ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۹، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۳(شماره پی در پی ۱۶۲)

مقاله پژوهشی

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری(*Rosmarinus officinalis* L.) و کاربرد آن در شیر پاستوریزه

زهرا ایزدی[1*]، علیرضا ترابی[2]

[1]گروه علوم و مهندسی باغبانی، مجتمع آموزش عالی نهاوند، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، [2]گروه نورولوژی، بیمارستان بعثت، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: شیر، فرآورده لبنی است که به آلودگی به وسیله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فسادزا حساس است. یکی از راه‌های کنترل رشد این باکتری‌ها، استفاده از نگهدارنده‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی است. با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، تمایل به مصرف محصولاتی است که از نگهدارنده طبیعی استفاده شده است. محصولات طبیعی فرصت‌های نامحدودی برای مواد افزودنی جدید و مناسب فراهم می‌کند. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری(*Rosmarinus officinalis* L.) و کاربرد آن در شیر پاستوریزه بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۱ در مجتمع آموزش عالی نهاوند انجام گرفت. سنجش میزان ترکیبات فنولی عصاره با روش فولین سیوکالتو انجام شد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره نیز با آزمون مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل‌پیکریل هیدرازیل مورد بررسی قرار گرفت و با آنتی‌اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول مقایسه شد. اثر ضدمیکروبی عصاره رزماری روی باکتری‌های مذکور به روش چاهک در آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مقدار فنول اندازه‌گیری شده عصاره این گیاه برابر ۰/۳۵±۹۶/۴۷ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره بود. عصاره رزماری بیشترین تأثیر را بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشت. محدوده حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره اتانولی این گیاه بین ۱۲/۵۰-۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بسته به نوع باکتری(گرم مثبت یا گرم منفی) متفاوت بود. هم‌چنین تیمار شیر با غلظت ۰/۵ درصد، ضمن داشتن خصوصیات حسی قابل قبول، به طور معنی‌داری جمعیت میکروبی پایین‌تر و زمان ماندگاری طولانی‌تری در مقایسه با نمونه شاهد داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که عصاره هیدرواتانولی رزماری تأثیر بسزایی بر جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد دارد، در نتیجه می‌توان از این عصاره به عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی در شیر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، رزماری، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، فنول، هاله عدم رشد

[*]**نویسنده مسئول: زهرا ایزدی،** همدان، دانشگاه بوعلی‌سینا، مجتمع آموزش عالی نهاوند، گروه علوم و مهندسی باغبانی
Email: z.izadi@basu.ac.ir

مقدمه

فرآورده‌های لبنی در طی مراحل تولید، عرضه و نگهداری تا انقضای مصرف در اثر عدم رعایت اصول بهداشتی به وسیله میکروارگانیسم‌ها آلوده می‌شوند. در صورت نگهداری طولانی مدت لبنیات اهمیت بررسی فساد میکروبی بیشتر آشکار می‌شود(۱). محصولات لبنی هم‌چون شیر برای حفظ زندگی بهتر در طولانی مدت باید مورد استفاده قرار گرفته و دارای اثرات مفید برای حفظ سلامتی و فرآیندهای فیزیولوژیکی در تغذیه کودکان و افراد مسن می‌باشد. از آنجایی که شیر مایع بسیار فسادپذیری است نیاز به تیمار برای ماندگاری بیشتری دارد(۲). فساد باکتریایی مهمترین عامل محدود کننده عمر ماندگاری شیر پاستوریزه می‌باشد. متابولیسم و رشد میکروب‌ها به دلیل اثرات نامطلوبی که دارند، زمان نگهداری شیر را بسیار کوتاه می‌کنند(۱). کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی از نظر قوانین استاندارد کیفی مواد غذایی و هم‌چنین از نظر بهداشت و سلامت عمومی حایز اهمیت فراوان است. استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به دلیل کنترل رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از عمل اکسیداسیون(فساد شیمیایی) نقش به سزایی در افزایش پایداری و ماندگاری محصولات غذایی دارد. از سویی دیگر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند؛ بوتیل‌هیدروکسی آنیزول[۱]، بوتیل‌هیدروکسی تولوئن[۲] و تری‌بوتیل هیدروکینون[۳] در صنایع داروسازی، پزشکی و غذایی بسیار رواج یافته است(۳). با این حال اثرات نامطلوب تغذیه‌ای و سمیت این آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است. به همین دلیل یافتن ترکیبات دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و فعالیت ضدمیکروبی با منشا طبیعی(اسانس و عصاره گیاهی) شدیداً مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این ترکیبات که به صورت طبیعی در بافت‌های گیاهی وجود دارند، احتمالاً به عنوان بخشی از مکانیسم‌های دفاعی خود در برابر هجوم میکروبی تولید شده‌اند(۴). ترکیبات ضدمیکروبی با منبع گیاهی، توان بالقوه درمانی داشته و نه تنها در درمان بیماری‌های عفونی مؤثر هستند، بلکه تعداد زیادی از عوارض جانبی را که اغلب با ترکیبات ضدمیکروبی مصنوعی همراه است را کاهش می‌دهند(۵).[۱۰]

خوشبختانه سرزمین ایران به دلیل شرایط آب و هوایی مختلف دارای طیف وسیعی از گیاهان دارویی می‌باشد و ایرانیان از دیر باز علاقمند به استفاده از ترکیبات طبیعی دارویی بوده‌اند. خواص دارویی و درمانی گیاهان به نوع و میزان ترکیبات مؤثره آن‌ها بستگی دارد. مواد مؤثره موجود در گیاهان به طور اساسی با هدایت فرآیندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، اما عوامل محیطی مانند شرایط آب و هوایی و هم‌چنین سن و مراحل رشد گیاه، زمان برداشت، روش خشک کردن و استخراج عصاره نیز باعث تغییرات کمی و کیفی در مواد مؤثره می‌شود(۶).

1-Butylated hydroxy anisole(BHA)
2-Butylated hydroxy toluene(BHT)
3-Tertiary butylhydroquinone(TBHQ)

بهره‌گیری از روش‌های نوین، امکان شناسایی مواد مؤثره درمان‌گر موجود در گیاهان را فراهم کرده است، لذا در سال‌های اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای جهت بررسی و ارزیابی اثرات ضدمیکروبی فرآورده‌هایی با منشا گیاهی از جمله عصاره‌ها و اسانس‌ها صورت گرفته و نتایج بیانگر قدرت و توانایی این ترکیبات در ممانعت از رشد دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌باشد(۷). رزماری[۱] از خانواده نعناعیان[۲] می‌باشد. این گیاه دارویی چوبی، معطر و همیشه سبز با برگ‌هایی سوزنی شکل و گل‌های سفید، صورتی، بنفش یا آبی است. وجود ترکیبات اسید کارنوسیک[۳] و اسید رزمانیک[۴] باعث خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای این گیاه شده است(۸)، لذا از این گیاه به منظور افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی و جلوگیری از فرآیند اکسیداسیون ترکیبات غذایی استفاده می‌گردد. سایر ترکیبات موجود در برگ و سرشاخه‌های گلدار رزماری شامل؛ فلاونوئیدها، اسیدهای فنولی، دی‌ترپن‌ها، تری‌ترپن‌ها، تانن‌ها، مواد تلخ، رزین و ساپونین است(۱۰ و ۹). اسانس و عصاره این گیاه برای ساختن داروهایی مانند؛ ضد التهاب، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم و ضد دیابت استفاده می‌شود(۱۱). وجود ترکیبات ضدمیکروب متعدد رزماری را به یک ترکیب ضد میکروب و مقبول در مواد غذایی معرفی می‌کند(۱۲). نیتو و همکاران اثرات ضدمیکروبی عصاره رزماری را مورد بررسی و تأیید قرار دادند(۱۳). مانیلال و همکاران اثر عصاره رزماری را روی استافیلوکوکوس اورئوس و سانمونلا مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که عصاره اتانولی رزماری توانسته است در شرایط آزمایشگاهی از رشد این باکتری جلوگیری کند(۱۴). از آنجا که عصاره‌ها می‌توانند ویژگی‌های حسی مواد غذایی را تحت تأثیر قرار بدهند، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[۵] و حداقل غلظت کشندگی[۶] آن‌ها به منظور به حداقل رساندن آن‌ها در مواد غذایی(تأثیر کمتر بر ویژگی‌های حسی) و هم‌چنین از بین بردن میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت غذایی مورد توجه می‌باشد.[۱۰]

با توجه به این که تاکنون در مورد خواص ضدمیکروبی عصاره رزماری در رویشگاه نهاوند و کاربرد آن در شیر گزارشی ارایه نشده است و از طرفی به دلیل سهل‌الوصول و ارزان بودن این گیاه و هم‌چنین مصرف دارویی آن از زمان‌های دور، این تحقیق می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از عصاره این گیاه در صنایع دارویی و غذایی باشد. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری(*Rosmarinus officinalis* L.) و کاربرد آن در شیر پاستوریزه بود.

1-*Rosmarinus officinalis* L.
2-Lamiaceae
3-Carnosic acids
4-Acids rosmanic
5-Minimum inhibitory concentration
6-Minimum bactericidal concentration

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد، برگ‌های گیاه رزماری در شهریور ماه ۱۴۰۱ از مزرعه تحقیقاتی مجتمع آموزش عالی نهاوند برداشت شد. نمونه تهیه شده در هرباریوم گروه علوم و مهندسی باغبانی مجتمع آموزش عالی نهاوند نیز تأیید شد و از گیاه رزماری یک نمونه با شماره ۳۱۱۵۳ در هرباریوم نگهداری گردید. بعد از انتقال برگ‌ها به آزمایشگاه کشاورزی جهت رفع گرد و غبار برگ‌ها با آب سرد به صورت سطحی شسته شد و سپس به مدت ۴ روز در سایه خشک گردید. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون انجام شد. بدین منظور برگ‌های خشک شده این گیاه به وسیله آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید. پودر درون بشر شیشه‌ای ریخته شد و به آن به میزان ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت بر دستگاه شیکر بهسان مدل RT305 در دمای اتاق(۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. بعد از این مدت، ابتدا مخلوط حلال و گیاه از پارچه تمیز توری عبور داده شد و بقایای گیاه پس از چند مرحله فشردن و اطمینان از استخراج کامل دور ریخته شد. مخلوط عصاره و حلال از کاغذ صافی عبور داده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ کاوش مگا مدل SDC شد. جهت حذف حلال اتانول مخلوط به دستگاه روتاری بوچی مدل R-100 منتقل شده و در نهایت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک گردید. عصاره رزماری به وسیله کاردک به طور دقیق تراشیده و درون ظرف شیشه‌ای تیره رنگ در یخچال نگهداری گردید(۱۵).

مقدار ۵۰ میلی‌گرم عصاره را با ۱ میلی‌لیتر متانول مخلوط کرده و ۵۰ میکرولیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ترکیب شد. محلول فوق به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم به آن افزوده و میزان جذب در طول موج ۷۳۵ نانومتر قرائت شد(۱۶). منحنی استاندارد با استفاده از گالیک اسید در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام تهیه و میزان جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت گردید. سپس منحنی استاندارد رسم و مورد استفاده قرار گرفت(۱۷). [۰۱]

اندازه‌گیری توانایی عصاره رزماری در مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱ـ پیکریل هیدرازیل (DPPH)[1] به این صورت انجام شد که ابتدا محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف(۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) از عصاره آماده شدند، سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۷ میلی‌لیتر از محلول متانولی DPPH به شدت مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در مکانی تاریک نگهداری کرده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد(۱۸). از آنتی اکسیدان سنتزی بوتیل هیدروکسی آنیزول(BHA) جهت مقایسه استفاده گردید. در نهایت درصد مهارکنندگی

1-2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)

رادیکال‌های آزاد DPPH طبق فرمول زیر محاسبه شد:

درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH = $(A_c - A_s) / A_c \times ۱۰۰$

در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب شاهد و جذب نمونه می‌باشد. سپس با رسم منحنی درصد مهار در مقابل غلظت‌های مختلف عصاره، مقدار IC_{50}[۱] (غلظتی از سوبسترا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای کاهش DPPH به میزان ۵۰ درصد اولیه مورد نیاز است) برای عصاره تعیین شد(۱۹).

از عصاره‌های حاصله به وسیله حلال دی‌متیل‌سولفواکسید(DMSO)[۲] ۰/۵ درصد، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد و در آزمون‌های انتشار چاهک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی از آن‌ها استفاده گردید. سویه‌های میکروبی استاندارد به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. سویه‌های میکروبی شامل دو سویه گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC 25923) و لیستریا اینوکوا(ATCC 33090) و دو سویه گرم منفی اشرشیاکلی(ATCC 25922) و سودوموناس ائروژینوزا(ATCC 27853) بودند. نمونه‌های میکروبی بر اساس روش‌های استاندارد از حالت لیوفیلیزه خارج گردیدند. به منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی از کشت تازه و جوان باکتری چند کلنی به محیط کشت مولر هینتون براث منتقل شد تا کدورت حاصله مشابه کدورت لوله ۰/۵ مک فارلند باشد(۲۰).

بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری به دو روش انجام شد، ابتدا از روش انتشار چاهک در آگار استفاده گردید. برای این منظور از سوش‌های یاد شده با کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و به روش معمول در پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار گسترش داده شد. در مرحله بعدی در سطح پلیت، چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌لیتر و به فاصله ۲ سانتی‌متر از هم ایجاد گردید. هر یک از چاهک‌ها را به وسیله رقت‌های مایع مختلفی از عصاره که در ابتدا به آن‌ها اشاره شده است پر شد. به عنوان شاهد مثبت آزمایش از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با توجه به حلالیت در حلال‌های مختلف در نرمال سالین ۰/۹ درصد رقیق و غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شده است و به عنوان شاهد منفی از DMSO استفاده شد. بعد از اتمام کار، تمامی محیط کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت این مدت، کشت‌های باکتریایی از نظر تشکیل یا عدم تشکیل هاله رشد بر حسب میلی‌متر توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد(۲۲ و ۲۱). [۰.۱]

در روش دوم جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از عصاره تهیه شده، سری رقت‌های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد(۲۳). برای این منظور ابتدا یک سری ده

1-The half maximal inhibitory concentration (IC_{50})
2-Dimethyl sulfoxide(DMSO)

تایی از لوله‌های استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل برداشته و شماره گذاری شد. به وسیله سمپلر ۱ میلی‌لیتر از استوک اولیه تهیه شده از عصاره تهیه شده برداشت و به لوله اول اضافه شد. سپس محلول داخل لوله به وسیله ورتکس به طور کامل مخلوط گردید و ۱ میلی‌لیتر از مخلوط لوله اول برداشته و به لوله دوم اضافه شد، به همین ترتیب تا لوله شماره اخر پیش رفت. در نهایت ۱ میلی‌لیتر از محلول لوله اخر برداشته و دور ریخته شد. به این ترتیب تمام لوله‌ها حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول بوده، با این تفاوت که یک شیب غلظت از لوله اول به سمت لوله آخر ایجاد شد که رقت دارو در آن رو به کاهش است و هر لوله حاوی نصف رقت دارو در لوله قبلی بود(۲۳). به عنوان شاهد مثبت لوله‌ای با محتویات(محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و به عنوان شاهد منفی لوله‌ای با محتویات(محیط کشت بدون باکتری) نیز تهیه شدند. بعد از اتمام کار، تمام لوله‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ـ۲۴ انتقال داده شدند(۲۴).

به علت رنگی بودن عصاره، خواندن حداقل غلظت بازدارندگی ممکن نیست و برای رفع این مشکل از تمام لوله‌های تلقیح شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به روش پور پلیت پخش گردید، سپس پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند تا بعد از ۲۴ ساعت نتایج خوانده شود. پس از یک شب انکوباسیون، تعداد کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌ها شمارش و با هم مقایسه گردید. پلیتی که دارای کمترین غلظت از عصاره بوده و تعداد کلنی‌های کمتری نسبت به سایرین دارد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و پلیتی که حاوی کمترین غلظت از عصاره بوده و کلنی در آن رشد نکرده به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد(۲۵).

به منظور ارزیابی اثر نگهدارندگی عصاره هیدرواتانولی رزماری بر ماندگاری شیر، ابتدا عصاره این گیاه با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ درصد حجمی/حجمی به شیر پاستوریزه افزوده شد. هم‌چنین یک نمونه شیر فاقد عصاره به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. سپس نمونه‌های شیر حاوی عصاره با شیر شاهد(فاقد عصاره) مورد مقایسه قرار گرفت. دمای نگهداری شیرها ۴ درجه سانتی‌گراد بود و بررسی تغییرات میکروبی در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت روی نمونه‌های مذکور صورت گرفت(۲۶). شمارش کلی باکتری نمونه‌های شیر با استفاده از روش پورپلیت و محیط کشت نوترینت آگار انجام پذیرفت و نتایج بر اساس لگاریتم تعداد کلنی بر میلی‌لیتر گزارش شد(۲۷).

ویژگی‌های حسی نمونه‌های شیر در زمان صفر با استفاده از یک گروه ارزیاب ۱۲ نفره آموزش دیده مورد ارزیابی قرار گرفت. به این صورت که آن‌ها به ویژگی‌های مورد بررسی یعنی آروما، رنگ، مزه و قابلیت پذیرش با استفاده از سیستم نمره‌دهی هدونیک ۵ نقطه‌ای ۵(عالی)، ۴(خوب)، ۳(نه خوب نه بد)، ۲(بد) و ۱(بسیار بد) امتیاز دادند(۲۸).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و آزمون آماری دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

محتوی فنول اندازه‌گیری شده عصاره هیدرواتانولی رزماری ۰/۳۵±۹۶/۴۷ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره بود. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره این گیاه به روش DPPH انجام شد و IC_{50} برای عصاره مورد نظر برابر با ۷۹/۷۶±۱۱/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که در مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA(۱۶/۲۹±۱۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ضعیف‌تر بود. هم‌چنین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره این گیاه در غلظت‌های مختلف(۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) تعیین گردید. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره رزماری همانند افزایش غلظت BHA میزان مهار رادیکال‌های آزاد نیز افزایش یافت و تفاوت آن(به غیر از غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره) با BHA معنی‌دار بود($p<0/05$). بیشترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام برابر با ۸۴/۲۵ درصد و کمترین قدرت مهارکنندگی برابر با ۱۲/۵۶ درصد، در غلظت ۳۱/۲۵ پی‌پی‌ام حاصل گردید(شکل ۱).

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی گیاه رزماری به روش انتشار چاهک بر باکتری‌های مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره هیدرواتانولی این گیاه در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر باکتری‌های گرم مثبت(استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا) کاملاً مؤثر بود، اما تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی(اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا) نداشت و نتوانست از رشد این باکتری‌ها بر روی محیط کشت جلوگیری کند(جدول ۱). در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدرواتانولی رزماری برای تمامی میکروارگانیسم‌ها هاله عدم رشد مشاهده شد. هم‌چنین مشخص گردید که قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در اطراف دیسک برای باکتری‌های گرم مثبت بزرگتر از باکتری‌های گرم منفی بود. با افزایش غلظت عصاره رزماری در تمامی باکتری‌ها قطر هاله عدم رشد افزایش یافت، به طوری که قطر هاله مشاهده شده در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای تمامی سویه‌های میکروبی بیشترین بود. در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این گیاه، بیشترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلوکوکوس ارئوس با قطر ۰/۹۵±۲۰/۲۰ میلی‌متر حاصل شد. در همین غلظت کمترین قطر هاله عدم رشد نیز متعلق به باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر ۰/۲۵±۱۰/۷۰ میلی‌متر بود. در باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و لیستریا اینوکوا غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره این گیاه اثر بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بود. نتایج آزمون آماری و مقایسه دوتایی میان غلظت‌های مختلف

عصاره هیدرواتانولی رزماری نشان داد که به غیر از غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری‌های اشرشیاکلی و سودوموناس ائروژینوزا در سایر غلظت‌های عصاره مورد بررسی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد($p<0/05$).

جدول ۱، حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل علظت کشندگی(MBC) عصاره هیدرواتانولی رزماری را علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد. در بین باکتری‌های مورد بررسی، استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین حساسیت و سودوموناس آئروژینوزا کمترین حساسیت را در برابر عصاره این گیاه نشان دادند.

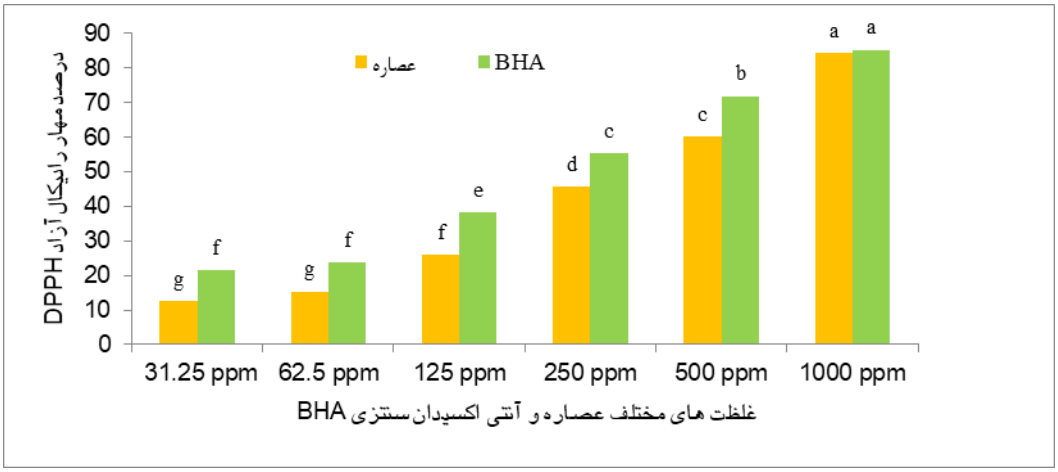
نتایج آنالیز میکروبی در نمونه‌های شیر تیمار شده در سه غلظت ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد از عصاره هیدرواتانولی رزماری به همراه نمونه شاهد در شکل ۲ نشان داده شده است.

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف کوچک مشترک بین ساعت‌های مختلف هر تیمار بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف بزرگ مشترک بین ساعت‌های یکسان تیمارهای مختلف بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

همان طور که مشاهده می‌شود کلیه غلظت‌های مورد استفاده عصاره این گیاه با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت و بیشترین اختلاف مربوط به نمونه حاوی غلظت ۰/۷۵ درصد از عصاره رزماری بود($p<0/05$). هم‌چنین مشخص شد که غلظت‌های به کار رفته عصاره هیدرواتانولی رزماری نیز با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند، به طوری که کمترین شمارش میکروبی نیز در تیمار ۰/۷۵ درصد از عصاره این گیاه مشاهده شد ($p<0/05$). در تیمارهای شاهد و ۰/۲۵ درصد با گذشت زمان شمارش کلی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد، اما غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد توانستند جلوی رشد میکروب‌ها را بگیرند.

نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های شیر حاوی عصاره هیدرواتانولی رزماری و شاهد در جدول ۲ نشان داده شده است. در مورد ویژگی‌های مزه و بو بیشترین و کمترین امتیاز به ترتیب مربوط به نمونه‌های شاهد و حاوی ۰/۷۵درصد عصاره بود. در مورد رنگ نیز کمترین امتیاز مربوط به نمونه حاوی ۰/۷۵ درصد بود و بین نمونه‌های شاهد و ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد($p>0/05$). در کل از نظر مطلوبیت کلی، افراد ارزیاب به نمونه‌های حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره هیدرواتانولی رزماری کمترین امتیاز را داده، ولی بین نمونه‌های حاوی ۰/۲۵ و ۰/۵ درصد عصاره با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری قائل نشدند($p>0/05$).



شکل ۱: مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری و آنتی‌اکسیدانBHA در غلظت‌های مختلف

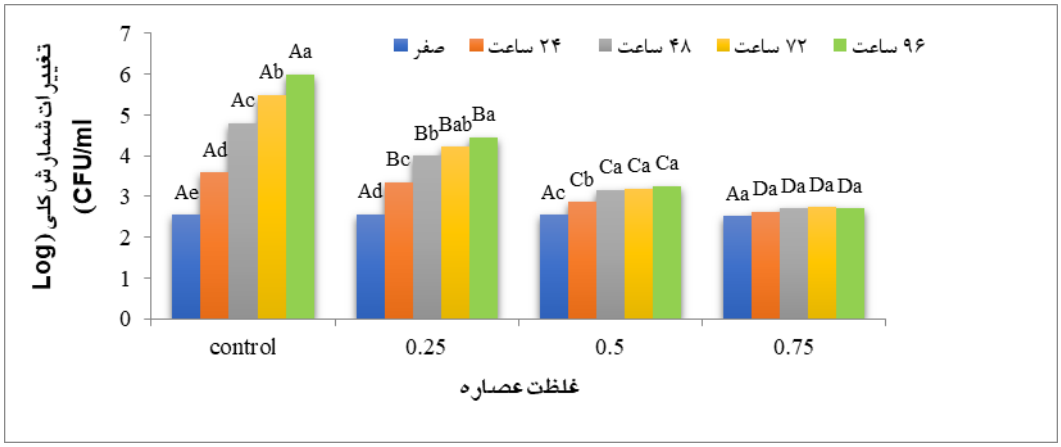
حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشند.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل علظت کشندگی (MBC) بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدرواتانولی رزماری بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

میکروارگانیسم	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)					حداقل غلظت رشد		
	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	استرپتومایسین	DSMO	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	۹/۰±۳۰/۳۲^{a*}	۱۵/۰±۷۰/۱۵^{b}	۱۸/۰±۶۰/۱۳^{c}	۲۰/۰±۲۰/۹۵^{d}	۱۹/۰±۳۰/۳۵^{d}	–	۱۲/۵	۲۵
لیستریا اینوکوا	۸/۰±۸۰/۲۰^{a}	۱۴/۰±۵۰/۲۲^{b}	۱۶/۰±۴۰/۲۰^{c}	۱۹/۰±۷۰/۵۱^{d}	۱۸/۰±۹۰/۷۲^{d}	–	۱۲/۵	۵۰
اشرشیاکلی	–**	۱۲/۰±۲۰/۵۰^{a}	۱۲/۰±۴۰/۳۵^{a}	۱۴/۰±۵۰/۵۰^{b}	۱۵/۰±۶۰/۰۰^{c}	–	۲۵	۵۰
سودوموناس آئروژینوزا	–	۸/۰±۷۰/۳۰^{a}	۹/۰±۰۰/۵۵^{a}	۱۰/۰±۷۰/۲۵^{b}	۱۵/۰±۱۰/۹۵^{c}	–	۵۰	۱۰۰

*در هر ردیف میانگین‌های قطر هاله عدم رشد که دارای حروف مشابه هستند بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

**علامت (–) نشان دهنده عدم وجود فعالیت ضد میکروبی می‌باشد.



شکل۲: تغییرات در شمارش کلی نمونه‌های شیر حاوی غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی رزماری طی مدت ۹۶ ساعت

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف کوچک مشترک بین ساعت‌های مختلف هر تیمار بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف بزرگ مشترک بین ساعت‌های یکسان تیمارهای مختلف بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار هستند.

جدول ۲: نتایج آزمون حسی نمونه‌های شیر حاوی غلظت‌های مختلف عصاره هیدرواتانولی رزماری

غلظت عصاره(درصد)	ویژگی‌های حسی			
	مزه	بو	رنگ	مطلوبیت کلی
۰/۲۵	۳/۷^{b}	۳/۵^{b}	۴/۵^{a}	۴/۱^{a}
۰/۵	۳/۵^{b}	۳/۴^{b}	۴/۲^{a}	۴^{a}
۰/۷۵	۲/۴^{c}	۲/۳^{c}	۳^{b}	۳/۲^{b}
شاهد	۴/۵^{a}	۴/۷^{a}	۴/۹^{a}	۴/۷^{a}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند

بحث

وجود خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدعفونی کنندگی علاوه بر اثرهای درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است(۲۸). وجود ترکیب‌های ثانویه در گیاهان دارویی سبب شده که در بررسی‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به خود جلب کنند. به ویژه وجود ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی موجود در گیاهان دارویی اهمیت این گیاهان را برای تولید پادزیست‌های طبیعی و جدید در علوم پزشکی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی دو چندان ساخته است. بنابراین دانشمندان تحقیق‌هایی بر روی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی، برای کشف داروهای جدید با منشأ گیاهی را در اولویت قرار داده‌اند(۲۸)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری(*Rosmarinus officinalis* L.) و کاربرد آن در شیر پاستوریزه بود.

وجود خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدعفونی کنندگی علاوه بر اثرهای درمانی از عوامل توجه طب سنتی به گیاهان دارویی در سال‌های اخیر بوده است(۲۹). وجود ترکیب‌های ثانویه در گیاهان دارویی سبب شده که در بررسی‌های اخیر توجه ویژه‌ای را به‌خود جلب کنند. به‌ویژه وجود ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی موجود در گیاهان دارویی اهمیت این گیاهان را برای تولید پادزیست‌های طبیعی و جدید در علوم پزشکی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنایع غذایی دو چندان ساخته است. بنابراین دانشمندان تحقیق‌هایی بر روی قسمت‌های مختلف گیاهان دارویی، برای کشف داروهای جدید با منشا گیاهی را در اولویت قرار داده‌اند(۲۹).

ترکیبات فنولی موجود در بخش‌های مختلف گیاه دارای اثرات مفیدی در سلامت انسان بوده و در بهبود پایداری مواد غذایی نقش دارند(۳۰). در این تحقیق میزان فنول کل عصاره هیدرواتانولی رزماری ۹۶/۰±۴۷/۳۵ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره تعیین شد. صحراییان و همکاران محتوای فنولی عصاره برگ رزماری را ۵۹/۱۴ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم عصاره گزارش نمودند(۱۴)، که به مراتب از عصاره هیدرواتانولی این گیاه کمتر بود. نوع نمونه، نوع حلال و دمای به کار گرفته شده برای استخراج در میزان ترکیبات فنولی نقش دارند. هم‌چنین تفاوت‌های اکولوژی گیاه از جمله ارتفاع، دما، رطوبت،

اقلیم و خاک و عرض جغرافیایی در مقدار این ترکیبات مؤثر می‌باشند. ترکیبات فنولی نقش مهمی را در خاصیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی دارا می‌باشند(۳۱).

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در جلوگیری از تغییرات عطر و طعمی و کیفیت مواد غذایی ایفا می‌کنند و هم‌چنین قادرند خطرات ناشی از بیماری‌های مانند سرطان و دیابت را کاهش دهند(۳۲). نتایج حاصل از بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدرواتانولی رزماری نیز دال بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن بود و با افزایش غلظت عصاره میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد افزایش یافت، که به علت افزایش مقدار ترکیبات فنولی در غلظت بالاتر عصاره است. غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره این گیاه با آنتی‌اکسیدان BHA تفاوت معنی‌داری نداشت. ترکیبات فیتوشیمیایی مانند ترکیبات فنولی که در گیاهان یافت می‌شود، نقش مهمی در ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخشی ایجاد می‌کنند(۳۱). از این رو، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره هیدرواتانولی رزماری را می‌توان به مقادیر بالای فنول آن نسبت داد(۳۳). ابراهیمی همتی کیخا و همکاران به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری پرداختند، آن‌ها اعلام نمودند تمامی غلظت‌های اسانس رزماری دارای خاصیت آنتی-اکسیدانی بود(۳۴).

اثر ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را می‌توان به ترکیبات زیست فعال موجود در آن‌ها نسبت داد، این ترکیبات قادر به اتصال به سطح سلولی و نفوذ به لایه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی می‌باشند. ازدیاد و انباشته شدن این ترکیبات در سلول منجر به اختلال در یکپارچگی سلول و به دنبال آن تأثیر بر متابولیسم و در نهایت مرگ سلول می‌شوند(۳۵). با توجه نتایج حاصل از این پژوهش، خواص ضدمیکروبی عصاره هیدرواتانولی رزماری به روش انتشار چاهک دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی باکتری‌های گرم مثبت به‌ویژه استرپتوکوکوس اورئوس با قطر هاله عدم رشد ۲۰/۹۵±۲۰/۰ میلی‌متر بود. مطابق نتایج به دست آمده می‌توان بیان نمود عصاره هیدرواتانولی این گیاه، اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی بر اکثر سویه‌های عامل فساد و بیماری‌زا داشت. در این آزمایش قطر هاله بازداری عصاره رزماری در غلظت‌های تهیه شده با یکدیگر مقایسه شدند و نشان داده شد که این عصاره بر همه میکروارگانیسم‌های مورد بررسی مؤثر بود و با کاهش غلظت عصاره اثر بازدارندگی آن نیز کاهش یافت، به طوری که غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر کمی بر باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون داشت، اما بر هیچ یک از باکتری‌های گرم منفی مؤثر نبود و نتوانست هاله عدم رشد ایجاد کند و کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. هم‌چنین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت، بزرگتر از باکتری‌های گرم منفی بود که می‌تواند به علت تفاوت ساختار دیواره سلولی و چند

لایه بودن باکتری‌های گرم منفی باشد. این نتایج با یافته‌های مارتینز و همکاران که به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره رزماری پرداختند، هم‌خوانی دارد(۳۶). والکوا و همکاران گزارش کردند که اسانس گیاه رزماری در غلظت‌های ۲۵ درصد و بالاتر از آن بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی دارای اثر ضدمیکروبی است(۳۷). با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد در نتیجه اثر بازدارندگی به مقدار قابل توجهی افزایش یافت، به طوری که در همه میکروارگانیسم‌ها بیشترین فعالیت ضدمیکروبی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مشاهده گردید. ساکار و همکاران نیز بیان نمودند که با افزایش غلظت اسانس رزماری، قطر هاله بازداری بیشتر شد(۳۸).

نتایج حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره این گیاه نیز نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشتند، به طوری که بیشترین و کمترین حساسیت در برابر عصاره رزماری به ترتیب مربوط به باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و سودوموناس آئروژینوزا بود. علت تأثیر متفاوت عصاره بر روی این دو گروه از باکتری‌ها را می‌توان به تفاوت ساختاری موجود بین دیواره آن‌ها نسبت داد. علت احتمالی آن وجود لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که مانند سدی از عبور مولکول‌های بزرگ و آبگریز ممانعت می‌کند و از آنجایی که اکثر ترکیبات مؤثر موجود در عصاره‌ها و اسانس‌ها ماهیت آبگریزی دارند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که این مواد امکان نفوذ و دسترسی به نقاط فعال داخل باکتری‌های گرم منفی را ندارند و به همین دلیل معمولاً باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات گیاه نشان می‌دهند(۳۹). احمدی اسب‌چین و همکاران اثر بازدارندگی عصاره رزماری را بر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و انتروکوک فکالیس بررسی نمودند و اعلام کردند که عصاره استخراج شده از این گیاه بر هر همه میکروارگانیسم اثر بازدارندگی نشان داد(۴۰). مارتینز و همکاران گزارش کردند که عصاره‌های آبی، اتانولی و استونی استخراج شده از گیاه رزماری دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های استرپتوکوک پیوژن، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و کلبسیلا پنومونیه بود(۳۶).

کلیه غلظت‌های مورد استفاده عصاره هیدرواتانولی رزماری با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند و بیشترین اختلاف مربوط به نمونه حاوی غلظت ۰/۷۵ درصد از عصاره این گیاه بود. این نتایج نشان می‌دهد که ماده مؤثره عصاره هیدرواتانولی رزماری حتی در غلظت پایین قادر به تأثیرگذاری بر طیف وسیعی از میکروب‌هایی است که در شیر وجود دارد. نوربخش و همکاران گزارش کردند که غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره آبی مرزه بختیاری در روند کاهش رشد استافیلوکوکوس اورئوس در طول مدت زمان نگهداری پنیر خامه‌ای

اختلاف معنی‌دار داشتند(۴۱). رزمجو و همکاران نیز اثرات ضد میکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال[۱] بر ماندگاری شیر طعم‌دار را بررسی کردند(۴۲). آن‌ها دریافتند عصاره متانولی پوست پرتقال دارای اثرات ضدمیکروبی بر روی استافیلکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی بود. اسمیت و همکاران بیان نمودند که اسانس آویشن[۲] موجب کاهش تعداد لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر شد(۴۳). ترکیبات مؤثره اسانس‌ها و عصاره‌ها از طریق تجزیه دیواره سلولی، آسیب زدن به غشای سیتوپلاسمی و در نتیجه نشت محتوای سلول به بیرون و انعقاد سیتوپلاسم موجب تخریب باکتری‌ها می‌شوند.

تمامی نمونه‌های شیر حاوی عصاره هیدرواتانولی گیاه رزماری دارای امتیاز حسی کمتری در مقایسه با نمونه شاهد بودند. با افزایش غلظت عصاره مورد بررسی میزان رضایت‌مندی افراد ارزیاب از ویژگی‌های حسی نمونه‌های حاوی عصاره کاهش یافت. در کل از لحاظ پذیرش کلی نمونه‌های شیر حاوی ۰/۷۵ درصد عصاره این گیاه دارای مزه تلخ، رنگ تیره و بوی نامطلوب بودند و ارزیاب‌ها این نمونه‌ها را به عنوان نمونه‌های غیر قابل قبول معرفی کردند. رزمجو و همکاران اثرات ضدمیکروبی عصاره متانولی پوست پرتقال بر ماندگاری شیر طعم‌دار را بررسی کردند، نتایج آن‌ها نشان داد شیر حاوی عصاره نسبت به شیر بدون عصاره دارای اختلاف معنی‌داری بود و از نظر حسی مورد قبول واقع نشد(۴۲). قلعه موسیانی و همکاران اثر عصاره‌های اتانولی زوفا[۳] و رازک[۴] در جلوگیری از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی کردند، آن‌ها اظهار داشتند که با افزایش درصد هر دو عصاره از لحاظ پذیرش کلی افراد ارزیاب امتیاز کمتری را نسبت به نمونه شاهد به آن نمونه‌ها دادند(۴۴).

در خاتمه به عنوان مهم‌ترین عوامل محدود کننده این تحقیق می‌توان به کمبود دستگاه‌ها و امکانات آنالیز فیتوشیمیایی و همچنین محدودیت اعتباری برای استفاده از سایر روش‌های تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. همچنین پیشنهاد می‌گردد تحقیقات بیشتری بر سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی و همین طور کاربرد عصاره این گیاه در سایر مواد غذایی انجام گیرد تا دوز مؤثر عصاره جهت استفاده در مواد غذایی مشخص گردد.[۱۰]

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدرواتانولی گیاه رزماری ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد آن قابل توجه بود و اثر ضدمیکروبی بر سویه‌های مورد بررسی به ویژه باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان داد. باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را در برابر عصاره این

1-*Citrus siensis* L
2-*Citrus siensis* L
3-*Hyssoupus officinalis* L.
4-*Humulus lupulus* L.

گیاه از خود نشان دادند. هم‌چنین با افزایش غلظت عصاره، میزان رشد باکتری‌ها در شیر به شدت کاهش پیدا کرد. غلظت ۰/۷۵ درصد عصاره هیدرواتانولی رزماری بیشترین اثر ضدمیکروبی را از خود نشان داد، اما از آنجایی که در غلظت مذکور ظاهر، رنگ و طعم شیر مطلوب نبود، غلظت ۰/۵ درصد به عنوان بهترین تیمار پیشنهاد می‌گردد. بنابراین با توجه به این که عصاره هیدرواتانولی رزماری تأثیر بسزایی بر جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد دارد، در نتیجه می‌توان از این عصاره به عنوان یک آنتی‌بیوتیک طبیعی در شیر استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مجتمع آموزش عالی نهاوند با کد اخلاق IR.NAHGU.REC.1399.006 می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی مجتمع آموزش عالی نهاوند به دلیل همکاری و مساعدت در مسیر انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES:

1.Torkar KG, Teger SG. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. Acta Agric Slov 2008; 92(1): 61-74.
2.Guler S, Seker M. The effect of cinnamon and guar gum on bacillus cereus population in milk. J Food Proc and Preser 2009; 33: 415–26.
3.Moradi M, Hassani A, Sefidkon F, Maroofi H. Chemical composition of leaves and flowers essential oil of *Origanum vulgare* ssp. gracile growing wild in Iran. J Essent Oil Bear Plants 2015; 18(1): 242-7.
4.Mamarasulov B, Davranov K, Umruzaqov A, Ercisli S, Alharbi SA, Ansari MJ, Krivosudská E, Datta R, Jabborova D. Evaluation of the antimicrobial and antifungal activity of endophytic bacterial crude extracts from medicinal plant Ajuga turkestanica (Rgl.) Brig (Lamiaceae). J King Saud Univ Sci 2023; 35: 102644.
5.Egamberdieva D, Jabborova D. Plant microbiome: source for biologically active compounds. Biodiversity and Biomedicine 2020; 4: 1–9.
6.Ayoughi F, Marzegar M, Sahari M, Naghdibadi H. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculus* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. J Agri Sci Technol 2010; 13: 79-88.
7.Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Zanganeh H. Investigation of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on gram positive and gram negative bacteria "invitro". Sadra Med Sci J 2014; 2(2): 123-34.
8.Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, Galé I. Antioxidant effect of rosemary(*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. Theriogenology 2011; 75(9): 1735-41.
9.Gao M, Feng L, Jiang T, Zhu J, Fu L, Yuan D, Li J. The use of rosemary extract in combination with nisin to extend the shelf life of pompano(*Trachinotus ovatus*) fillet during chilled storage. Food Control 2014; 37: 1-8.
10.Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environ Toxicol Pharmacol 2011; 32(1): 63-8.
11.Hassan FAS, Bazaid S, Ali EF. Effect of deficit irrigation on growth, yield and volatile oil content on *Rosmarinus officinalis* L. plant. J Med Plants Stud 2013; 1(3): 12-21.
12.Ohlsson E. Minimal processing technologies in the food industry. CRC press wood hed publishing limited. Cambridge England 2000; 141–60.
13.Nieto G, Ros G, Castillo J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary(*Rosmarinus officinalis,* L.): A Review. Medicines 2018; 5(3): 98-9.
14.Manilal A, Raghavanpillai Sabu K, Woldemariam M, Aklilu A, Biresaw G, Yohanes T, et al. Antibacterial activity of rosmarinus officinalis against multidrug-resistant clinical isolates and meat-borne pathogens. Evid Based Complementary Altern Med 2021; 6: 1-10.
15.Tabatabaei Yazdi F, AlizadeBehbahani B, HeidariSureshjani M. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (*Ferulago angulata*) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. J Arak Uni Med Sci 2014; 17 (3): 35-46.
16.Tahami F, Basiri A, Ghiasi Tarzi B, Mahasti P. The effect of *Foenicalum vulgare* essence on the stability of sunflower oil. J Food Sci Nut 2013; 3(10): 71-8.
17.Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. J Food Meas Charact 2017; 11: 847-63.
18.Nakajima JI, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito K. LC/PDA/ESI- MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. J Biomed Biotechnol 2004; 5: 241–7.
19.Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem 2007; 100(4): 1409-18.
20.Barzegar H, Alizadeh Behbahani B, Mehrnia MA. Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. Food Sci Biotechnol 2020; 29: 717-28.
21.Barzegar H, Mehrnia MA, Alizadeh Behbahani B. Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum Lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. J Appl Microbiol Food Indust 2018; 4(4): 15-28.
22.Oguntibeju OO. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of selected African medicinal plants. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 2019; 11(6): 224-37.

23.Latifi Z, Behzadinia M, Qara S, Parhizkar P, Abbasi M, Jafari Z. Antimicrobial Effects of Hydroalcoholic Extract of Sour Lemon Peel on G- Bacteria and G+ Bacteria. Iranian J Food Sci Technol 2021; 116(18): 55-65.
24.Bajera T, Silha D, Ventura K, Bajerov P. Composition and antimicrobial activity of the essential oil, distilled aromatic water and herbal infusion from *Epilobium parviflorum* Schreb. Ind Crops Prod 2017; 100: 95–105.
25.Tabatabaei Yazdi F, AlizadeBehbahani B, Mortazavi A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias “in vitro”. J Paramed Sci 2014; 5(2): 91-101.
26.Adesokan I, Abiola O, Ogundiya M. Influence of ginger on sensory properties and shelflife of ogi, a Nigerian traditional fermented food. Afri J Biotechnol 2010; 9(12): 1803-7.
27.Abid H, Ali J, Waqas M, Anwar Y, Ullah J. Microbial quality assessment study of branded and unbranded milk sold in Peshawar City, Pakistan. Pakistan J Nut 2009; 8(5): 704-9.
28.Krumov K, Ivanov G, Slavchev A, Nenov, N. Improving the processed cheese quality by the addition of natural spice extracts. Adv J Food Sci Technol 2010; 2(6): 335-9.
29.Reyes Jurado F, Cervantes Rincón T, Bach H, López Malo A, Palou E. Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. Ind Crops Prod 2019; 131: 90-5.
30.Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. IFSTRJ 2020; 17 (1): 83-91.
31.Noshad M, Alizadeh Behbahani B, Dehghani S. Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from Barhang-eSagheerseed mucilage and loaded with Avishan-e-Baghi. Food Sci Technol 2020; 17(4): 1-13.
32.Hsouna AB, Trigui M, Culioli G, Blache Y, Jaoua S. Antioxidant constituents from Lawsonia inermis leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. Food Chem 2011; 125(1): 193-200.
33.Sanchez-Marzo N, Lozano-Sanches J, Cadiz-Gurrea M, Herranz-Lopez M, Micol V, Segura-Carretero A. Relationships between chemical structure and antioxidant activity of isolated phytocompounds from lemon verbena. Antioxidants 2019; 324: 1-20.
34. Ebrahimi Hemmati Kaykha M, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. Identification of chemical compounds, antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents and cytotoxicity effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil. IFSTRJ 2022; 18(4): 469-82.
35.Shahidi F, Yazdi FT, Roshanak S, Behbahani BA, Norouzi N, Vasiee A. Antimicrobial activity of *Lepidium draba* extract on some pathogenic microorganisms “in vitro”. IJIDTM 2019; 24(85): 1-9.
36.Martinez L, Castillo J, Ros G, Nieto G. Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary, pomegranate and olive extracts in fish patties. Antioxidants 2019; 8(4): 86-91.
37.Valkova V, Duranova H, Galovicova L, Vukovic N, Vukic M, Kacaniova M. In vitro antimicrobial activity of lavender, mint, and rosemary essential oils and the effect of their vapours on growth of *Penicillium* spp. in a bread model system. Molecules 2021; 26(13): 3859-65.
38.Sakar EH, Zeroual A, Kasrati A, Gharby S. Combined effects of domestication and extraction technique on essential oil yield, chemical profiling, and antioxidant and antimicrobial activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). J Food Biochem 2023; 20: 1-13.
39.Negi P, Jayaprakasha G, Jena B. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. Food Chem 2003; 80(3): 393-7.
40.Ahmady-asbchin S, Mostafapourrami MJ, Rajaee Maleki S. The in vitro inhibitory effects of the rosemary essential oil on some gram positive and negative bacteria. IUMS 2016; 24(2): 80-9.
41.Babadi Ezat, Ghasemi Pirbaloutib A, Nourafcan H, Behzad H. Bioactivity of essential oil of bakhtiari savory(Lamiaceae). Electron J Biol 2012; 8(4): 73-8.
42.Razmjoo M, Khaki P, Faghih Nasiri M, Rezaei K. Possibility study of multilayer encapsulation by external gelation procedure on the survival of probiotic bacteria undergoing orange juice pasteurization. Iran J Nutr Sci Food Technol 2016; 11(1): 59-66.
43.Smith P, Stewart J, Fyfe L. The poten tial appliction of plant essential oils as natrural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol 2001; 8: 463-70.
44.Ghaleh Mosiyani Z, Pourahmad R, Rajaei P. Investigation of the effect of hop (*Hyssoupus officinalis* L.) and hyssop (*Humulus lupulus* L.) ethanolic extracts on the prevention of *Staphylococcus aureus* growth in doogh. J Food Technol Nutr 2019; 16(3): 45-58.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Antioxidant and Antimicrobial Properties of Hydro-Ethanolic Extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its Application in Pasteurized Milk

Izadi Z[1]*, Torabi AR[2]

[1]Department of Horticultural Sciences and Engineering, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, [2]Department of Neurology, School of Medicine, Besat Hospital, Hamedan, Iran

Received: 27 Jan 2023 Accepted: 27 Dec 2023

Abstract

Background & aim: Milk is a dairy product which is susceptible to contamination by pathogenic and spoilage microorganisms. One way to control the growth of pathogenic bacteria is to use preservatives and antimicrobial compounds. Due to the general concerns about the side effects of chemical preservatives, there is a tendency to consume products that use natural preservatives. Natural products provide unlimited opportunities for novel and suitable additives. The main objective of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of hydro-ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) against some gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua)* and gram-negative bacteria (*Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa*) and the next stage was to investigate the impact of hydro-ethanolic extract of this plant at 0.25, 0.5 and 0.75% (w/w) concentrations on the shelf life of pasteurized milk.

Methods: The present experimental study was conducted in 2022 at Nahavand Higher Education Complex. The total phenolic content of the extract was measured by Folin-ciocalteau method. Antioxidant activity of different concentration of extract were assessed by diphenyl picrylhydrazyl radical-scavenging activity and compared with synthetic antioxidant butylated hydroxyl anisole (BHA). Antibacterial effects of resemary on pathogenic bacteria was determined by well diffusion agar, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. Experimental data were analyzed using ANOVA by the SPSS version 20 software and mean comparison were done using Duncan's multiple range test.

Results: The phenolic content of hydro-ethanolic extract weas 96.47±0.35 mg galic acid/g extract. Hydro-ethanolic extract of rosemary had the greatest effect on *Staphylococcus aureus*. The MIC of rosemary ethanolic extract ranged from 12.5 to 50 mg/ml, depending on the type of bacteria (gram positive or gram negative). Also, the treatments of pasteurized milk with 0.5%, acceptable sensory properties had a significantly lower total microbial count and longer shelf life compared to the control sample.

Conclusion: Therefore, considering that the hydro-ethanolic extract of rosemary had a significant effect on preventing the growth of pathogenic and spoilage microorganisms, as a result, this extract can be used as a natural antibiotic in milk.

Key words: Gram positive and gram-negative bacteria, Rosemary, Antioxidant property, Phenol, Zone of inhibition

***Corresponding author:** **Izadi Z,** Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Email: z.izadi@basu.ac.ir

Please cite this article as follows: Izadi Z, Torabi AR. Antioxidant and antimicrobial properties of hydro-ethanolic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its application in pasteurized milk. Armaghane-danesh 2024; 29(1): 50-66.