

## تأثیر اسانس ترخون بر فعالیت باکتری‌های آغازگر، کپک و مخمر و بهبود خصوصیات ماست سنتی

هبه زیدان<sup>۱</sup>، سید مسعود حسینی<sup>۱</sup> و علی محمدی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران؛ <sup>۲</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: سید مسعود حسینی، Ma\_hosseini@sbu.ac.ir و علی محمدی، A.Mohammadi@alzahra.ac.ir

**چکیده.** هدف از این پژوهش افزایش ماندگاری ماست و همچنین بهبود قوام و کاهش آب اندازی با افزودن اسانس ترخون به ماست سنتی بود. در این بررسی ابتدا ماست به روش صنعتی تولید شده و سپس تلقیح اسانس در غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۵، ۳۰ پی پی ام) به ماست انجام شده است. نمونه‌ها طی ۳ هفته نگهداری در دو دما (دمای یخچال و دمای اتاق) از نظر ظرفیت نگهداری آب و ارزیابی میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف ترخون، دما و مدت زمان نگهداری اثر معنی‌داری  $p < 0.05$  بر ظرفیت نگهداری آب و همچنین شمارش باکتری‌های آغازگر، کپک و مخمر دارد. اسانس ترخون موجب کاهش باکتری‌ها، کپک و مخمرهای عامل فساد ماست شد. نتیجه‌گیری نهایی نشان داد که استفاده از ترخون در نگهداری آب نمونه‌های ماست مؤثر نبود، اما در تعداد باکتری‌های آغازگر و مخمر مؤثر بود. نمونه‌های ماست با غلظت بالای ترخون، بیشترین امتیاز را از نظر قوام و طعم ترشی به خود اختصاص دادند. در حالی که نمونه‌های با غلظت پایین ترخون، از نظر طعم ماست بیشترین امتیاز حسی را به خود اختصاص دادند.

**واژه‌های کلیدی.** ترخون، خواص حسی، ضد میکروب، طعم ماست، ماندگاری

## The impact of tarragon essential oil on the activity of starter bacteria, molds and yeasts and the improvement of the properties of traditional yogurt

Hiba Zedan<sup>1</sup>, Seyed Masoud Hosseini<sup>1</sup>, Ali Mohammadi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Corresponding authors: Seyed Masoud Hosseini & Ali Mohammadi, Ma\_hosseini@sbu.ac.ir, A.Mohammadi@alzahra.ac.ir

**Abstract.** The aim of this study was to increase the shelf life of traditional yogurt, to improve its consistency and to prevent whey syneresis by adding tarragon essential oil. Yogurt was produced by industrial procedures and then the essential oil was inoculated into yogurt in different concentrations (10, 25, 30 ppm). Samples were examined for water storage capacity and microbial evaluation during 3 weeks of storage at two temperatures (refrigerator temperature and room temperature). The results showed that different concentrations of tarragon, temperature and storage time had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on water holding capacity as well as the number of starter bacteria, molds, and yeasts. Tarragon essential oil reduced the number of bacteria, molds, and yeasts that spoil yogurt. The final results showed that the use of tarragon was not effective in water retention of yogurt samples, but it affected the number of initiator bacteria and yeast. Yogurt samples with high concentration of tarragon had the highest score in terms of consistency and sour taste. While samples with low concentration of tarragon, in terms of yogurt taste, had the highest sensory score.

**Key words.** antimicrobial, durability, sensory properties, tarragon, yogurt taste

## مقدمه

ماست محصول تخمیر شیر است. تخمیر شیر روشی نسبتاً ساده، ارزان و ایمن برای نگهداری آن محسوب می‌شود. تاریخچه تولید ماست به هزاران سال قبل برمی‌گردد که برای اولین بار در مشرق زمین تهیه شد. ماست از تلقیح دو نوع باکتری (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) به داخل شیر تولید می‌شود (Bendall et al., 2019). پس از تلقیح، شیر را در دمای ۴۰-۴۳ درجه سلسیوس نگهداری می‌نمایند که پس از مدتی بر اثر ترشح اسید لاکتیک مترشحه از باکتری‌ها منعقد می‌گردد (Lu and Wang, 2017). خواص حسی ماست همچون عطر، طعم، مزه، ساختار بافت و ظاهر، شاخص اساسی و اصلی ماست بوده که در تعیین میزان مشتری پسندی آن مؤثر است (Mahmoudi et al., 2014). ماست نسبت به دیگر فراورده‌های لبنی به سبب داشتن اسید بیشتر، ماندگاری طولانی‌تری دارد و می‌تواند در دمای یخچال حدود ۱۰ روز باقی بماند، به همین سبب نوع فسادى که ممکن است در ماست به وجود آید، فساد سطحی است. این نوع فساد مربوط به میکروارگانیسم‌های مقاوم به اسید از قبیل کپک و مخمر است؛ اما عمده فساد سطحی در ماست توسط کپک‌ها رخ می‌دهد (Lu & Wang, 2017). این فساد باعث بروز نقایص طعمی و بافتی در این محصول لبنی می‌شود. مهم‌ترین و رایج‌ترین نقیصه طعمی در ماست ترش شدن آن است که این نقیصه از عمده‌ترین عوامل محدودکننده طول عمر ماست است (Mahmoudi et al., 2014). کپک و مخمر و میزان ظرفیت نگهداری آب از عوامل مؤثر بر ماندگاری ماست محسوب می‌شوند (Hajiei, Khodaiyan and Pourahmad, 2017). چندین راه برای افزایش طول عمر ماست وجود دارد که یکی از آن‌ها استفاده از گیاهان و محصولات آن‌ها همچون اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی است. اسانس‌های گیاهی، مایعات روغنی فراری هستند که دارای خواص ضد میکروبی هستند. اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در مطالعات مختلفی گزارش شده است (Mohammadi et al., 2020). بررسی‌ها بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی روغن دارچین نشان داد که روغن گیاه مورد نظر فعالیت ضد باکتری خوبی بر روی *Vibrio*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *parahaemolyticus* داشته است (Chuesiang et al., 2019).

اسانس ترخون (*Artemisia dracunculus*) یکی از محصولات گیاهی است که از گذشته به عنوان عامل نگهدارنده طبیعی و مهارکننده رشد میکروب‌ها به مواد غذایی اضافه می‌شود. این افزودنی به علت دارا بودن ویژگی‌های ضد میکروبی، مانع از رشد تعداد زیادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

عامل فساد می‌گردد (Mohammadi et al., 2015). پایین‌تر بودن حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت‌ها می‌تواند به دلیل وجود لایه محافظتی روی غشای بیرونی باکتری‌های گرم منفی باشد که این لایه نفوذ ترکیبات هیدروفوب به درون قسمت لیپوپلی‌ساکاریدی غشا را محدود می‌کند. البته تمام مطالعات بر حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم منفی اتفاق نظر ندارند. گزارش‌های علمی همچنین خاصیت ضدقارچی اسانس گیاه مذکور را تأیید کرده‌اند (Noruzi et al., 2018). تاکنون مورد مشابهی در خصوص استفاده از اسانس ترخون در ماست و بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و خواص حسی آن مشاهده نگردید. به همین خاطر هدف از این مطالعه بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسانس ترخون بر افزایش ماندگاری ماست با کاهش رشد کپک و مخمر و همچنین تأثیر ترخون در ظرفیت نگهداری آب و بهبود بافت ماست است.

## مواد و روش‌ها

## مواد اولیه مورد استفاده

## شیر گاو

برای تهیه نمونه‌های ماست، شیر خام به میزان ۱۰ کیلوگرم از یک فروشگاه لبنیاتی در تهران خریداری شد، سپس آزمون‌های مختلف روی شیر انجام شد تا ترکیبات اصلی شیر مشخص گردید. میانگین ترکیبات اصلی شیر به کار رفته در تولید ماست در جدول زیر نشان داده شده است.

## مایه ماست

مایه ماست مورد استفاده از شرکت پازن تهیه شد و سپس مقدار چربی، نمک، قند و بار میکروبی آن تعیین شد. مایه ماست مذکور حاوی باکتری‌های آغازگر *Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus acidophilus* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به نسبت ۱:۱ بود و مقدار چربی کل ۷/۸۷ گرم، قند ۷/۸۷ گرم و نمک ۰/۳۸ گرم بود.

اسانس ترخون *Artemisia dracunculus* از شرکت ماگنولیا (تهران، ایران) خریداری شده و در ظرفی تاریک و دور از نور و در یخچال نگهداری شد. محیط کشت‌های استفاده شده شامل آگار MRS، آگار YGC، آگار VRB و محیط لوریل سولفات از شرکت Merck آلمان خریداری شد. تمام مواد شیمیایی استفاده شده دارای درجه تحلیلی بوده و همان‌طور که دریافت شده استفاده شد.

## روش تهیه نمونه‌ها

ماست به طور سنتی تهیه شد؛ به این صورت که ابتدا شیر خام به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه قرار گرفته و در ادامه تا دمای ۴۵ درجه سلسیوس خنک گردید. آنگاه مایه ماست به آن افزوده شد و

استفاده گردید که کشت به صورت سطحی با شرایط گرماگذاری ۵ روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. برای شمارش باکتری‌های کلی فرم از محیط کشت VRBA استفاده شد که به صورت سطحی با شرایط گرماگذاری ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سلسیوس انجام شد (Ledenbach & Marshall, 2009).

برای جستجو و شمارش باکتری *Escherichia coli* و باکتری *Staphylococcus aureus* از روش بیشترین تعداد احتمالی (MPN) و از محیط کشت لوریل سولفات تریپتوز برات با شرایط گرماگذاری ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد (Yörük, 2018).

#### ارزیابی حسی نمونه‌های ماست

ارزیابی ویژگی‌های حسی، شامل خواص ظاهری (رنگ و سطح)، خواص بافتی (قوام، سفتی و مزه) و خواص عطر و طعم (وجود طعم‌های حیوانی و خارجی، طعم ترشی، طعم کهنگی و کپک‌زدگی و طعم کلی ماست که توسط ۱۵ نفر از دانشجویان دانشگاه شهید بهشتی صورت پذیرفت که به طور تصادفی انتخاب شده بودند) در روز ۱۴ام نگهداری طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۹۵ مورد ارزیابی قرار گرفت (Iranian National Standardization Organization, 1398).

در ارزیابی حسی، سنجش ویژگی‌های حسی ماست با استفاده از روش امتیازبندی کلی حاصل از ضرب امتیازات داده شده به شاخص‌های حسی در سطوح ارزیابی صفر تا چهار (۰ = غیرقابل مصرف یا خیلی ضعیف، ۱ = غیرقابل قبول یا ضعیف، ۲ = قابل قبول یا متوسط، ۳ = رضایت‌بخش یا خوب و ۴ = بسیار رضایت‌بخش یا خیلی خوب) در ضرایب مربوطه (برحسب اهمیت) مطابق با جداول زیر صورت گرفت. حداکثر مجموع امتیازبندی حسی برابر ۵۰ است (جداول ۱-۳).

#### تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس مطابق با طرح آزمایشی اندازه‌گیری‌های مکرر با استفاده از روش MIXED برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد ( $p < 0.05$ ). همه داده‌ها میانگین ۳ بار تکرار هستند که همراه با خطاهای استاندارد گزارش شده است.

ضمن بسته‌بندی و درب بندی به گرمخانه منتقل گردید. پس از ۴ ساعت ماست را به سردخانه منتقل نموده و پس از ۴۸ ساعت، ماست تهیه شده در چهار ظرف بزرگ تقسیم شد. غلظت‌های مختلف اسانس ترخون در ۱۰، ۲۵ و ۳۰ درصد تهیه شد. رقت‌های موردنظر با آب مقطر و مخلوط کردن آن با سرعت ۴g به مدت ۱۰ دقیقه تهیه شد.

غلظت‌های مختلف اسانس ترخون به سرم ماست  $\text{pH} < 3/6$  اضافه شده و با استفاده از شیکر مخلوط شدند. همان مقدار سرم ماست به ظرف حاوی نمونه شاهد (بدون اسانس) نیز اضافه شد. سرانجام، نمونه‌ها از ظرف بزرگ به ظروف یک‌بارمصرف منتقل شدند. تمام نمونه‌ها شامل ماست شاهد و ماست با غلظت‌های مختلف اسانس ترخون در سه سطح (۱۰، ۲۵ و ۳۰ درصد) در دو دما (دمای اتاق و دمای یخچال) به مدت سه هفته نگهداری شدند. این تست سه بار تکرار شد. آنگاه اثر غلظت‌های مختلف ترخون (۱۰، ۲۵ و ۳۰ پی پی ام) بر خصوصیات ماست از قبیل ظرفیت نگهداری آب و همچنین زنده‌مانی میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌های، کپک و مخمر مورد بررسی قرار گرفت و کلیه آزمون‌ها ۳ بار تکرار انجام گرفت (Zedan et al., 2021).

#### اندازه‌گیری ظرفیت نگهداری آب

برای این منظور، ۲۰ گرم ماست در لوله‌های سانتریفیوژ توزین و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰g سانتریفیوژ شد (Farnsworth et al., 2006). آب ماست از نمونه‌ها جدا شد. ظرفیت نگهداری آب به عنوان وزن آب ماست در هر ۱۰۰ گرم ماست بیان شد.

درصد ظرفیت نگهداری آب = (حجم فاز مایع جدا شده) / (وزن نمونه)  $\times 100$

#### آنالیزهای میکروبی

باکتری‌های مورد تحقیق در این پژوهش شامل *Streptococcus salivarius*، *thermophilus* و *Lactobacillus delbroki* زیرگونه *bulgaricus* است. شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک با کمک محیط کشت MRS آگار اسیدی و به صورت پورپلیت و با شرایط گرماگذاری ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد، سپس با استفاده از آزمون‌های تشخیصی دو باکتری *Streptococcus salivarius* و *Lactobacillus delbroki* مورد بررسی قرار گرفت. برای جستجو و شمارش کپک و مخمر از محیط کشت YGC agar

جدول ۱- ترکیبات شیر برای تولید ماست.

Table 1. Milk compounds for yogurt production.

| Composition | The amount %         |
|-------------|----------------------|
| Acidity     | 20/13 Degrees dornik |
| Fat         | 2.5                  |
| Protein     | 3.15                 |
| Dry matter  | 8.56                 |
| pH          | 5.7                  |

جدول ۲- شاخص‌های حسی/ سطح ارزیابی ماست سنتی.

Table 2. Sensory indicators / evaluation level of traditional yogurt.

| Assessment level \Sensory index | Taste | Texture | Appearance |
|---------------------------------|-------|---------|------------|
| Very satisfying (very good)     | 5×5   | 5×2     | 5×2        |
| Satisfying (good)               | 4×5   | 4×2     | 4×2        |
| Acceptable (medium)             | 3×5   | 3×2     | 3×2        |
| Unacceptable (weak)             | 2×5   | 2×2     | 2×2        |
| Not consumable (very weak)      | 1×5   | 1×2     | 1×2        |

جدول ۳- جدول امتیاز و ضرایب شاخص‌های حسی/ سطح ارزیابی ماست سنتی.

Table 3. Table of scores and coefficients of Sensory indicators / evaluation level of traditional yogurt.

| Assessment level\ Score and coefficient                  | Maximum points | Coefficient | Maximum total score |
|----------------------------------------------------------|----------------|-------------|---------------------|
| Taste (taste and smell)                                  | 4              | 6           | 24                  |
| Oral tissue (oral sensation)                             | 4              | 3.5         | 14                  |
| Appearance (i.e., color, surface condition and watering) | 4              | 2           | 8                   |
| Non-oral tissue (i.e., shedding, stirring and spooning)  | 4              | 1           | 4                   |

جدول ۴- مجموع امتیازهای شاخص‌های حسی/ سطح ارزیابی ماست سنتی.

Table 4. Total scores of Sensory indicators / evaluation level of traditional yogurt.

| Assessment   | Total points |
|--------------|--------------|
| Very good    | 40-50        |
| Good         | 30-39        |
| Medium       | 20-29        |
| Unacceptable | Less than 2  |

## نتایج

تأثیر عوامل مختلف روی تغییرات ظرفیت نگهداری آب:

آنالیز واریانس نمونه‌های ماست نشان داد که نوع تیمار، دما و مدت زمان نگهداری دارای اثر معنی‌داری  $p < 0.05$  بر تغییرات ظرفیت نگهداری آب است. همچنین نتایج آنالیز واریانس نمونه‌های ماست موجود در جدول ۴ نشان می‌دهند که اثر متقابل مدت زمان و دمای نگهداری بر ظرفیت نگهداری آب معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ).

شکل ۱ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ترخون در نمونه‌های ماست میزان ظرفیت نگهداری آب به طور معنی‌داری  $p < 0.05$  کاهش پیدا کرده است به نحوی که در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های حاوی ترخون ۳۰ درصد، کمترین و در نمونه‌های حاوی ۱۰ درصد ترخون، بیشترین ظرفیت نگهداری آب مشاهده شد. نتایج نشان داد که با افزایش دما و میزان اسیدلاکتیک در طول دوره نگهداری، ظرفیت نگهداری آب کاهش پیدا می‌کند (شکل ۱B). بر این اساس میزان آب اندازی (سینرزیس) در نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای یخچال بود. از طرف دیگر مشخص شد که پروتئین‌ها نقش بسزایی در نگهداری آب دارند

بنابراین می‌توان احتمال داد که با افزایش دما و طول مدت نگهداری، فعالیت مخمرها و تجزیه پروتئین توسط آن‌ها افزایش یافته و از نقش پروتئین‌ها در کاهش آب اندازی کاسته می‌شود (Amatayakul et al., 2006).

شکل ۱ C تغییرات میزان ظرفیت نگهداری آب ماست در طول دوره نگهداری را نشان می‌دهد که با گذشت زمان، میزان ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های دارای ترخون کاهش یافت. دلیل کاهش ظرفیت نگهداری آب با افزایش مدت زمان نگهداری احتمالاً به دلیل کاهش زیاد pH بوده است زیرا مقدار pH در نمونه‌های حاوی اسانس ترخون با کاهش مواجه شد. ضمن اینکه دلیل آن می‌تواند فعالیت باکتری‌های استارت‌ری و در نتیجه شل شدن بافت نمونه‌های ماست باشد زیرا بافت نمونه‌های ماست با pH پایین بسیار سست بود. نتایج حاکی از آن است که میزان ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های حاوی ترخون ۳۰ درصد کمتر از سایر تیمارها است.

نتایج نشان داد که با افزایش دما و میزان اسیدلاکتیک در طول دوره نگهداری، ظرفیت نگهداری آب کاهش پیدا می‌کند (شکل ۱B). بر این اساس میزان آب اندازی (سینرزیس) در

نمونه‌های نگهداری شده در دمای اتاق بیشتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای یخچال بود. از طرف دیگر مشخص شد که پروتئین‌ها نقش بسزایی در نگهداری آب دارند بنابراین می‌توان احتمال داد که با افزایش دما و طول مدت نگهداری، فعالیت مخمرها و تجزیه پروتئین توسط آن‌ها افزایش یافته و از نقش پروتئین‌ها در کاهش آب اندازی کاسته می‌شود (Amatayakul et al., 2006).

شکل ۱ تغییرات میزان ظرفیت نگهداری آب ماست در طول دوره نگهداری را نشان می‌دهد که با گذشت زمان، میزان ظرفیت

نگهداری آب در نمونه‌های دارای ترخون کاهش یافت. دلیل کاهش ظرفیت نگهداری آب با افزایش مدت زمان نگهداری احتمالاً به دلیل کاهش زیاد pH بوده است زیرا مقدار pH در نمونه‌های حاوی اسانس ترخون با کاهش مواجه شد. ضمن اینکه دلیل آن می‌تواند فعالیت باکتری‌های استارت‌تری و در نتیجه شل شدن بافت نمونه‌های ماست باشد زیرا بافت نمونه‌های ماست با pH پایین بسیار سست بود. نتایج حاکی از آن است که میزان ظرفیت نگهداری آب در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های حاوی ترخون ۳۰ درصد کمتر از سایر تیمارها است.

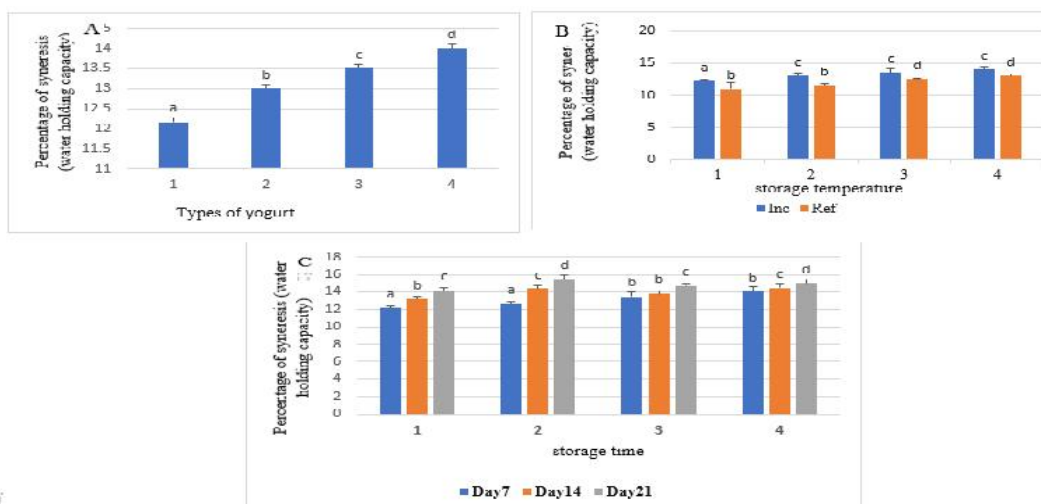
**جدول ۵** - نتایج آنالیز آماری مربوطه به ظرفیت نگهداری آب و شمارش میکروبی با توجه به غلظت‌های مختلف ترخون، دما و مدت زمان نگهداری.

**Table 5.** Results of statistical analysis related to water storage capacity and microbial count according to the different concentrations of tarragon, temperature and storage time.

| Different factors   | Properties   | Syneresis     | Primer bacteria (Log CFU/gr) | Yeasts (Log CFU/gr) |
|---------------------|--------------|---------------|------------------------------|---------------------|
| Yogurt type         | 1*           | 14 ± 0.361    | 10.88 ± 0.034                | 6.66 ± 0.073        |
|                     | 2            | 12.16 ± 0.361 | 9.47 ± 0.034                 | 5.94 ± 0.073        |
|                     | 3            | 13.20 ± 0.361 | 8.86 ± 0.034                 | 5.15 ± 0.073        |
|                     | 4            | 13.50 ± 0.361 | 7.07 ± 0.034                 | 4.50 ± 0.073        |
| Storage temperature | refrigerator | 11.14 ± 0.255 | 9.50 ± 0.031                 | 3.60 ± 0.052        |
|                     | or room      | 13.89 ± 0.255 | 8.95 ± 0.031                 | 4.50 ± 0.052        |
| Storage time        | 7 days       | 12.69 ± 0.312 | 8.77 ± 0.037                 | 5.76 ± 0.63         |
|                     | 14 days      | 14.27 ± 0.312 | 8.08 ± 0.037                 | 6.20 ± 0.63         |
|                     | 21 days      | 13.60 ± 0.312 | 6.37 ± 0.037                 | 7.39 ± 0.63         |

\*۱: ماست کنترل ۲: ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون ۳: ماست حاوی ۲۵ درصد ترخون ۴: ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون.

1 \*: Control yogurt 2: Yogurt containing 10% tarragon 3: Yogurt containing 25% tarragon 4: Yogurt containing 30% tarragon.



شکل ۱- بررسی تأثیر عوامل مختلف روی تغییرات ظرفیت نگهداری آب: (A) تأثیر غلظت ترخون، (B) بررسی تأثیر دمای نگهداری و (C) بررسی تأثیر مدت زمان نگهداری.

**Figure 1.** Study of the effect of different factors on the change in water holding capacity, including tarragon concentration (A), storage temperature (B), and storage time (C).

(۱: ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون، ۲: ماست حاوی ۲۵ درصد ترخون، ۳: ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون و ۴: ماست کنترل)

(1: yogurt containing 10% tarragon, 2: yogurt containing 25% tarragon, 3: yogurt containing 30% tarragon and 4: control yogurt)

## باکتری‌های آغازگر

نتایج حاصل از مقایسه داده‌های مربوط به شمارش باکتری‌های آغازگر (Log CFU/gr) در نمونه‌های ماست طی ۳ هفته نگهداری، معنی‌دار بودن نوع تیمار، دمای نگهداری و مدت زمان نگهداری بر تعداد باکتری‌های آغازگر را نشان داد ( $p < 0.05$ ). با توجه به نتایج حاصل از آنالیز آماری (جدول ۴)، با افزایش غلظت ترخون تعداد باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های ماست با کاهش مواجه شد؛ به نحوی که ماست کنترل و ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر شمارش میکروبی Log CFU/gr را به خود اختصاص دادند (شکل A۲). همچنین نتایج آنالیز آماری مربوط به تعداد باکتری‌های آغازگر Log CFU/gr نشان داد که تعداد باکتری‌های آغازگر در دمای نگهداری یخچال در نمونه‌های حاوی ترخون بیشتر از دمای اتاق بود (شکل B۲).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری، مقدار باکتری‌های آغازگر Log CFU/gr در نمونه‌های ماست به‌طور پیوسته کاهش یافت (شکل C۲). این کاهش مقدار احتمالاً به افزایش درصد اسیدلاکتیک و کاهش pH نمونه‌های ماست با افزایش مدت زمان نگهداری مربوط است. نتایج آزمون‌های تشخیصی نشان داد که تعداد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی کاهش یافته است. بر این اساس افزودن اسانس ترخون به نمونه‌های ماست مانع از رشد باکتری‌های مضر می‌گردد ضمن اینکه تعداد باکتری‌های مفید نیز کاهش میابد.

## کپک و مخمرها

نتایج حاصل از مقایسه داده‌های مربوط به شمارش مخمر Log CFU/gr در نمونه‌های ماست در طول مدت زمان نگهداری، معنی‌دار بودن ( $p < 0.05$ ) نوع تیمار، دما، مدت زمان نگهداری بر شمارش مخمر را نشان داد (شکل A۳). همان‌گونه که در جدول (۴) مشخص است، با افزایش غلظت ترخون، میزان مخمر در نمونه‌های ماست کاهش یافته است، به نحوی که ماست کنترل و ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار مخمر Log CFU/gr را به خود اختصاص دادند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که مقدار مخمر Log CFU/gr در دمای یخچال کمتر از دمای اتاق است. دمای اتاق نسبت به یخچال برای رشد و فعالیت قارچ‌ها مناسب‌تر است، بنابراین قارچ‌ها با قرار گرفتن در دمای مناسب، به سرعت رشد و تکثیر می‌یابند (شکل B۳). همچنین این نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری مقدار مخمر Log CFU/gr در نمونه‌های ماست به‌طور پیوسته افزایش یافت (شکل C۳).

نتایج حاصل از مقایسه داده‌های مربوط به شمارش مخمر Log CFU/gr در نمونه‌های ماست در مدت ۳ هفته، معنی‌دار بودن اثر متقابل نوع تیمار، مدت زمان نگهداری بر تعداد مخمر را نشان داد ( $p < 0.05$ ). از طرفی اثر متقابل دما و مدت زمان نگهداری بر شمارش مخمر معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). نتایج نشان داد اسانس ترخون مانع رشد کپک و مخمر در نمونه‌های ماست می‌گردد، بیشترین آلودگی قارچی در نمونه‌های کنترل و در هفته سوم نگهداری بود. کمترین میزان آلودگی قارچی در نمونه‌های حاوی ۳۰ درصد ترخون مشاهده شد. می‌توان نتیجه گرفت که ترخون با دارا بودن فعالیت ضد میکروبی، رشد مخمرها را به اندازه ۲/۵ سیکل لگاریتمی در هفته سوم نگهداری کاهش می‌دهد (شکل C۳). نتیجه جستجو و شمارش میکروبی کپک‌ها در همه تیمارها (نمونه‌های کنترل و نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف ترخون) منفی بود.

## باکتری‌های بیماری‌زا

تمام نمونه‌های ماست از نظر باکتری کلی‌فرم مورد آزمایش قرار گرفتند که در هیچ یک از آن‌ها، کلی‌فرمی دیده نشد. از این رو، نتیجه‌گیری شد که نمونه‌های بررسی شده در همه تیمارها از روز اول تا هفته سوم توسط باکتری‌های کلی‌فرم آلوده نشده‌اند که این مسئله می‌تواند به دلیل رعایت اصول بهداشتی در تهیه شیر و ماست باشد. مطالعات نشان داد که با کاهش pH نمونه‌ها، شرایط رشد کلی‌فرم‌ها نامساعد می‌شود به گونه‌ای که این میکروارگانیسم‌ها از محیط حذف می‌شوند. کلی‌فرم‌ها برای فعالیت مناسب به دمای ۴۴ درجه سلسیوس و pH اولیه ۴/۴ نیاز دارند، در غیر این صورت، آن‌ها نمی‌توانند رشد کنند. رقابت با باکتری‌های اسید لاکتیک نیز شرایط را برای فعالیت کلی‌فرم‌ها مشکل‌تر ساخته و این دسته از میکروارگانیسم‌ها تحت تأثیر اسیدلاکتیک تولید شده توسط این باکتری‌ها غیرفعال می‌گردند (Tamime and Robinson, 2007). نتیجه جستجو و شمارش اشرشیاکلی و استافیلوکوکس اورئوس مثبت در همه تیمارها (نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف ترخون)، منفی بود.

## ارزیابی ویژگی‌های حسی

## رنگ ماست

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری روی رنگ نمونه‌های ماست ندارد ( $p > 0.05$ ).

## سطح ماست

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری روی سطح نمونه‌های ماست ندارد ( $p > 0.05$ ).

## قوام، سفتی و قابلیت فاشق برداری

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری بر طعم تندشدگی یا رنسیدیتی نمونه‌های ماست ندارد ( $p>0.05$ ). علت احتمالاً انجام آزمون حسی در هفته دوم تولید است زیرا در روزهای نخست تولید، میزان تند شدن چربی‌ها بسیار ناچیز است. نتایج آزمون ارزیابی حسی در مطالعات پیشین نشان داد که غلظت‌های مختلف اسانس ترخون اثر معنی‌داری بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی مایونز نداشتند (Noruzi et al., 2018).

#### عدم کهنگی و کپک‌زدگی

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری بر طعم کهنگی و کپک‌زدگی نمونه‌های ماست ندارد ( $p>0.05$ ).

#### طعم ماست

طعم ماست به ترکیبات آروماتی تولید شده توسط باکتری‌های آغازگر، بخصوص *Lactobacillus bulgaricus* طی واکنش تخمیر بستگی دارد (Tamime and Robinson, 2007). مهم‌ترین ترکیبات مؤثر در عطر و طعم ماست عبارتند از استالدهید، استون، استوئین و دی استیل. نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری بر طعم نمونه‌های ماست دارد ( $p<0.05$ ).

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری روی قوام نمونه‌های ماست دارد ( $p<0.05$ ). ویژگی بافتی مطلوب در ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون مشاهده شد که احتمالاً به قوام مناسب ماست مربوط است. منظور از قوام ماست دارا بودن بافت منسجم، سفت و بدون آب اندازی است. نمونه‌های ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون بالاترین امتیاز از نظر قوام را به خود اختصاص داد (شکل ۴A).

#### احساس دهانی

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری بر احساس دهانی نمونه‌های ماست ندارد ( $p>0.05$ ).

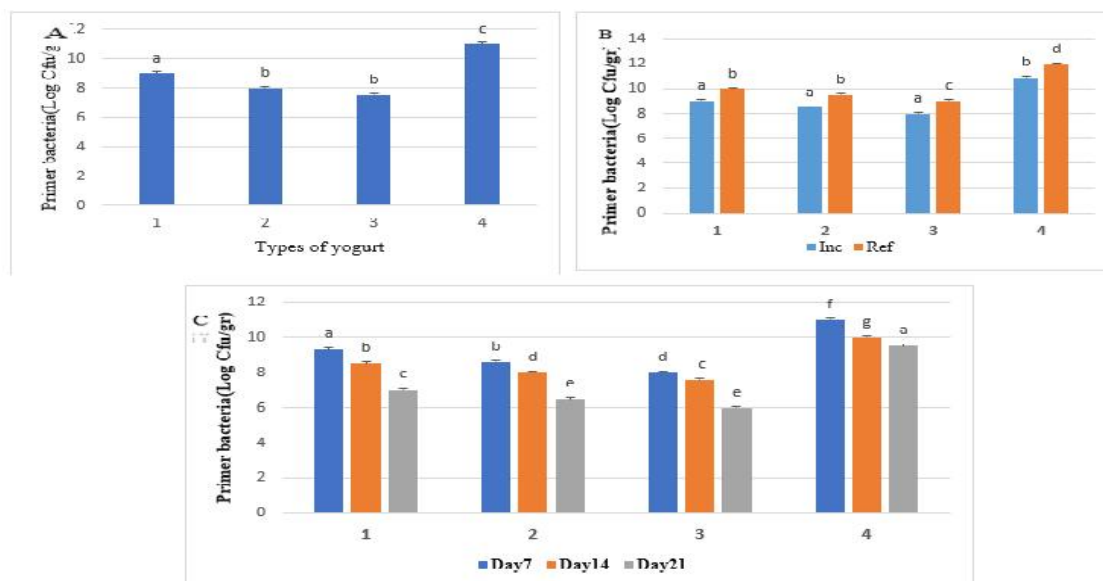
#### فقدان طعم‌های حیوانی و خارجی

منظور از ارزیابی طعم، فقدان طعم حیوانی و هرگونه طعم خارجی نامطلوب و دارا بودن طعم سنتی مطلوب است. نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری روی طعم حیوانی و خارجی نمونه‌های ماست دارد ( $p<0.05$ ) که در (شکل ۴B).

#### طعم ترشی

نتایج آنالیز آماری نشان داد که نوع تیمار اثر معنی‌داری بر طعم ترشی نمونه‌های ماست دارد ( $p<0.05$ ) (شکل ۴C).

#### طعم تندشدگی

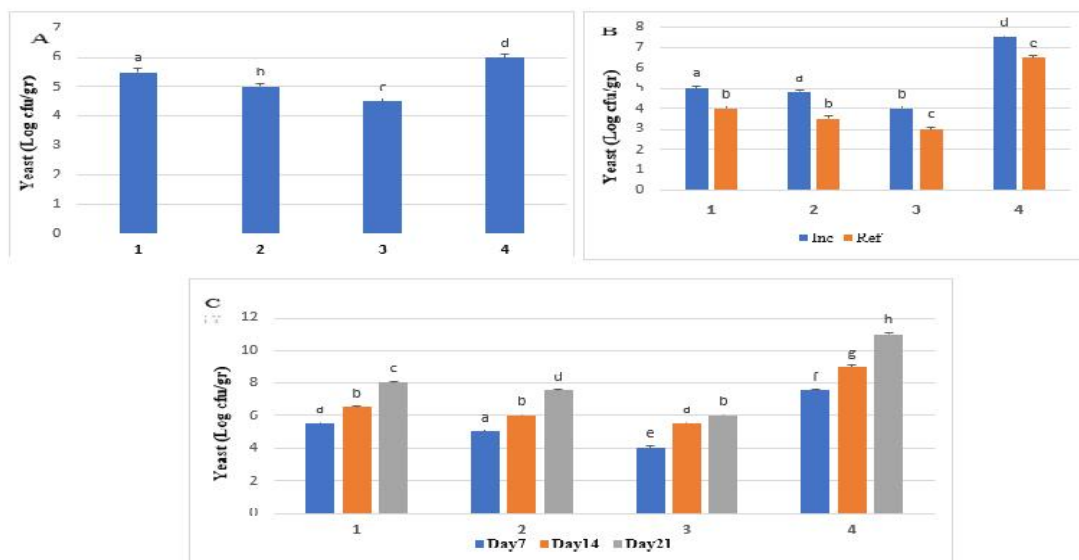


شکل ۲- بررسی تأثیر عوامل مختلف بر شمارش باکتری‌های آغازگر (Log CFU/g): (A) تأثیر غلظت ترخون، (B) تأثیر دمای نگهداری و (C) تأثیر مدت زمان نگهداری.

**Figure 2.** Study of the effect of different factors on the number of initiating bacteria (Log CFU/g), including tarragon concentration (A), storage temperature (B), and storage time (C).

(۱: ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون، ۲: ماست حاوی ۲۵ درصد ترخون، ۳: ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون و ۴: ماست کنترل)

(1: yogurt containing 10% tarragon, 2: yogurt containing 25% tarragon, 3: yogurt containing 30% tarragon and 4: control yogurt)

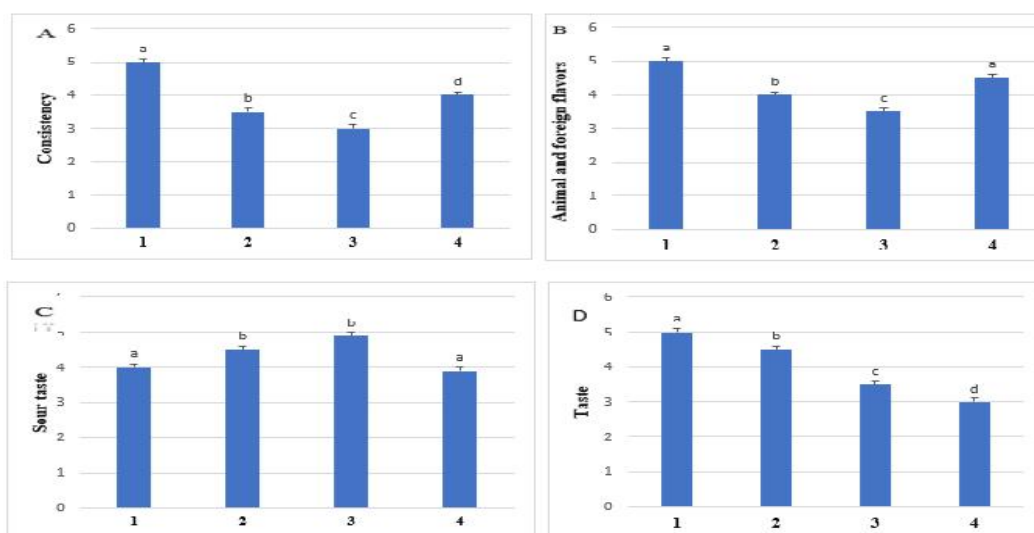


شکل ۳- بررسی تأثیر عوامل مختلف بر شمارش مخمرها (Log CFU/gr)، (A) تأثیر غلظت ترخون، (B) تأثیر دمای نگهداری و (C) تأثیر مدت زمان نگهداری.

**Figure 3.** Study of the effect of different factors on yeast count (Log CFU/gr), including tarragon concentration (A), storage temperature (B), and storage time (C).

(۱: ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون، ۲: ماست حاوی ۲۵ درصد ترخون، ۳: ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون و ۴: ماست کنترل)

(1: yogurt containing 10% tarragon, 2: yogurt containing 25% tarragon, 3: yogurt containing 30% tarragon and 4: control yogurt)



شکل ۴- ارزیابی ویژگی‌های حسی ماست، نمودار ارزیابی قوام (A)، طعم حیوانی و خارجی (B)، طعم ترشی (C) و طعم (D) ۴ نمونه ماست.

**Figure 4.** Evaluation of sensory properties of yogurt, Evaluation of consistency (A), animal and foreign flavors (B), sour taste (C), and taste (D) of 4 samples of yogurt.

(۱: ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون، ۲: ماست حاوی ۲۵ درصد ترخون، ۳: ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون و ۴: ماست کنترل).

(1: yogurt containing 10% tarragon, 2: yogurt containing 25% tarragon, 3: yogurt containing 30% tarragon and 4: control yogurt).

قوام و طعم ترشی از سوی پانلیست‌ها افزایش و امتیاز مربوط به ویژگی‌های طعم حیوانی و خارجی کاهش یافت. پانلیست‌ها بیشترین امتیاز در مورد ویژگی طعم خوب ماست را به ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون دادند. ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون

در ارزیابی حسی نمونه‌های ماست مشخص شد که غلظت‌های مختلف ترخون بر ویژگی‌های قوام، طعم حیوانی و خارجی، طعم ترشی و طعم ماست اثر معنی‌داری دارد ( $p < 0.05$ ). با افزایش غلظت ترخون در نمونه‌های ماست، امتیاز مربوط به ویژگی‌های

در مقایسه با نمونه کنترل و سایر تیمارها بیشترین امتیاز را از سوی پانلیست‌ها به خود اختصاص داد که به دلیل دارا بودن بافت مناسب، میزان ظرفیت نگهداری آب کم و نداشتن طعم ترش و تندشدگی نسبت به نمونه‌های کنترل و همچنین فقدان هرگونه طعم حیوانی و خارجی نسبت به نمونه‌های حاوی غلظت‌های بالای ترخون بود (شکل D۴).

### بحث

در این تحقیق نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری، میزان ظرفیت نگهداری آب ماست سنتی افزایش می‌یابد که این یافته با داده‌های گزارش شده (Al-Kadamany et al., 2003) مطابقت دارد. در مطالعات پیشین، با توجه به هیدرولیز و هضم پروتئین‌های محصول توسط میکروارگانیسم‌ها با افزایش زمان نگهداری، میزان آب اندازی ماست میوه‌ای افزایش می‌یابد چرا که پروتئین‌های عامل بافت مطلوب، خاصیت خود را از دست داده و پیوند آن‌ها با آب شکسته می‌شود. روند مشابهی توسط دیگر محققین نشان داده شده است (Tarakçi & Kucukoner, 2003). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت ترخون، تعداد باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های ماست کاهش می‌یابد؛ به طوری که ماست کنترل و ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر شمارش میکروبی Log CFU/gr را به خود اختصاص دادند. در مطالعات قبلی فعالیت ضد باکتریایی ترخون TEO علیه *E. coli*، *S. aureus*، *Salmonella typhimurium*، *L. monocytogenes*، *Bacillus cereus* و *Yersinia enterocolitica* گزارش گردیده است و نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت *E. coli* و *Y. enterocolitica* به ترخون نسبت به سایر باکتری‌ها بیشتر است (Bonyadian and Moshtaghi, 2008). در برخی مطالعات دیگر باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در مقابل اسانس ترخون مقاومت بیشتری دارند که دلیل آن انتشار محدود ترکیبات آب‌گریز از طریق ساختار دیواره سلولی آب دوست مانند لیپوپلی ساکارید است (Amensour et al., 2010; Sulaiman et al., 2011). در مطالعه مشابهی، محققان به این نتیجه رسیدند که اسانس ترخون با ایجاد کمترین ناحیه عدم رشد (۱۸ میلی‌متر) توانست رشد سلول‌های مخمر را مهار کند (Najafi et al., 2019). که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که با افزایش غلظت ترخون، تعداد باکتری‌های آغازگر و مخمر کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس ترخون بر رنگ نمونه‌های ماست اثر ندارد. این نتیجه با داده‌های گزارش شده

پیشین مطابقت دارد (Seo et al., 2011). مطالعات نشان دادند که تمام خصوصیات حسی نمونه‌های شیر مورد مطالعه هنگامی که به مدت ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند تفاوت معناداری ندارند (Seo et al., 2011). نتایج حاصله در مطالعه‌ای دیگر نشان داد که ماست حاوی ترخون می‌تواند در صنایع غذایی به کار گرفته شود. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که فرایند تخمیر تغییر اساسی روی طعم اسانس نمی‌گذارد (Kalhori, 2008). در این مطالعه به این نتیجه رسیدیم که اسانس ترخون از لحاظ طعمی قابل پذیرش است و طعم بهتری به ماست اضافه می‌کند. بر اساس نتایجی که در این مطالعه به دست آمد، پیشنهاد می‌گردد اسانس ترخون با غلظت ۱۰ درصد به ماست اضافه شود تا محصول ماستی با کیفیت بالا و طعم خوشمزه و ماندگاری بیشتر حاصل گردد.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترخون میزان ظرفیت نگهداری آب نمونه‌های ماست کاهش یافت. میزان ظرفیت نگهداری آب در دمای یخچال بسیار بیشتر از دمای اتاق بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت ترخون، تعداد باکتری‌های آغازگر و مخمر کاهش یافت و بیشترین کاهش در ماست حاوی ۳۰ درصد ترخون مشاهده شد. لذا بر اساس این نتیجه توصیه می‌شود، برای به دست آوردن ماست با کیفیت بالاتر و ماندگاری بیشتر از افزودن ترخون با غلظت ۳۰ درصد به ماست استفاده شود. ارزیابی‌های حسی نیز نشان داد که ماست حاوی ۱۰ درصد ترخون بالاترین امتیاز را از سوی پانلیست‌ها به خود اختصاص داد که حاکی از مطلوب بودن این نوع ماست است. لذا پیشنهاد می‌شود برای به دست آوردن ماست با قوام خوب، طعم خوشمزه، محبوبیت بالا و هزینه کمتر از ترخون با غلظت ۱۰ درصد به ماست استفاده شود.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از داوران محترم مجله یافته‌های نوین در علوم زیستی برای ارائه پیشنهادهای سازنده تشکر می‌نمایند.

### REFERENCES

- Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T. & Toufeili, I. 2003. Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)-Food Science and Technology* 36: 407-414.

- Amatayakul, T., Halmos, A.L., Sherkat, F. & Shah, N.P. 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal* 16: 40-51.
- Amensour, M., Bouhdid, S., Fernández-López, J., Idaomar, M., Senhaji, N.S. & Abrini, J. 2010. Antibacterial activity of extracts of *Myrtus communis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Properties* 13: 1215-1224.
- Bendall, J.G., Crawford, R.A., Evers, J.M., Smythe, B.W., Bessaire, T., Mottier, P., Mujahid, C., Aleksic, G. & Hutchinson, R. 2019. Determination of nitrofurazone in fluid milk and dairy powders. Part 1: An international pilot study. *International Dairy Journal* 91: 185-192.
- Bonyadian, M. & Moshtaghi, H. 2008. Bacteriocidal activity of some plants essential oils against *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *Research Journal of Microbiology* 3: 648-653.
- Chuesiang, P., Siripatrawan, U., Sanguandeeul, R., Yang, J.S., McClements, D.J. & McLandsborough, L. 2019. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)-Food Science and Technology* 110: 190-196.
- Farnsworth, J., Li, J., Hendricks, G. & Guo, M. 2006. Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research* 65: 113-121.
- Hajiei, M., Khodaiyan, F. & Pourahmad, R. 2017. The effect of kefir as a fat replacer on physicochemical properties, sensory and microbial stirred fruit yoghurt. *Iranian Journal of Biosystems Engineering* 48: 427-433.
- Iranian National Standardization Organization. 1398. Yoghurt-specifications and test methods. 695. <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=52740>.
- Kalhor, R. 2008. The effect of using tarragon and thyme essential oils along with wheat germ powder on some properties of plain yogurt. 17th National Congress of Food Industry of Iran, Urmia University: 54-58.
- Ledenbach, L.H. & Marshall, R.T. 2009. Microbiological spoilage of dairy products. In compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Springer New York: 41-67.
- Lu, M. & Wang, N. 2017. Chapter 7-spoilage of milk and dairy products BT-the microbiological quality of food. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Mahmoudi, R., Norian, R., Pajohi-Alamoti, M.R. & Aliakbarlu, J. 2014. Effect of season on microbial and chemical characteristics of milk and yoghurt from sheep. *Animal Production Science* 54: 1091-1094.
- Mohammadi, A., Hashemi, M. & Hosseini, S.M. 2015. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 28: 73-80.
- Mohammadi, A., Hosseini, S.M. & Hashemi, M. 2020. Emerging chitosan nanoparticles loading-system boosted the antibacterial activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Industrial Crops and Products* 155: 112824.
- Najafi, M.S., Mortazavi, S.M.H. & Motamedi, H. 2019. Antimicrobial effect of ten essential oils on bacteria and yeast causing date fruit spoilage in rutab stage. *Journal of Applied Microbiology in Food Industries* 5: 14-27.
- Noruzi, F., Hojjati, M., Jooyandeh, H. & Barzegar, H. 2018. Study of the possibility of application of tarragon essential oil in mayonnaise as a natural additive. *Journal of Food Research* 28: 85-99.
- Seo, M.H., Chang, Y., Lee, S. & Kwak, H. 2011. The physicochemical and sensory properties of milk supplemented with ascorbic acid- soluble nano- chitosan during storage. *International Journal of Dairy Technology* 64: 57-63.
- Sulaiman, S., Ibrahim, D., Kassim, J. & Sheh-Hong, L. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3: 436-444.
- Tamime, A.Y. & Robinson, R.K. 2007. Tamime and Robinson's yoghurt: Science and Technology, 3rd ed. CRC Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 759-760.
- Yörük, N.G. 2018. Most probable number technique in *Escherichia coli* count using ISO 16649- 3, ISO 7251, and rapid test enumeration device (TEMPO EC) methods in milk and dairy products. *Journal of Food Safety* 38: e12502.
- Zedan, H., Hosseini, S.M. & Mohammadi, A. 2021. The effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil and high molecular weight chitosan on sensory properties and shelf life of yogurt. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)-Food Science and Technology* 147: 111613.

\*\*\*\*\*

#### How to cite this article:

Zedan, H., Hosseini, S.M. & Mohammadi, A. 2022. The effect of tarragon essential oil on the activity of primer bacteria, mold, and yeast and improving the properties of traditional yogurt. *Nova Biologica Reperta* 9: 40-49. (In Persian).

زیدان، ه.، حسینی، س.م. و محمدی، ع. ۱۴۰۱. تاثیر اسانس ترخون بر فعالیت باکتری‌های آغازگر، کپک و مخمر و بهبود خصوصیات ماست سنتی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۴۹-۴۰.