.* Iranian journal of parasitology, 2021. 16(3): p. 464.
 24. Alves, M.M.d.M., et al., *Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by Leishmania major.* Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2017. 390: p. 893-903.
 25. Mendonça, D.V.C., et al., *Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and its mechanism of action against L. amazonensis species.* Parasitology research, 2018. 117: p. 391-403.
 26. Bezerra, E.A., et al., *Garcinielliptone FC: Selective anti-amastigote and immunomodulatory effects on macrophages infected by Leishmania amazonensis.* Toxicology in vitro, 2020. 63: p. 104750.
 27. Sifaoui, I., et al., *Activity of olive leaf extracts against the promastigote stage of Leishmania species and their correlation with the antioxidant activity.* Experimental parasitology, 2014. 141: p. 106-111.
 28. Sacks, D. and N. Noben-Trauth, *The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice.* Nature reviews immunology, 2002. 2(11): p. 845-858.
 29. Ahmed, S.B.H., et al., *Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia).* Natural product research, 2011. 25(12): p. 1195-1201.
 30. Ghaderi, A., et al., *Evaluation of antileishmanial effect of the plant*

- extract of alpha-pinene (Pistacia atlantica) in vitro and in vivo.* Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 2018; (5)23. p.32-44.
31. Bagherian A, Abbaspour H, Saeidisar S, Mirzaei M, Mirzaei H R, Mirzaei H. The effect of garlic extract on Leishmania major Amastigotes: in vitro and in vivo studies . Research in Medicine 2015; 38 (4) :181-186.
 32. Sadati M, Sarkari B, Asgari Q, Hatami S, Tavakl E. Effect of Echinacea purpurea on Control of Leishmania major Induced Cutaneous Leishmaniasis in Mice. *armaghanj* 2011; 16 (1) :31-40
 33. Tamargo, B., et al., *In vitro and in vivo evaluation of essential oil from Artemisia absinthium L. formulated in nanocochleates against cutaneous leishmaniasis.* Medicines, 2017. 4(2): p. 38.
 34. Khamesipour, et al., (2020) In vitro and in vivo Anti-Toxoplasma Activity of *Dracocephalum Kotschy* Essential Oil. *Food Science Nutrition Published by Wiley Periodicals LLC*, no. 9: Pp. 522-31.
 35. Basirpour, Bahare. Faham, Khamesipour. Mustafa, Ghanadian. Zahra, Ghayour, Najafabadi. Seyed Hossein, Hejazi. (2021). The Effect of *Dracocephalum Kotschy* Essential Oil on Controlling the *Malaria* Complication in Mice Model. *Journal of isfahan Medical School* 40 (679): Pp. 517-23.
 36. Heydari, P. Yavari, M. Adibi, P. Asghari, G. Ghanadian, S. M. Dida, G. O. Khamesipour, F. (2019). Medicinal properties and active constituents of *Dracocephalum kotschy* and its significance in Iran: a systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*

Investigating the protective effect of *Dracocephalum moldavica L* extract on induction of apoptosis and proliferation of *Leishmania major*

Mahnaz Karimi^{1*}, Elahe Tajbakhsh^{2*}, Hassan Momtaz²

1. PhD student of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

* Corresponding Authors:
karimimahnaz72@gmail.com
ee_tajbakhsh@yahoo.com

Abstract:

Due to the prevalence of leishmaniasis in different regions of the world and Iran and considering that pentavalent compounds of antimony have many side effects for the treatment of the disease; the use of medicinal plants has been emphasized. This research was conducted in order to determine the effect of the extract of the medicinal plant *Dracocephalum moldavica L* on *Leishmania major* Amastigote in laboratory conditions by colorimetric method. In this experimental study, *Leishmania Major* standard strain was cultured in RPMI1640 culture medium containing 10% fetal bovine serum FBS and penicillin-streptomycin antibiotics and until full growth at 37 degrees temperature and 5% CO₂ pressure in the incubator. It was kept in sterile conditions for 3-4 days. Then, in the stationary phase of growth, the effect of different concentrations of lemon balm plant extracts compared to the control drug on *Leishmania major* amastigote in laboratory conditions was investigated using the MTT colorimetric method. The percentage of live parasites in the presence of different concentrations of lemon balm extract and effective compounds decreased significantly after different times of parasite culture. The IC₅₀ value of lemon balm extract and effective compounds at different times showed a significant effect in inhibiting *Leishmania major*.

Key words: Apoptosis, *Leishmania major*, lemon balm plant, proliferation.

بررسی خصوصیات عملکردی ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما در مقایسه با

عصاره چای سبز بر زنده مانی باکتری پروبیوتیک منتخب

مژگان مقدم^۱، مهرنوش تدینی*^۱، علی فضل ارا^۲

^۱گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه اسلامی، اهواز، ایران

^۲گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

*نویسنده مسئول: m.t.tadayoni@gmail.com

چکیده

ترکیبات فنولی با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی رادیکالی می‌توانند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و حفظ سلامت انسان ایفا کنند. فنل‌ها از ترکیبات مهم هسته خرما هستند که معمولاً فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نیز نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر اثر ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما در مقایسه با عصاره چای سبز بر باکتری پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفته است. میزان فنول کل عصاره اتانولی هسته خرما با استفاده از معرف فولین - سیو کالتیو و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هسته خرما با استفاده از ترکیب DPPH در مقایسه با BHT مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی تاثیر پریبیوتیک ترکیبات فنولیک هسته خرما بر رشد و زنده مانی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم (ATCC14917)، در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد در مقایسه با عصاره چای سبز و اثر ضد میکروبی عصاره بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی در سطح ۰/۵ و ۱ درصد انجام شد. میزان ترکیبات فنولیک کل عصاره خشک اتانولی هسته خرما ۶/۶۲ میکروگرم گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. درصد مهار رادیکال آزاد ۴۸/۲۷ و IC50 برای عصاره اتانولی هسته خرما ۱۸۳/۷۳ μg/mL محاسبه گردید. با توجه به خروجی HPLC که مقادیر بالایی از Gallic acid و Catechin را به عنوان ترکیبات فنولی در عصاره هسته خرما تایید می‌کنند، می‌توان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره فنولی هسته خرما را تایید کرد. نتایج نشان داد، که ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما زنده مانی باکتری پروبیوتیک را در سطح ۰/۵ و ۱ درصد افزایش داده و تا حدودی اثر ضد میکروبی در غلظت ۰/۱ بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارد. با توجه به نتایج به دست آمده ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما قابلیت پریبیوتیکی خوبی نشان دادند. همچنین به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی مطلوب گزینه مناسبی برای استفاده تکنولوژیکی و اثرات سلامتی بخش برای تولید مواد غذایی فراسودمند باشند.

کلمات کلیدی: ترکیبات فنولیک، خاصیت آنتی اکسیدانی، عصاره هسته خرما، عصاره چای سبز، باکتری پروبیوتیک

فعال زیستی است و می‌تواند به عنوان منبع ارزان قیمت و با ارزش در تولید مواد غذایی فراسودمند و سالم با خاصیت پریبیوتیکی مورد استفاده قرار بگیرد (Thouri et al., 2019).

هسته خرما دارای رطوبتی بین ۳ الی ۱۰ درصد وزنی/وزنی، دارای ۸۳-۸۱ درصد کربوهیدرات، ۶/۳-۵ درصد پروتئین، ۱۲/۶۷-۱۰/۱۹ درصد روغن و ۱-۱/۵ درصد خاکستر است (Ghnimi et al., 2017) که به دلیل داشتن ترکیبات پلی فنلی و فیبرهای تغذیه‌ای، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته است (۵۸۰-۹۲۹ میکرومول ترولوکس در گرم (Shi et al., 2021)) و دارای توان کاهندگی و نقش چشم‌گیری در مهار رادیکال‌های آزاد دارد (Dong et al., 2021). وجود گالیک اسید، آسکوربیک اسید، وانیلین و کافئیک اسید بخشی از ترکیبات فنولی هسته خرما با خاصیت ضدباکتریایی هستند (Bouhlali et al., 2020). چای سبز با نام علمی (*Camellia sciensis*) یکی از رایج‌ترین گیاهان دارویی پرمصرف در جهان است که در انواع محصولات آرایشی، دارویی و غذای کاربرد دارد. چای سبز یک منبع طبیعی از کاتچین، کافئین، تئوفیلین، تیانین و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد. همچنین دارای خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی است. یکی دیگر از خواص چای سبز، پریبیوتیک بودن آن است که باعث افزایش رشد پروبیوتیک‌ها می‌شود (Donsi et al., 2011) بنابراین هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات عملکردی و تأثیر ترکیبات فنولیک‌های استخراج شده از هسته خرما بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک در مقایسه با عصاره چای سبز بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی هسته‌های خرما

هسته‌های خرما از مرکز تهیه خوراک دام در شهرستان شادگان تهیه شد. به منظور حذف مواد جامد اضافی، هسته‌های خرما پس از سورت شدن، با آب شهری شسته شده و به مدت ۱ روز در هوای آزاد و در معرض آفتاب

گرایش قابل توجه محققین به جداسازی ترکیبات زیست فعال از منابع طبیعی با توجه به داشتن خصوصیات همچون تحریک سیستم ایمنی، اثرات ضد سرطانی، غیر سمی بودن و مشابهت با گیرنده‌های موجود در ترکیبات بیولوژیک در سیستم ایمنی میزبان و نداشتن عوارض جانبی منجر به استفاده گسترده از این ترکیبات در صنایع دارویی و غذایی شده است. خصوصیات زیست فعال گیاهی به ویتامین‌ها، لیپیدها، اسیدهای فنولیک، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای موجود در آن‌ها برمی‌گردد (قادری قهفرخی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Pasha et al., 2022). ترکیبات فنولی جزء متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند و به طور طبیعی بالغ بر ۸۰۰۰ ترکیب فنولی مختلف با تاثیرهایی از قبیل دخالت در ساخت دیواره سلولی، مکانیسم دفاعی گیاه و دخیل در خصوصیات میوه مانند رنگ، طعم و مزه در گیاهان وجود دارد (رستگار و همکاران، ۱۳۹۲).

خرما یکی از قدیمترین میوه‌های مصرفی توسط انسان است که اثرات فوق‌العاده‌ای بر ارتقاء سلامت انسان دارد. از زمان‌های قدیم، به دلیل تأثیر مثبت آن بر باروری، جلوگیری از بروز اختلالات گوارشی و همچنین درمان بیماری‌های تنفسی مانند برونشیت و آسم مورد استفاده قرار می‌گرفت (Maisto et al., 2021). از عمده‌ترین و شناخته‌ترین ترکیب فنولی در هسته خرما می‌توان به پی-هیدروکسی بنزوئیک، پروتوکاتکوئیک و ام-کوماریک اسید اشاره کرد که هم به شکل آزاد و هم به شکل ترکیب شده با سایر اجزاء در هسته خرما وجود دارند (Shahidi, Nacz, 1995; Maqsood et al., 2020).

هسته خرما (۱۵-۱۰ درصد از وزن میوه کامل را تشکیل می‌دهد) (Noorbakh and Rabbani Khorasgani, 2021) در مقدار بسیار زیاد در خاورمیانه به عنوان محصول جانبی خرما تولید می‌شود اما اغلب به هدر رفته و یا به خوراک دام می‌رسد. مطالعات نشان داده است که هسته خرما کیفیت تغذیه‌ای بالایی داشته و یک منبع خوب از اجزاء

اسپکتروفتومتر (LAMBDA 365, Perkin Elmer, USA) قرائت شد. میزان فعالیت گیرندگی رادیکال عصاره با فرمول زیر تعیین گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز (به عنوان کنترل مثبت) مطابق با روش اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما، اندازه گیری شد.

$$\%DPPH = (A_{cont} - A_{sample}) / A_{cont} \times 100$$

اندازه گیری ترکیبات فنولی کل عصاره اتانولی

هسته خرما در مقایسه با چای سبز

با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو (3252562 Merck)، انجام شد. در این روش معرف فولین در حضور ترکیبات فنولیک در محلول قلیایی، احیاء و رنگ آبی در محلول تولید شد. به منظور انجام آزمایش، ابتدا ۴۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت‌های مختلف استاندارد گالیک اسید به ۳۱۶۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر معرف فولین و در نهایت ۶۰ درصد (وزنی/حجمی) کربنات سدیم ۷ درصد اشباع شده به آن اضافه گردید. جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در دمای اتاق و تاریکی، توسط اسپکتروفتومتر کالیبره شده با گالیک اسید در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید. مقدار ترکیبات فنولیک کل بر اساس میکروگرم معادل گالیک اسید در هر گرم نمونه خشک بیان شد (Beretta et al., 2005). مطابق با روش اندازه گیری فنول کل عصاره هسته‌ی خرما، برای عصاره چای سبز نیز عمل شد. برای شناسایی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره اتانولی هسته خرما و چای سبز از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC 1100, Agilent, USA)، در ۲۶۰ نانومتر استفاده شد.

فعال سازی اولیه باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم

باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC14917)، به صورت لیوفلیزه، از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. برای فعال سازی باکتری، ۰/۳ تا ۰/۴ میلی لیتر از محلول استریل (محیط کشت اختصاصی مایع) به ماده خشک درون آمپول اضافه و به دقت مخلوط گردید تا به شکل

خشک شدند. جهت تکمیل فرآیند خشک شدن، هسته های خرما در در آون (Memmert, Germany) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شدند. هسته های خشک شده توسط آسیاب چکشی خرد و به پودر هسته‌ی خرما تبدیل شدند. سپس با عبور از صافی با قطر منافذ ۱ میلی متر، پودر نرم و یکدستی از هسته های خرما به دست آمد (Pasha et al., 2022).

تهیه عصاره تام

۳۰۰ تا ۴۰۰ گرم پودر هسته‌ی خرما در ۱۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد (مرک، آلمان) غوطه‌ور شد. عمل استخراج عصاره به مدت ۷ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و توسط شیکر (Rashno, Iran) با سرعت ۱۳۰ rpm صورت گرفت. سپس نمونه توسط کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر شد. به منظور تبخیر حلال، عصاره در دمای ۵۰- ۴۰ درجه سلسیوس در دستگاه روتاری اواپراتور (ParsFarso, Iran) تحت خلاء و دمای ۵۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. عصاره هسته‌ی خرما در آون تحت خلاء (۱۴۴۵LS-۲) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا زمان تبخیر کامل محلول قرارداد شد. پودر عصاره های بدست آمده از نمونه، با کاردک از پیلت جدا و پودرها تا زمان انجام آزمایش در دمای (۱۸-) درجه سلسیوس نگهداری شدند. عصاره خشک چای سبز به صورت آماده از شرکت دارویی ابن ماسویه تهیه شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی با روش DPPH برای عصاره

اتانولی هسته خرما در مقایسه با چای سبز

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هسته خرما با استفاده از رادیکال های پایدار DPPH و مطابق با روش ویلیام بررسی شد (Brand-William, 1995). برای انجام آزمایش از غلظت های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ ppm از عصاره استفاده شد و با استفاده از روش DPPH درصد جذب و درصد مهار رادیکال و میزان IC50 اندازه گیری شد. برای انجام این آزمایش ۰/۲ میلی لیتر عصاره، به ۴ میلی لیتر محلول متانولی ۱۰۵×۶ مولار رادیکال آزاد افزوده و ۶۰ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شد. سپس جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه

تلقیح باکتری به عصاره اتانولی هسته خرما و چای

سبز و بررسی اثر عصاره ها بر رشد

به لوله‌های حاوی پودر عصاره اتانولی هسته خرما که غلظت و حجم آنها تنظیم شده است، ۱ میلی لیتر از استوک باکتری که حاوی جمعیت 1×10^6 cfu/ml باکتری اضافه گردید تا دوز باکتری در لوله‌های حاوی عصاره‌ها به 1×10^5 cfu/ml رسید.

برای عصاره چای سبز نیز عمل تلقیح به روشی مشابه صورت پذیرفت. به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیکی ترکیبات فنولیک هسته خرما بر روی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، پس از فعال سازی باکتری و تلقیح عصاره با باکتری، کشت و انکوبه کردن لوله‌های حاوی غلظت‌های مورد نظر (0.1% ، 0.5% و 1%) در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. در زمان صفر محیط کشت از لوله‌های حاوی غلظت‌های 0.1% ، 0.5% و 1% با حجم مشخص بر روی پلیت حاوی محیط کشت MRS Agar منتقل شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی در جارهای حاوی گاز پیک نوع A، گرمخانه‌گذاری شدند. برای لوله‌های زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز همانند لوله‌های زمان صفر عمل گردید و پس از گذشت زمان مورد نظر، کشت انجام شد. محیط کنترل مثبت حاوی عصاره چای سبز و محیط شاهد (کنترل منفی) حاوی باکتری بدون افزودن عصاره هسته خرما و عصاره چای سبز در غلظت و زمان مشابه تهیه شد (Molan et al., 2008).

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته

خرما

بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره هسته خرما با استفاده از روش Agar Disc Method انجام پذیرفت (Mackie and McCartney, 1989). باکتری‌های مورد بررسی از آزمایشگاه میکروبی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران تهیه گردید. از سوسپانسیون باکتریایی از استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) و اشریشیا کلی (گرم منفی) سرم فیزیولوژی حاوی 0.5 مک فارلند (10^8 cfu/ml) تهیه و کشت بر روی محیط مولر

سوسپانسیونی یکنواختی در آمد. کل سوسپانسیون به یک لوله بزرگ حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت مایع منتقل گردید. محیط کشت تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت این مدت زمان، مجدداً از محیط گرمخانه گذاری شده 0.1 میلی لیتر برداشته و به 10 میلی لیتر محیط کشت مایع (MRS broths) اضافه شد و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید (Molan et al., 2008).

رفتارسنجی باکتری

پس از فعال سازی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC14917) لیوفلیزه شده، برای شمارش باکتری ۲ کشت ۲۴ ساعته انجام شد. پس از تهیه سریال رقت و کشت سطحی بر روی MRS Agar ماکزیمم جمعیت باکتری (1×10^9 cfu/ml) بدست آمد. پس از تعیین ماکزیمم تعداد باکتری در میلی لیتر محیط کشت (عکس رقت $\times 10$ = تعداد شمارش شده = تعداد) جهت به دست آوردن میزان ماده تلقیح (1×10^5 cfu/ml)، ۱ cc از لوله حاوی جمعیت شمارش شده باکتری به لوله حاوی ۹ cc محیط کشت MRS Broth منتقل شد، سپس میزان ۱ cc از آن لوله را به لوله دوم حاوی ۹ cc محیط کشت MRS Broth منتقل گردید. در نتیجه در لوله سوم که معادل 1×10^6 cfu/ml بود، برای تلقیح در لوله‌های MRS Broth به میزان ۱ میلی لیتر در نه میلی لیتر ($\frac{1}{10}$) انجام شد که میزان اینوکولوم معادل 1×10^5 cfu/ml گردد (Molan et al., 2008).

تهیه عصاره جهت تلقیح

مقداری از پودر عصاره اتانولی هسته خرما، به آب مقطر اضافه و با تنظیم غلظت و حجم لوله‌ها، غلظت‌های 0.1 درصد، 0.5 درصد و 1 درصد (حجمی/حجمی) تهیه و لوله‌ها استریل شدند. تهیه عصاره چای سبز از پودر خشک عصاره چای سبز نیز مطابق همین فرایند صورت پذیرفت (Molan et al., 2008).

استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و آنالیز ANOVA و اختلاف معنی دار و عدم آن در سطح ۱ درصد بررسی شد ($P < 0.01$).

نتایج

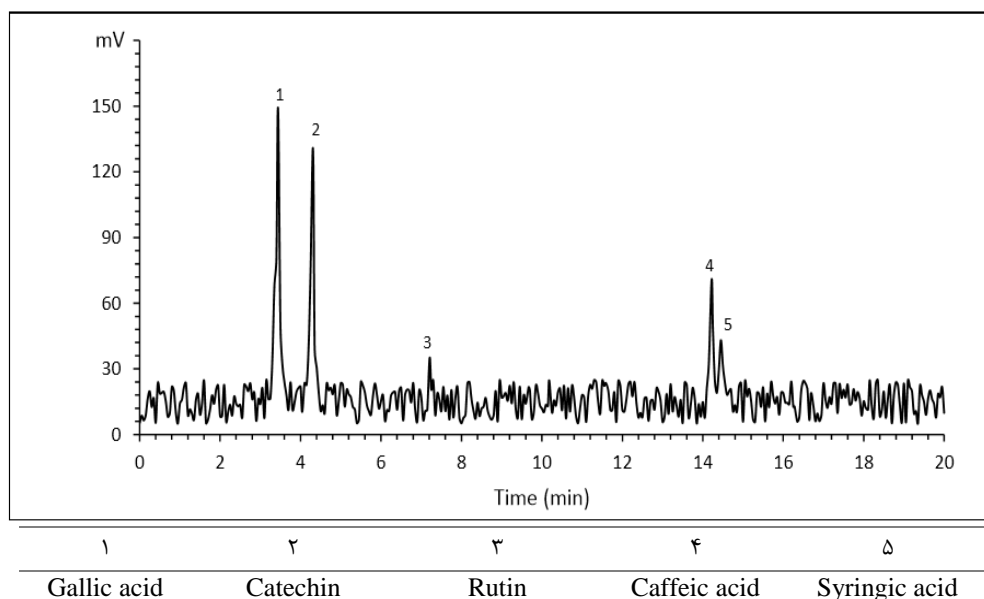
از ۱۰۰ گرم پودر هسته خرما ی آسیاب شده پس از آماده سازی نهایی عصاره اتانولی و انجام استخراج، مقدار ۵/۹۶ گرم عصاره خشک اتانولی هسته خرما (راندمان استخراج ۵/۹۶ درصد) به دست آمد.

تعیین ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی هسته خرما با HPLC

هینتون آگار انجام شد. دیسک پنبه‌ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۱ درصد و نیز ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۰/۵ درصد عصاره هسته خرما با پنس بر روی آنها قرار داده شد (مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به دفعات و در مقدار-های ۲۰ میکرولیتر بر روی دیسک پنبه‌ای قرار داده شد) و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قراردادده شد. پس از سپری شدن زمان گرم خانه گذاری، قطر هاله‌های مهاری براساس میلی متر اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

اختلاف معنی دار یا عدم آن برای داده‌های انتقال یافته واحدهای شمارش کلنی یا لگاریتم تعداد/میلی لیتر



شکل ۱- HPLC کروماتوگرام ترکیبات فنلی عصاره اتانولی هسته خرما

میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره اتانولی هسته خرما برحسب معادل اسید گالیک و با استفاده از معادله بدست آمده از منحنی استاندارد محاسبه و نتایج برحسب میکروگرم اسید گالیک در هر گرم عصاره خشک اتانولی هسته خرما بیان شد. میزان ترکیبات فنولیک کل عصاره خشک اتانولی هسته خرما ۶/۶۲ میکروگرم گالیک اسید در گرم عصاره به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی ارتباط غلظت و میزان ترکیبات فنولیک نشان داد با افزایش غلظت عصاره میزان جذب افزایش یافت.

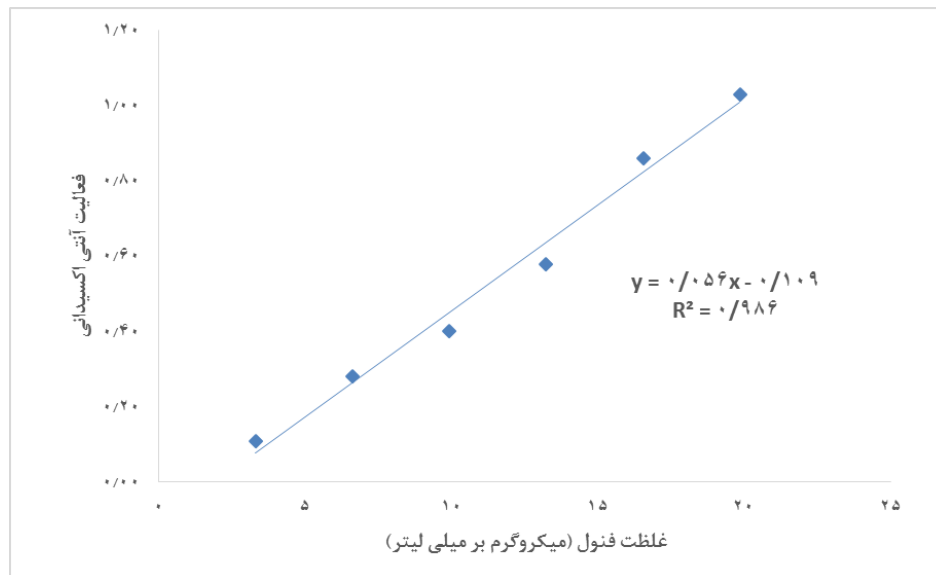
نتایج حاصل از بررسی نوع ترکیبات فنولی در عصاره هسته خرما با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد ترکیباتی مانند گالیک اسید، کاتچین، روتین، کافئیک اسید و سیرنجیک اسید به ترتیب به میزان ۰/۰۰۶۴، ۰/۰۰۶۳، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱۵ میلی گرم بر گرم در عصاره وجود دارد.

بررسی ترکیبات فنولی کل عصاره اتانولی هسته خرما

رابطه بین ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما

نتایج همبستگی مثبتی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار فنول کل در عصاره اتانولی هسته خرما را نشان داد.

در شکل ۳، منحنی رابطه ترکیبات فنلی کل با فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما نشان داده شده است.

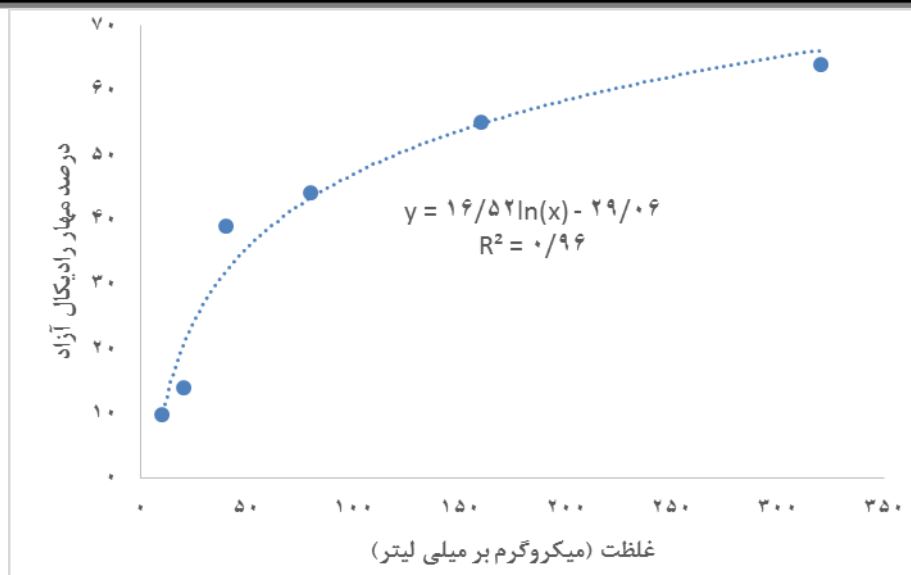


شکل ۳- منحنی بررسی رابطه بین ترکیبات فنلی کل و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما

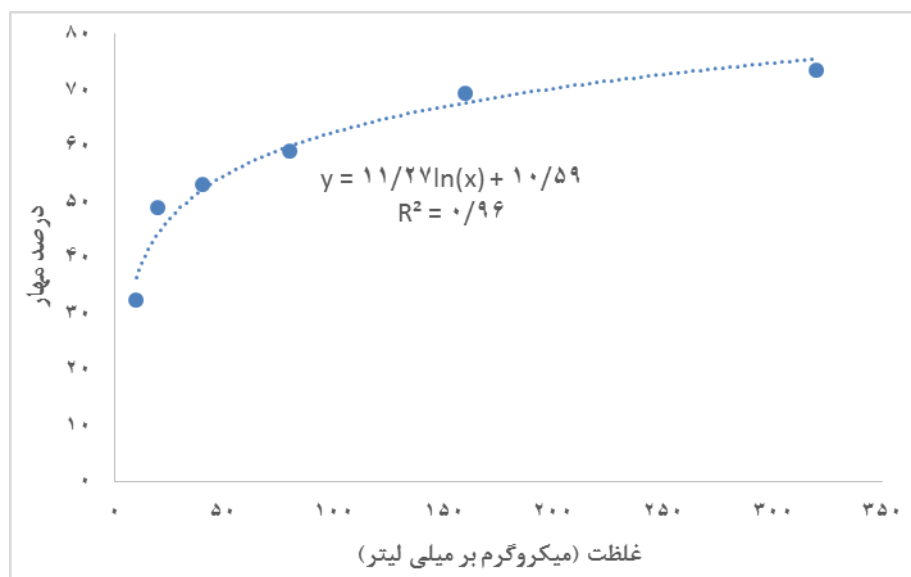
بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما

آنتی اکسیدانی BHT به عنوان کنترل مثبت آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده با افزایش غلظت خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره نیز افزایش یافت و اثر معنی دار بین افزایش غلظت و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما وجود داشت ($P < 0.01$).

در شکل ۴، منحنی بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما و در شکل ۶ منحنی بررسی فعالیت



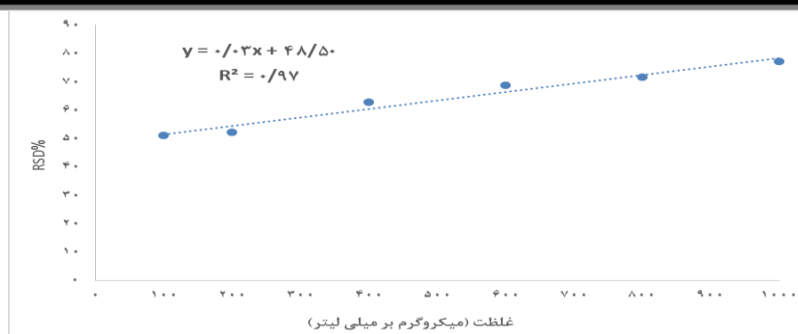
شکل ۴- منحنی بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما



شکل ۶- منحنی فعالیت آنتی اکسیدانی BHT

کنترل مثبت، در آزمایش بررسی خاصیت پریبیوتیک عصاره هسته خرما مورد استفاده قرار گرفته بود، در ۶ غلظت مختلف اندازه گیری شد.

در شکل ۶ منحنی بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز به عنوان کنترل مثبت آورده شده است. ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز که به عنوان محیط



شکل ۶- منحنی بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز

و BHT میزان IC50 بدست آمده برای عصاره اتانولی هسته خرما برابر با ۱۸۳/۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر، BHT برابر با ۴۸/۰۶ میکروگرم بر میلی لیتر و برای عصاره چای سبز برابر با ۵۰/۴۹ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. درصد بالاتر مهار رادیکال‌های آزاد را توسط عصاره چای سبز نشان می‌دهد ($P < 0.01$).

جدول ۱- نتایج آنالیز عصاره اتانولی هسته خرما، عصاره چای سبز و BHT

معادله خط	مهار (IC50 μg/mL)	درصد مهار رادیکال (μg/mL)	
$y = 16.52 \ln(x) - 29.06, R^2 = 96$	$183/73 \pm 0/62^a$	$48/27 \pm 0/39^c$	عصاره هسته خرما
$y = 11.27 \ln(x) + 10.59, R^2 = 96$	$48/06 \pm 0/57^c$	$56/05 \pm 0/58^b$	BHT
$y = 0.03x + 48.50, R^2 = 97$	$50/49 \pm 0/19^b$	$63/9 \pm 0/09^a$	عصاره چای سبز

حروف غیر مشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ در هر ستون است ($P < 0.01$).

در زمان، اثرات عصاره در غلظت و اثرات غلظت در زمان، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود داشت ($P < 0.01$).

با توجه به داده‌های جدول ۲، اختلاف معنی‌داری بین تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی چای سبز و خرما در بهبود رشد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاننتاروم بجز در غلظت ۰/۱ و زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۵ در زمان ۴۸ ساعت وجود نداشت. در مورد عصاره خرما بالاترین کارایی در بهبود رشد در ساعت ۲۴ در تیمار ۰/۵ درصد عصاره اتانولی خرما و در ساعت ۲۴ و بدون اختلاف معنی‌دار در هر سه غلظت اندازه‌گیری شد ($P < 0.01$).

بررسی IC50 عصاره اتانولی هسته خرما

نتایج بررسی میزان IC50 عصاره اتانولی هسته خرما در جدول ۱ نشان داده شده است. از استاندارد BHT و عصاره چای سبز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. با توجه به بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما

فعالیت پریبیوتیکی عصاره هسته خرما

در این تحقیق اثر پریبیوتیکی عصاره اتانولی هسته خرما بر باکتری لاکتوباسیلوس پلاننتاروم در جدول ۲ مورد بررسی قرار گرفته است. در بررسی اثر پریبیوتیکی عصاره اتانولی هسته خرما بر باکتری لاکتوباسیلوس پلاننتاروم ATCC1417، از عصاره چای سبز که خاصیت پریبیوتیکی آن در مطالعات قبلی گزارش شده، به عنوان محیط کنترل مثبت استفاده شد. تاثیر هر کدام از عصاره‌ها بر باکتری مورد نظر در سه غلظت و در چهار زمان مورد بررسی قرار گرفت و پس از آن کشت و شمارش باکتری‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. در هر یک از اثرات مستقل زمان، غلظت، نوع عصاره و اثرات متقابل عصاره

جدول ۲- بررسی خاصیت عصاره اتانولی هسته خرما در مقایسه با چای سبز در بهبود رشد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتاروم

عصاره	زمان	شاهد	درصد غلظت عصاره		
			۰/۱	۰/۵	۱
خرما	۰	۵/۰±۱۱/۱۳ ^{Aa}	۵/۰±۰۸/۱۱ ^{Aa}	۵/۰±۱۷/۹۱ ^{Aa}	۵/۰±۱۲/۳۳ ^{Aa}
	۲۴	۸/۰±۴۹/۴۳ ^{Ab}	۵/۰±۵۵/۶۴ ^{Aa}	۸/۰±۹۹/۳۳ ^{Ab}	۸/۰±۶۲/۲۲ ^{Ab}
	۴۸	۷/۰±۳۸/۹۱ ^{Ab}	۷/۰±۳۱/۴۰ ^{Ab}	۵/۰±۸/۴۵ ^{Aa}	۸/۰±۷/۱۰ ^{Ac}
	۷۲	۷/۰±۴۹/۷۹ ^{Ac}	۵/۰±۱۸/۳۳ ^{Aa}	۶/۰±۵۳/۱۵ ^{Ab}	۶/۰±۹۵/۳۱ ^{Bb}
چای سبز	۰	۵/۰±۱۱/۵۰ ^{Aa}	۵/۰±۰۷/۸۶ ^{Aa}	۴/۰±۷۸/۳۳ ^{Aa}	۵/۰±۱۶/۱۵ ^{Aa}
	۲۴	۸/۰±۴۹/۸۸ ^{Aa}	۸/۰±۶/۷۸ ^{Ba}	۸/۰±۹۵/۰۴ ^{Aa}	۸/۰±۹۹/۴۸ ^{Aa}
	۴۸	۷/۰±۳۸/۱۹ ^{Aa}	۷/۰±۵۲/۵۲ ^{Aa}	۸/۰±۶۶/۲۳ ^{Bb}	۸/۰±۹۴/۵۲ ^{Ab}
	۷۲	۷/۰±۹۷/۰۹ ^{Aa}	۵/۰±۲۶/۲۶ ^{Ab}	۶/۰±۷۴/۷۰ ^{Ac}	۸/۰±۲۶/۶۲ ^{Ad}

حروف غیر مشابه کوچک به معنی اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۱ در هر ردیف است ($P < 0/01$).

حروف غیر مشابه بزرگ به معنی اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۱ بین تیمارهای خرما و چای در تیمارهای مشابه است ($P < 0/01$).

نتایج هر عصاره از سه غلظت در چهار زمان در مقایسه با نمونه شاهد بدست آمده است. هرستون نشان دهنده غلظتی از عصاره‌های مورد بررسی است.

اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته خرما

در غلظت ۰/۵ درصد، هاله عدم رشد در هیچ کدام از باکتری‌های مورد بررسی ملاحظه نشد. ولی در غلظت ۱ درصد هاله عدم رشد بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیاکلی* به ترتیب $0/81 \pm 6$ و ۱ میلی متر مشاهده گردید و قطر هاله عدم رشد در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به شکل معنی داری بزرگتر از *شریشیا کلی* بود ($P < 0/01$).

بحث

با توجه به منحنی جذب ترکیبات فنولیک عصاره اتانولی هسته خرما، با افزایش غلظت عصاره‌ی خرما و چای سبز میزان ترکیبات فنولی کل عصاره افزایش یافت. میزان ترکیبات فنولی عصاره چای سبز به عنوان کنترل مثبت، ۱/۲۱۵ میکروگرم اسید گالیک در گرم عصاره بود که مقدار آن از میزان ترکیبات فنولیک عصاره اتانولی هسته خرما (۶/۶۲) کمتر بود که نشان می‌دهد هسته خرما دارای مقادیر بسیار بالایی ترکیبات پلی فنلی می‌باشد.

Habib و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی خصوصیات کمی، شناسایی و تعیین ترکیبات فنلی هسته خرما نشان دادند که هسته خرما یک منبع بسیار غنی از ترکیبات فعالی

زیستی است در نتیجه می‌تواند یک گزینه مناسب به عنوان یک ماده افزودنی بیولوژیکی فعال در تولید غذاهای عملگر باشد. باغبانی و شیرازی نژاد (۱۳۹۸) میزان ترکیبات فنولی هسته خرما را $119/53$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش کرد که با توجه به مقدار $2/27$ $\pm 6/190$ میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره تقریباً با یکدیگر هم‌خوانی دارند. Solaimani Dahdivani و همکاران (۱۳۹۵)، مقدار ترکیبات فنولی در عصاره هسته ۳ واریته خرما می‌مضافتی بهم، جیرفت و کلوته را به ترتیب $1898/27$ ، $1840/93$ و $1952/93$ میلی گرم گالیک اسید در صد گرم ماده خشک گزارش کردند. Eimad din و همکاران (۲۰۱۵)، میزان محتوای فنول کل ارقام هسته خرما در جنوب مراکش را بین $2058-2983$ میلی گرم در 100 گرم گالیک اسید گزارش نمودند. تنوع در مقدار ترکیبات فنولیک هسته خرما به واریته، شرایط رشد، بلوغ، فصل، خاستگاه جغرافیایی، کود، بیماری، نوع خاک، شرایط ذخیره سازی و همچنین به نوع سیستم استخراج بستگی دارد. به طور کل همبستگی خوبی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و مقدار توتال فنل در عصاره اتانولی هسته خرما وجود داشت. از این رو می‌توان عنوان کرد فعالیت آنتی اکسیدانی مرتبط با مقدار ترکیبات فنولیک خواهد

Catechin را به عنوان ترکیبات فنولی در عصاره هسته خرما تایید می‌کنند، می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره فنولی هسته خرما را تایید کرد. در مطالعه‌ی باغبانی و شیرازی نژاد (۱۳۹۸) گالیک اسید و سپناپیک اسید بلندترین پیک را در خروجی HPLC داشتند.

Ic50 نشان دهنده قدرت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره هسته خرما می‌باشد. هرچه مقدار آن کمتر باشد نشان دهنده میزان فعالیت بیشتر آنتی‌اکسیدانی خواهد بود (باغبانی و شیرازی نژاد، ۱۳۹۸). همانطور که نتایج نشان داد (جدول ۱)، IC50 در مقایسه با BHT بالاتر بود و برای عصاره اتانولی هسته خرما کمترین مقدار را داشت. در واقع استاندارد BHT قوی‌تر بوده که توانست در غلظت کمتر ۵۰٪ از رادیکال آزاد را مهار کند. در مطالعه‌ی دادجو و همکاران (۱۳۹۳) مقدار IC50 به دست آمده برای هسته خرما ۰/۰۱۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با مقدار ۱۸۳/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر مطالعه‌ی حاضر مقدار بسیار پایین‌تری را نشان می‌دهد. تفاوت موجود را می‌توان به تفاوت در مقدار و نوع ترکیبات فنولی ناشی از نوع خرما و نیز روش استخراج عصاره، نسبت داد (Noorbakh and Rabbani Khorasgani, 2021).

مقایسه بین زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت برای عصاره اتانولی هسته خرما نشان داد که غلظت ۰/۵ درصد عصاره اتانولی هسته خرما در زمان ۲۴ ساعت اولیه رشد، بیشترین تأثیر را بر تعداد باکتری زنده داشت. ولی از زمان ۴۸ تا ۷۲ ساعت که سلول باکتری از فعالیت آن کاسته شد غلظت ۱ درصد عصاره اتانولی هسته خرما یک افزایش نسبی در تعداد سلول باکتری زنده نسبت به شاهد و دو غلظت دیگر در این زمان‌ها نشان داد که در واقع زمان زنده مانی باکتری را افزایش داد ($P < 0/01$). بطور کلی میزان رشد و افزایش باکتری در غلظت ۰/۱ درصد عصاره اتانولی هسته خرما مشابه عصاره چای سبز بوده و هردو عصاره در این غلظت نسبت به نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P < 0/01$). نتایج مقایسه عصاره اتانولی هسته خرما با محیط کنترل مثبت نشان داد که عصاره اتانولی هسته خرما در زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۵

بود. Safaa و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی خرما نیز همبستگی مثبت بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنل کل در نمونه‌های گیاهی را نشان دادند.

آزمون DPPH به‌طور گسترده‌ای به منظور تعیین فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد ترکیبات خالص یا گیاهی مختلف به کار می‌رود (Devahastin, 2008; Mayachiew, 2008). طبق نتایج بدست آمده در مطالعه‌ی حاضر، با افزایش غلظت خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نیز افزایش یافت و اثر معنی‌دار بین افزایش غلظت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما وجود داشت ($P < 0/01$). بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هسته خرما نشان از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌ی استخراج شده از هسته‌ی خرما دارد. در مطالعه باغبانی و شیرازی نژاد (۱۳۹۸) نیز با افزایش غلظت عصاره هسته خرما میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش معنی‌داری پیدا کرد. Alharthi و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی ترکیبات فنولی چهار رقم از ارقام خرما عمان، گزارش نمودند که فعالیت مهار رادیکال آزاد برای هسته خرما وابسته به غلظت عصاره است و بالاترین درصد بازدارندگی رادیکال DPPH برای خرما ۷۰/۶۲ درصد نشان داده شد، که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد.

Din (۲۰۱۵)، در بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سه رقم هسته خرما عنوان نمودند که در نتایج بدست آمده، همبستگی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی و همچنین محتوای فلاونوئیدی در هر سه رقم هسته خرما وجود داشت که با نتایج بدست آمده از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی هسته خرما در این تحقیق مطابقت دارد. Sadaf و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره خرما، درصد مهار رادیکال آزاد عصاره خرما را ۴۲٪ گزارش کرده و آن را ناشی از حضور درصد بالای از ترکیبات فنولی که عنوان گروه‌های دهنده الکترون، سبب خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شوند، گزارش کردند که با توجه به خروجی HPLC که مقادیر بالایی از Gallic acid و

روی رشد و بهبود ساختار پروبیوتیک در مطالعه‌ی حاضر، با نتایج مطالعه‌ی Maisto و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت دارد. Maisto و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که پالپ خرما میزان رشد پروبیوتیک‌های لاکتیکی *Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum* (*L. plantarum*), *Lactobacillus delbruekii subsp. bulgaricus* (*L. bulgaricus*), *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) and *Lactinocaseibacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) را به شکل معنی‌داری افزایش داد. از طرفی اثر افزایشی عصاره چای سبز، مربوط به توانایی پلی فنل‌های چای سبز به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌رادیکال می‌باشد که با افزایش فعالیت آنتی‌بیوتیکی در محیط، شرایط مساعدتری برای رشد و تکثیر باکتری‌های پروبیوتیک فراهم می‌کند (Molan et al., 2008). Yang و همکاران (2009)، در بررسی استخراج پلی ساکاریدها از ضایعات سس سویا و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پریبیوتیکی آن، گزارش نمودند که با وجود اینکه پلی ساکاریدهای استخراجی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی بودند ولی با افزایش غلظت پلی ساکاریدهای استخراج شده، تعداد باکتری نسبت به محیط کنترل افزایش نشان داده است و پلی ساکاریدهای استخراج شده از ضایعات سس سویا اثر پریبیوتیکی بر باکتری داشته‌اند. این در حالیست که پیش از این عنوان شده بود فعالیت پریبیوتیکی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط دارد (Yang et al., 2011). برای نشان دادن اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی هسته خرما و همچنین قابلیت انتخابی عمل کردن این عصاره در مقابل میکرواورگانسیم‌های مفید و مضر، بررسی خاصیت ضد میکروبی این عصاره بر دو نمونه باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* آزمایش شد. نتایج نشان داد عصاره هسته خرما توانایی مقابله با هر دو باکتری را داشت که پیش از این نیز در پژوهش‌های Sabah و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی عصاره استونی هسته خرما علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و Ammar و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی عصاره متانولی

درصد توانست با عصاره چای سبز در زمان ۲۴ ساعت و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد و زمان ۴۸ ساعت در غلظت ۱ درصد رقابت کند ($P < 0/01$). به طور کل عصاره چای سبز در غلظت ۱ درصد نسبت به عصاره اتانولی هسته خرما عملکرد بالاتری در افزایش تعداد باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانٹاروم نشان داده است. این نتایج با نتایج Molan و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثر پریبیوتیکی عصاره چای سبز مطابقت دارد. آنها عنوان نمودند که عصاره چای سبز فعالیت پریبیوتیک قابل ملاحظه‌ای به همراه فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب داشته‌طوریکه فعالیت پریبیوتیکی آن با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرتبط بوده است. در مورد عصاره اتانولی هسته خرما افزایش غلظت تا حدی می‌تواند اثر خود را بگذارد و از یک حدی به بعد با افزایش غلظت تأثیری در تعداد باکتری مشاهده نشد. عصاره اتانولی هسته خرما در غلظت ۰/۵ و ۱ درصد توانست شرایطی مشابه عصاره چای سبز ایجاد کند ولی عصاره چای سبز در غلظت ۱ درصد و زمان ۷۲ ساعت بهتر از عصاره هسته خرما عمل نمود.

نکته اساسی در تعریف پریبیوتیک‌ها امکان رشد باکتری پروبیوتیک در حضور آن و افزایش جمعیت باکتری‌های پروبیوتیک و از طرفی اثر بر افزایش زنده مانگی پروبیوتیک است. این مسئله بخصوص در ترکیب‌های سینبیوتیک که در مواد غذایی استفاده می‌شوند بسیار حائز اهمیت است. یعنی در مواد غذایی پروبیوتیک، ترکیب پریبیوتیک به عنوان ترکیب حمایت کننده رشد و افزایش زنده مانگی عمل می‌کند (El-Kholy et al., 2019). این موضوع به پیچیدگی ساختاری ترکیبات پریبیوتیک و عدم دسترسی به قندهای ساده در محیط رشد میکروبی مربوط می‌شود. در محیط‌های حاوی قند ساده به دلیل پدیده مهار کاتابولیکی و مهار فعالیت آنزیم‌ها رشد محدود می‌شود (Griffiths et al., 1999). ولی در محیط‌های حاوی ترکیبات پریبیوتیک به دلیل پیچیدگی ساختاری امکان تولید آنزیم‌های بیشتر که برای متابولیسم شدن ترکیبات غذایی لازم است فراهم شده و به میکرواورگانسیم قدرت حفظ ثبات و پایداری می‌دهد. تاثیر محیط پریبیوتیک بر

سبب افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی، نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. نتایج بدست آمده از این تحقیق تا حدودی با نتایج بدست آمده از پژوهش‌های شریعتی و همکاران (۱۳۸۹)، در بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های استونی و اتانولی هسته خرما مطابقت دارد، که تنها ۳ سویه استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت نسبی در حضور عصاره اتانولی و استونی هسته خرما از خود نشان دادند. فعالیت کمتر عصاره اتانولی هسته خرما در مقابل باکتری اشرشیا کلی مطابق با نتایج Ayachi و همکاران (۲۰۰۹)، می‌باشد. که نشان دادند که عصاره هسته خرما فعالیت ضد میکروبی کمتری در مقابل اشرشیا کلی از خود نشان داده است. نتایج حاصل از این بررسی همچنین با نتایج محمودی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زیره سبز مطابقت دارد. در این بررسی گزارش نمودند که حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس زیره سبز باکتری گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس و مقاوم‌ترین باکتری نسبت به اسانس، باکتری گرم منفی اشرشیا کلی بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده ترکیبات فنولیک استخراج شده از هسته خرما قابلیت پریبیوتیکی خوبی را نشان دادند. عصاره اتانولی هسته خرما با داشتن مقادیر قابل قبولی از ترکیبات فنولیک دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی، پریبیوتیکی و اثرات ضد میکروبی بود. با توجه به اثرات نامطلوب مصرف آنتی اکسیدان‌ها و نگهدارنده‌های مصنوعی عصاره هسته خرما می‌تواند به عنوان منبع غنی از ترکیبات فنولیک وبا داشتن خاصیت پریبیوتیکی و ضد میکروبی طبیعی در صنعت غذا و دارو، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرارگیرد. همچنین به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی مطلوب گزینه مناسبی برای استفاده تکنولوژیکی و اثرات سلامتی بخش برای تولید مواد غذایی فرا سودمند باشند.

هسته خرما علیه باکتری سالمونلاتیفی موریوم نیز تأیید شده است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد عصاره اتانولی هسته خرما در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت پایین‌تر بود که علت آن می‌تواند مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به ترکیبات فنولیک و تفاوت در ساختمان دیواره سلولی آن‌ها باشد (Negiet al., 2003). گزارش‌های مشابهی از فعالیت ضدباکتری عصاره آبی هسته خرما در مقابل سودوموناس، پروتئوسوالگاریس، کبسیلا پنومونیه و اشرشیا کلی در دسترس می‌باشد (Yassein, 2015). نتایج این تحقیق با نتایج Keddari و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تاثیر عصاره خرما بر روی باکتری‌های اسید لاکتیکی، عنوان کردند که کارایی عصاره خرما در مقابله با باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بالاتر بود. اثر ترکیبات فنولیک وابسته به غلظت می‌باشد و در غلظت‌های پایین، ترکیبات فنولیک بر فعالیت آنزیم‌ها به ویژه آنزیم‌هایی که در ارتباط با تولید انرژی هستند اثر می‌گذارند در حالی که در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنولیک باعث غیر طبیعی شدن پروتئین‌ها می‌شوند. اثر ترکیبات فنولیک (گالیک اسید، کلروژنیک و روتین (Maqsood et al., 2020)) بر رشد میکروب‌ها و تولید سم می‌تواند در نتیجه قابلیت ترکیبات فنولیک در تغییرپذیری دیواره‌ی سلولی و خروج ماکرومولکول‌ها از درون سلول نیز باشد. همچنین این ترکیبات می‌توانند با پروتئین‌های غشاء واکنش داده و باعث تغییر شکل این پروتئین‌ها و به تبع آن تغییر در عملکرد آن‌ها شوند (Fernandez-Lopez et al., 2022). ترکیب اصلی دیواره سلول باکترهای گرم مثبت، پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است. اما دیواره سلولی باکترهای گرم منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لپیدها می‌باشد (Keddari et al., 2021). همچنین دیواره سلولی باکتری گرم منفی دارای غشاء خارجی است که سطح خارجی دیواره را می‌پوشاند (Black, 1996). مجموعه این عوامل

منابع

۱. باغبانی، ف.، شیرازی نژاد، ع. ۱۳۹۸. بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره هسته خرما و تاثیر آن بر ویژگی های فیزیکی شیمیایی، میکروبی و حسی کیک فنجان. علوم و صنایع غذایی. ۸۸: ۳۴۲-۳۲۷.
۲. دادجو، عطیه؛ گلمکانی، ت؛ موسوی نسب، م؛ مصباحی، غ؛ بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره هسته خرما کبکاب استخراج شده به کمک ماکروویو. بیست و دومین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران. دانشگاه شیراز. ۱۳۹۳
۳. رستگار، سمیه؛ روشن، و؛ راحمی، م؛ بررسی ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی میوه سه رقم خرما در مراحل مختلف رشد. ۱۳۹۲. بیستمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران دانشگاه شیراز.
- composition and characteristic profiles of the lipid fraction. Food Chemistry 84: 577-584.
12. Black, J. C. (1996). Growth and culturing of bacteria: Microbiology Principles and Application. Pp. 80-82
13. Bouhlali, E.D.T.; Hmidani, A.; Bourkhis, B.; Khouya, T.; Ramchoun, M.; Filali-Zegzouti, Y.; Alem, C. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of four Moroccan date (Phoenix dactylifera L.) seed varieties. Heliyon 2020, 6, e03436
14. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 28, 25-30.
15. Deng J, Zhong J, Long J, Zou X, Wang D, Song Y, Zhou K, Liang Y, Huang R, Wei X (2020) Hypoglycemic effects and mechanism of different molecular weights of konjac glucomannans in type 2 diabetic rats. Int J Biol Macromol 165:2231-2243
16. Din (2015). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 15:7313-7352; doi: 10.3390/molecules 15107313.
17. Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011) Nanoencapsulation of essential oils to
۴. شریعتی، مهرداد؛ پردلی، ح؛ خادمیان، آ؛ کیائی، ا؛ بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره های میوه و هسته ی خرما علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم. ۱۳۸۹. علوم و فناوری و تغذیه. سال هفتم، شماره ۴، صفحات ۴۷ تا ۴۲.
۵. قادری قهفرخی، م، اعلمی، مهران. ۱۳۹۱. بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی دو وارسته ی بلوط *Q.castaneifolia var* و *Q.branti var persica* در روغن آفتاب گردان. مجله علوم و صنایع غذایی ایران. شماره ۱. ۱۲۷-۱۱۷
۶. محمودی، رزاق، احسانی، ع، زارع، پ، ویزگیهای ترکیبات شیمیایی، ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی اسانس زیره سبز، نشریه پژوهش های صنعتی ایران/جلد ۲۲ شماره ۳/سال ۱۳۹۱، صفحات ۳۲۱-۳۱۱
7. Aldhaferi, A., G. Alhadrami., N. Aboalnaga., I. Wasfi., and M. Elridi. 2004. Chemical composition of date pits and reproductive hormonal status of rats fed date pits. FOOD Chemistry, 86, 93-97
8. Ammar, N.M., Lamia, T., Nabil, H., El-Sayed, M., and Tom JM (2009). Flavonoid constituents and antimicrobial activity of date (Phoenix dactylifera L.) seeds growing in Egypt. In: Proceedings of 4th conference on research and development of pharmaceutical industries (Current Challenges). Med. Arom. Plant Sci. Biotechnol., 3: 1-5.
9. Ayachi A, Alloui N, Bennoune O, Yakhlef G, Daas Amiour S, Bouzid W, Djemai Zoughlache S, Boudjellal K, Abdessemed H (2009). Antibacterial activity of Some Fruits; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of Salmonella American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 6(1): 12-15.
10. Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei Facino, R. (2005) Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Anal Chim Acta. 533: 185-191
11. Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Lognay G, Drira N E, and Attia H, 2004. Date seeds: chemical

- enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Sci Technol.* 44: 1908-1914
18. Eimad dine Tariq Boahlali, Chacib Alem, Jamal Ennassir, Mohamed Benlyas, AddiNati Mbark, Younes Filali Zegzouti, Phytochemical composition and antioxidant capacity of three date (*Phoenix dactylifera* L.) seeds varieties grown in the South East Morocco, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (2015).
 19. El-Kholy WM, Soliman TN, Darwish AMG (2019) Evaluation of date palm pollen (*Phoenix dactylifera* L.) encapsulation, impact on the nutritional and functional properties of fortified yoghurt. *PLoS ONE* 14(10): e0222789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222789>
 20. Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M.; Sayas-Barberá, E.; Navarro-Rodríguez de Vera, C.; Pérez-Álvarez, J.Á. Biological, Nutritive, Functional and Healthy Potential of Date Palm Fruit (*Phoenix dactylifera* L.): Current Research and Future Prospects. *Agronomy* 2022, 12, 876. <https://doi.org/10.3390/agronomy12040876>
 21. Ghnimi S, Umer S, Karim A, Kamal-Eldin A (2017) Date fruit (*Phoenix dactylifera* L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS J* 6:1-10
 22. Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H Le-wontin, R.C. (1999). *Modern genetic analysis*, WH Freeman and company, New York, New York, pp.336-346
 23. Habib HM, Platat C, Meudec E, Cheynier V, Ibrahim WH (2014) Polyphenolic compounds in date fruit seed (*Phoenix dactylifera*): characterisation and quantification by using UPLC-DAD-ESI-MS. *J Sci Food Agri* 94:1084-9.
 24. Keddari S, Boufadi My, Mokhtar M, Hamed D. Culture Of Lactic Acid Bacteria In Natural Environments Based On Dates. *Pharmacog J.* 2021;13(3): 675-81
 25. Mackie & Mc cartney. *Practical medical microbiology*; 1989.
 26. Maisto, M.; Annunziata, G.; Schiano, E.; Piccolo, V.; Iannuzzo, F.; Santangelo, R.; Ciampaglia, R.; Tenore, G.C.; Novellino, E.; Grieco, P. Potential Functional Snacks: Date Fruit Bars Supplemented by Different Species of *Lactobacillus* spp. *Foods* 2021, 10, 1760. <https://doi.org/10.3390/foods10081760>
 27. Maisto, M.; Annunziata, G.; Schiano, E.; Piccolo, V.; Iannuzzo, F.; Santangelo, R.; Ciampaglia, R.; Tenore, G.C.; Novellino, E.; Grieco, P. Potential Functional Snacks: Date Fruit Bars Supplemented by Different Species of *Lactobacillus* spp. *Foods* 2021, 10, 1760. <https://doi.org/10.3390/foods10081760>
 28. Masqsood, s., Adiamo, O., Ahmad, M., Mudgil, P. 2020. Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food chem.* 308: 125522.
 29. Mayachiew, P. and Devahastin, S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT.* 41, 1153-1159.
 30. Molan, A. L., Flanagan, J., Wei, W. P. and J. Moughan. 2009. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chem.* 114: 829-835.
 31. Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K. and Jena, B.S. 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 2003; 80(3): 393-7.
 32. Noorbakhsh, H., Khorasagani, M. 2022. Date (*Phoenix dactylifera* L.) polysaccharides: prebiotic potential & health properties, a Clinical Trial. *Research Square*. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1705400/v1>
 33. Pasha, A.Z., Bukhari, S.A., Enshasy, H.A.E., Adawi, H.E., Obaid, S.A. 2022. Composition analysis and Physicochemical evaluation of date palm (*Phoenix dactylifera*) mucilage for medicinal purposes. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 29: 774-780.
 34. Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38(8), 859-865.
 35. Sabah, A., Jassim, A. & Naji, M. A. (2007). In vitro evaluation of the antibacterial activity of an extract of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pits on a *Pseudomonas* phage. *Oxford Journals, Evid. Based Complement Altern. Med.* 1-6.
 36. Sadaf Zehra, Abeer Saeed and Sameera Fatima, Antioxidant and antibacterial studies of *Phoenix dactylifera* and its varieties, Waljat College of Applied Sciences, BIT International Center, Muscat, PO Box 197, P.C. 124, Rusayl, Sultanate of Oman. *IJAMBR* 3 (2015) 81-88

-
37. Safaa Y. Qusti , Ahmed N. Abo-Khatwa And Mona A. Bin Lahwa, Screening Of Antioxidant Activity And Phenolic Content Of Selected Food Items Cited In The Holly Quran, *Ejbs* 2 (1) . Jan-March 2010.
38. Shahidi, F., & Naczk, M. (1995). Food phenolics: Sources, chemistry, effects, applications. Lancaster PA: Technomic Publishing Company Inc.
39. Shi Q, Yan J, Jiang B, Chi X, Wang J, Liang X, Ai X (2021) A general strategy for the structural determination of carbohydrates by multi-dimensional NMR spectroscopies. *Carbohydr Polym* 267:118218
40. Solaimani Dahdivan¹, S. Golshan Tafti A. and Yasini Ardakani SA. Investigating antioxidant activity, polyphenols content, pigments and total crude fiber of date pits of Mazafati and Kalutah varieties in Kerman province. 2016; 26(1):113-122
41. Thouri, A.; Chahdoura, H.; El Arem, A.; Omri Hichri, A.; Ben Hassin, R.; Achour, L. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arehti). *BMC Complement. Altern. Med.* 2017,17, 248
42. Yang, B., Jiang, Y. M., Zhao, M. M., Chen, F., Wang, R., Chen, Y. L., et al. (2009). Structural characterisation of polysaccharides purified from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Food Chemistry*, 115, 609–614.
43. Yassein N. N. (2012). Antibacterial effect of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pit aqueous extract on some bacteria cause urinary tract infection. *Diyala J. Pure Sci.* 8(3):112-120

Evaluation of functional properties of phenolic compounds extracted from on date palm (*Phoenix dactylifera L.*) pit in comparison to green tea extract viability of selected probiotic bacteria

Mojgan Moghadam¹, Mehrnoosh Tadayoni^{1*}, Ali Fazlara²

1. Food science and technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran.

2. Food hygiene, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: m.t.tadayoni@gmail.com

Abstract

Phenolic compounds with antioxidant and antiradical properties have important role in food preservation and human health. Phenolic compounds are important compounds of date palm seeds usually show high antioxidant activity. In this study, the effect of phenolic compounds extracted from date palm seeds on probiotic bacteria is studied, the total amount of ethanol extract date palm seeds, using the Folin-Ciocateu reagent and the antioxidant activity of the extract using the DPPH reagent was evaluated against BHT. Prebiotic effect of phenolic compounds of date palm seeds on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum*, (ATCC14917) in three concentrations 0.1, 0.5, 1 % compared with green tea extract and extract antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *E.coli* were performed at 0.5, 1 %. The total dry extract ethanol date palm seeds phenolic compounds was found 6.62 % on gallic acid. Free radical scavenging rate 48.27 %, IC₅₀ for ethanol palm seeds 183.73 µg/mL was calculated. According to the HPLC output, which confirm high amounts of Gallic acid and Catechin as phenolic compounds in from date palm seed. The results showed that phenolic compounds extracted from date palm seeds has increased the viability of probiotic bacteria in the level 0.5, 1% and some what have antibacterial effect on the concentration of 1% on bacteria *Staphylococcus aureus*. According to the results, phenolic compounds extracted from date palm seeds showed good prebiotic functionality. Also, due to the antioxidant activity are desirable option for technology use and health effects for the production of functional food ingredients.

Keywords: Phenolic compounds, Antioxidant property, Date palm seeds extract, Green tea extract

Roster

The study of the effect of free and nanoliposome *Salix aegyptiaca* essential oil on the survival of *Bifidobacterium lactis* in probiotic ice cream

Amini, F, Moshtaghi H, Abbasvali M.17

The effect of chitosan-sodium alginate film containing citrus essential oil on the growth behavior of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in *Litopenaeus vannamei*

Gholami N, Laleh R, Mehrnosh T36

Investigating the protective effect of *Dracocephalum moldavica* L extract on induction of apoptosis and proliferation of *Leishmania major*

Karimi M, Tajbakhsh E, Momtaz H53

Evaluation of functional properties of phenolic compounds extracted from date palm (Phoenix on viability of selected probiotic bacteria dactylifera L.) pit in comparison to green tea extract

Moghadam M, Tadayoni M, Fazlara A.....74

میکروبی شناسی
مواد غذایی



INDEX  COPERNICUS
INTERNATIONAL

ICV score: 5.21