

اثرات اتوکلاو ، نمک و پروتئین ضد میکروبی در فعالیت های سماق ایرانی

چکیده

اگر چه بسیاری از ترکیبات در حال حاضر برای استفاده در غذایی به عنوان ضد میکروب تایید شده اند، تحقیق برای پیدا کردن تعداد بیشتری از این ترکیبات هنوز هم مدنظر است زیرا در حال حاضر بیشتر ضد میکروب های غذایی تایید شده دارای کاربردهای محدود ناشی از فعل و انفعالات ترکیب غذایی هستند. یافتن ضد میکروب های جدید غذایی نیاز به بررسی های پرهزینه دارد. عوامل سنتی گیاهی ضد میکروبی مانند سماق می توانند نقش مهمی را بازی نمایند. اگر رواج سماق در مرتبه عامل ضد میکروبی غذایی مورد تقاضا باشد ، ثبات و تعاملات آن ارزیابی شود. ارزیابی ثبات حرارتی سماق با اندازه گیری MICها و MBCها از عصاره در برابر برخی از این باکتریهای مرتبط با غذایی در وضعیت فوق العاده اتوکلاو انجام شده است. اجزای اصلی عصاره سماق ترکیبات جوهر مازو هستند. جوهر مازو دارای تعامل با نمک و پروتئین است، و آنها در چنین شرایطی ته نشین می شوند. فعالیتهای ضد میکروبی عصاره با روش انتشار در حضور نمک و پروتئین اندازه گیری شده و با عصاره خالص مقایسه شده است. نتایج نشان می دهد که سماق پایدار درمقابل حرارت است اما دارای تعاملاتی با نمک و پروتئین ها است که باعث کاهش فعالیت خود در مقابل باکتری های gram منفی می شود.

کلمات کلیدی : سماق ایرانی ، اتوکلاو ، فعل و انفعالات غذا ، حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ، حداقل غلظت

باکتری (MBC)

مقدمه

یکی از پیشرفت های مهمی در تاریخچه انسان، قابلیت حفظ غذایی و مهار فساد غذایی توسط تکنیک های حفظ، یعنی ضد میکروبهای غذایی است. ضد میکروبهای غذایی، ترکیبات افزوده شده یا موجود در غذا هستند که

که باعث تاخیر در رشد میکروبی و یا کشتن میکروارگانیسم ها می شوند. اگر چه بسیاری از ترکیبات در حال حاضر برای استفاده در غذایی به عنوان ضد میکروبها مورد تایید هستند، تحقیقات برای پیدا کردن تعداد بیشتری از این ترکیبات هنوز مدنظر است زیرا بسیاری از ضد میکروبها غذایی سنتی، در حال حاضر مورد تایید دارای کاربردهای محدود ناشی از تعاملات ترکیب غذایی هستند. تعامل با اجزای غذایی باعث کمتر در دسترس بودن ضد میکروبهای غذایی برای مهار میکروارگانیسمها محصولات غذایی می شود و یک عامل ضد میکروبی غذایی خوب باید حداقل چنین فعل و انفعالات باشد. ضمناً باید غیر سمی، غیر آلرژی زا، ارزان و پایدار در برابر فرآیندهایی باشد که در معرض آن است [1]. پیدا کردن ضد میکروبی غذایی نگهدارنده جدید با چنین ویژگی هایی نیاز به صرف وقت بسیار و هزینه زیاد دارد. به عنوان مثال، عامل ضد میکروبی غذایی جدید باید عبور به طور کلی از آزمایشات سم شناسی سخت تایید شده توسط سازمان های نظارتی بین المللی عبور نماید. مطالعات اخیر نشان داد که ضد میکروبهای گیاهی می تواند نقش مهمی بازی کنند. از آنجا که یکی از راه های نشان دادن غیر سمی بودن ضد میکروبها مصرف مداوم آنها به عنوان یک ماده غذایی در طی یک دوره طولانی است، ادویه جات می توانند کاندیداهای خوبی برای تحقیق در مورد ضد میکروبهای غذایی باشند [1]. سماق یک ادویه ایرانی است که بسیار در غذاهای ایرانی استفاده می شود. فعالیت های ضد میکروبی این ادویه در مطالعات قبلی ما گزارش شده است [2، 3]. اما اگر تقاضا به ارتقاء سماق به مرتبه عامل ضد میکروبی غذایی صورت گیرد، ثبات و تعاملات آن باید ارزیابی شود. این مطالعه سعی در ارزیابی پایداری اثرات ضد میکروبی سماق در طول اتوکلاو دارد. همچنین با توجه به این مسئله که بسیاری از محصولات غذایی دارای میزان کمتر یا بیشتر نمک و پروتئین هستند، این تحقیق به دنبال تعاملات ممکن از این اجزای سازنده با سماق است.

مواد و روشها

میکروارگانیسم ها و شرایط رشد

دو استاندارد gram-منفی و gram-مثبت و یک باکتری بالینی جدا شده مرتبط با مواد غذایی در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفته است. *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* 6539-P and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 در گروه کنترل دارویی و مواد غذایی، دانشکده

داروسازی ، علوم پزشکی / دانشگاه تهران وجود دارند در حالی که *Salmonella ty* یک کشتش بالینی جدا شده و شناسایی شده در آزمایشگاه کنترل میکروبیولوژیکی این بخش بود. کشت میکروب در آزمایشگاه مقدار باکتری در 20٪ گلیسرول پی بی اس (بافر فسفات سالین) در -70 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کشت فعال میکروب در آزمایشگاه توسط مایه کوبی 100 میکرولیتر از تعلیق موجودی میکروبی ذوب شده به 5 میلی لیتر از مواد مغذی (merck ، آلمان) توسط رشد نهفته شبانه در 37 درجه سانتی گراد تولید شد. کشت هماهنگ باکتریایی در آزمایشگاه با انتقال 100 میکرولیتر از سلول های گیاهی به Muller Hinton broth رشد نهفته به مدت 24 ساعت و در 37 درجه سانتیگراد آماده سازی شد. سلول ها با سانتریفوژ در 1600g به مدت 10 دقیقه ، با PBS شسته شده، چرخش دوباره در 1600g و رقیق شده در آب مقطر برای دست آوردن cfu/ml برآورد شده برداشت شدند [4].

آماده سازی نمونه

سماق ایرانی است که در پوسته خارجی *Rhus coriaria L* وجود دارد در بازار داخلی به دو صورت قهوه ای (رسیده) قرمز و قهوه ای (نیمه رسیده) قابل دسترسی می باشد. سماق رسیده قهوه ای مورد استفاده در این مطالعه خریداری شده از بازار گیاه شناسی محلی است و توسط گیاهدان دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (TEH) از مجموعه گیاهان خشک شناسایی شده است. عصاره آب نمونه با استفاده از روش لاغری با استفاده از آب استریل 40 درجه سانتی گراد آماده شده است. عصاره در تبخیرکننده خلاء دوار قرار گرفته است (Buchi, Switzerland) و با رشد نهفته در 40 درجه خشک شده است.

تعیین ثبات در اتوکلاو

500 میلی گرم عصاره خشک سماق آب مقطر استریل در غلظت 50 درصد رقیق شده است (w/v). عصاره تقسیم به دو بخش شد. یک بخش فیلتر شده استریل و دیگری در وضعیت اتوکلاو (121 درجه و 1 اتمسفر) برای 15 دقیقه قرار گرفت. برای تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)، رقت نمونه های بین 0.03 تا 3.75 درصد در Muller Hinton broth آماده شدند. غلظت نهایی باکتریهای موجود در لوله های منفرد cfu/ml

بود. لوله های کنترل حاوی هیچ عصاره ای نبودند. پس از رشد نهفته در 37 درجه سانتی گراد، لوله های آزمایش برای رشد ممکن مورد بررسی قرار گرفتند و MIC هر قسمت از عصاره به صورت کمترین غلظت تعیین شد که با هیچ رشدی پایان نمی یافت. لوله های حاوی غلظت بالا، MICها در صفحات Muller hinton برای به دست آوردن مینیمم غلظت های باکتریایی (MBC) برای نمونه های منفرد در مقابل کشش های آزمایش شده گسترده می شدند.

تعیین اثر متقابل ممکن با نمک و ژلاتین

اجزای اصلی عصاره سماق ترکیبات جوهر مازو هستند. جوهر مازو دارای فعل و انفعالات با نمک و پروتئین است [5]. به منظور ارزشیابی اثر این فعل و انفعالات در فعالیت های ضد میکروبی عصاره، 1 میلی گرم از عصاره سماق (20 درصد) به 2 میلی گرم محلول ژلاتین (1 درصد) یا محلول سالیسین (10 درصد) به طور جداگانه اضافه شد و نتیجتاً به طور تقریبی تمام ترکیبات جوهر مازوی عصاره به شکل رسوب جدا شدند. بعد از سانتریفیوژ در 10 دقیقه در 5000g، 100 میکرولیتر جوهر مازو شفاف شناور بر روی اب با روش انتشار در ازای *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* آزمایش شد. بعد از رشد نهفته در شب در 37 درجه، نواحی ممانعت حول چاه ها بر حسب میلی متر با استفاده از یک ک.لیس اندازه گیری شدند.

نتایج

تعیین پایداری فعالیت ضد میکروبی سماق در دمای بالا از طریق ارزشیابی MIC و MBC برای عصاره قبل و بعد از اتوکلاو انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت ضد میکروبی عصاره سماق در تمام باکتری های آزمایش به جز *P. aeruginosa* پایدار و مقاوم در برابر گرما است (جدول 1).

جدول 2 اثر تعامل سماق/غذا را در فعالیت ضد میکروبی عصاره نشان می دهد. تامل سماق/غذا دارای هیچ اثر مخربی روی فعالیت های مثبت ضد gram نیست بر خلاق اثر مخرب ان روی فعالیت های منفی ضد gram ان.

بررسی

به طور ایده آل، یک محافظ میکروبی خوب باید دارای فعالیت ضد میکروبی قوی، هیچ گونه تعامل با اجزای غزل، هیچ اثر منفی روی مزه غذا و ظاهر آن باشد و نیز باید غیر سمی، غیرالرژی زا، ارزان و پایدار در مقابل فرایندهایی باشد که در معرض آن ها قرار گرفته است [1].

اثر ضد میکروبی عصاره سماق در مطالعات قبلی ما ارزیابی شده است [2,3]. در این بررسی، پایداری اثر ضد میکروبی عصاره سماق در مدت دمای بالا با استفاده از شرایط فوق العاده اتوکلاو ارزیابی شد. نتایج نشان می داد که فعالیت ضد میکروبی عصاره سماق در تمام باکتری های آزمایش به جز *P. aeruginosa* پایدار و مقاوم در برابر گرما است (جدول 1).

جدول ۱. فعالیت ضد میکروبی سماق قبل و بعد از اتوکلاو

	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. typhi</i>	
	MIC ^a	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
قبل از اتوکلاو	0.10	0.95	0.45	0.95	0.45	0.95	0.45	0.95
بعد از اتوکلاو	0.10	0.95	0.45	0.95	0.95	0.95	0.45	0.95

نتایج بر حسب درصد (w/v) نشان داده شده اند.

جدول ۲. اثر تعامل سماق/غذا در فعالیت ضد میکروبی سماق

	عصاره	عصاره + ژلاتین	عصاره + نمک	ژلاتین	نمک	رسوب
<i>S. aureus</i>	21 ^a	21	21	---	---	12
<i>P. aeruginosa</i>	20	14	16	---	---	10

نتایج ناحیه ممانعت بر حسب میلی متر نشان داده شده اند.

این عصاره بسیار مهم است زیرا استفاده از ترکیب تکنیک های حفاظتی معمول است و بنابراین عصاره می تواند در ترکیب با روشهای گرمایی استفاده شود. علاوه بر این ادویه جات معمولاً دارای بار میکروبی هستند اگر بالا باشند، نمونه ها باید به جای ضد میکروبیهای غذایی به عنوان منبع الودگی در نظر گرفته شوند. مانند دیگر ادویه جات، سماق دارای بار میکروبی است و با حذف الودگی ها، اتوکلاو، ایمنی استفاده از سماق را در فرایندهای غذایی تضمین خواهد نمود [6].

هدف دیگر این مطالعه ارزیابی اثر معکوس ممکن تامل غذا/سماق در فعالیت های ضد میکروبی عصاره سماق بود. ترکیبات مهم سماق، جوهر مازو، دارای تعاملاتی با نمک و پروتئین است که نمک را از لحاظ بیولوژیک غیرفعال

می سازد [5]. همانگونه که در جدول 2 ذکر شده است، تعاملات دارای هیچ اثر مخربی روی فعالیتهای مثبت ضد میکروبی عصاره نیستند بر خلاف اثر مخرب روی فعالیت های منفی ضد gram. کاهش فعالیت های منفی ضد gram برای سماق، یک نقطه فقدان است زیرا اغلب باکتری های زاده شده در غذا منفی gram هستند. بررسی های بیشتر روی اثر تعامل سماق/غذا در فعالیت های ضد میکروبی عصاره سماق پیشنهاد می شود. برای ارزیابی اثر تعامل، این مطالعه به آزمایشات اولیه ضد میکروبی (روش انتشار) اکتفا می کند زیرا آزمایشات کمی بیشتر مانند تعیین MIC برای عصاره دارای جوهر مازوی کمتر قابل مقایسه با عصاره دارای جوهر مازوی MIC نبودند، به علت تغییر در نسبت بعد از جداسازی جوهر مازوها.

مطابق با نتایج، برخلاف سماق صاف، (*Rhus glabra* L.)، یک نمونه مشابه، ترکیبات بدون جوهر مازو می توانند پاسخگوی برخی از فعالیت های ضد میکروبی سماق ایرانی باشند [7] (*Rhus coriaria* L.). کاهش فعالیت عصاره در مقابل *P. aeruginosa* نشان می دهد که ترکیبات جوهر مازو می توانند مرتبط با فعالیت های منفی ضد gram برای سماق باشند.

در کنار تمام مزیت های و نقایص ضد میکروبی، سماق دارای برخی مشخصات دیگر است. می تواند مزه و ظاهر محصولات غذایی را بهبود بخشد. به عنوان یک نماینده، در غذای ایرانی، سماق به عنوان افزودنی طعم و رنگ استفاده می شود. علاوه بر این، برخی از مطالعات اثرات آنتی اکسیدان سماق [8,9] را نشان داده است. بررسی های بیشتر در مورد توانایی سماق به عنوان یک افزودنی محافظ غذایی یکی از کارهای آینده ما خواهد بود.

References

1. Davidson PM and Zivanovic S. The use of natural antimicrobials. In: Zeuthen P and Bogh-Sorensen L. *Food preservation techniques*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. 2003, pp: 5- 30.
2. Fazeli MR, Amin Gh, Ahmadian Attari MM, Ashtiani H, Jamalifar H. Antimicrobial effects of five Iranian popular plants on some intestinal bacteria. *IJPR*. 2004; 3 (supplement 2): 200.
3. Fazeli MR, Amin Gh, Ahmadian Attari MM, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi, N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 2007; 18: 646 – 49.
4. Swanson KMJ, Busta FF, Peterson EH, and Johnson MG. Colony count methods. In: Vanderzant C and Splitstoesser DF. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed. American public Health Association. Washington DC. 1992, pp: 75 – 95.
5. Robinson T. The organic constituents of higher plants. 5th ed. Cordus Press. North Amherst. 1983, p: 72.
6. Imandel K, Adibnia H. Microbial contamination of spices (Turmeric, black pepper and Sumac) in western part of Tehran. *Iranian Journal of Public Health*. 2000; 29: 37 - 44. (Persian Article).
7. Saxena G, McCutcheon AR, Farmer S, Towers GHN. Hancock, R. E. W. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *J Ethnopharm*. 1994; 42: 95 - 9.
8. Ozcan M. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *J Med Food*. 2003; 6: 267 - 70.
9. Ozcan M. Effect of sumach (*Rhus coriaria* L.) extracts on the oxidative stability of peanut oil. *J. Med. Food*. 2003; 6: 63 - 6.