

## مطالعه رفتار باکتری لیستریامونوسیتوزنز در طی روند تولید پنیر سفید ایرانی تحت تاثیر اسانس آویشن شیرازی

زهره مشاک<sup>۱</sup>، بیژن مرادی<sup>۲</sup>، افشین آخوندزاده بستی<sup>۳\*</sup>، آرش عباسی فر<sup>۴</sup>، حسن گندمی<sup>۵</sup>

- ۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
  - ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
  - ۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
  - ۴- دستیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
  - ۵- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
- \*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، صندوق پستی: ۶۴۵۳ - ۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۹۲۳۵۱۰ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲ (۰۲۱)  
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۱۰

تاریخ تصویب: ۸۷/۶/۱۴

### چکیده

مقدمه: گزارش‌های بسیاری درباره جداسازی لیستریا مونوسیتوزنز از انواع پنیرها موجود است. کاربرد نگهدارنده‌های طبیعی از جمله اسانس آویشن شیرازی در کاهش این آلودگی موثر می‌باشد.

هدف: هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدلیستریایی اسانس آویشن شیرازی بر رفتار باکتری لیستریا مونوسیتوزنز تحت شرایط تولید پنیر سفید ایرانی است.

روش بررسی: روش‌های به کار رفته در این تحقیق مشتمل بر تهیه گیاه، استخراج اسانس و آنالیز آن، تهیه میزان تلقیح باکتریایی، تولید پنیرهای حاوی باکتری لیستریا و غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm)، آزمایش‌ها میکروبی و شیمیایی از نمونه‌های پنیر و بالاخره تحلیل آماری نتایج می‌باشد.

نتایج: نتایج نشان داد که آویشن شیرازی تاثیر معنی‌داری بر تغییرات pH در نمونه‌های پنیر نداشت ( $p < 0.05$ ). هم‌چنین با افزایش غلظت اسانس مزبور در نمونه‌های پنیر، لگاریتم تعداد باکتری‌ها کاهش یافت. به طوری که کاهش رشد باکتری‌ها تحت تاثیر غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm در پنیرها در مقایسه با نمونه‌های فاقد آویشن معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشانگر اثرات بالقوه خوب آویشن شیرازی در پنیر به عنوان یک ماده ضدلیستریایی بود. کاربرد غلظت ۱۵۰ ppm آویشن شیرازی در پنیر سفید ایرانی، می‌تواند سبب سلامت این فرآورده با حفظ اثرات مفید ارگانولپتیکی و کاهش رشد باکتری لیستریا در پنیر شود.

کل واژگان: اسانس آویشن شیرازی، لیستریا مونوسیتوزنز، پنیر سفید ایرانی، استارتر



سلامت مصرف‌کننده ندارد. انتشار این گیاه در ایران، افغانستان و پاکستان بوده و در بسیاری از مناطق ایران به طور سنتی در غذاها به عنوان طعم‌دهنده استفاده می‌شود [۱، ۴].

لیستریا مونوسیژنوز<sup>۱</sup> باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت و کاتالاز مثبت بوده که متابولیسم تنفسی هوازی - بی‌هوازی اختیاری دارد [۵]. بقای آن در حرارت ۰/۱ - تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۹/۵ - ۴/۵ pH دیده شده و در برابر طیف وسیعی از استرس‌های محیطی از جمله نمک ۱۰ درصد [۶] و خشکی مقاوم است [۵، ۷]. اغلب از طریق آب آلوده، غذای آلوده و آلودگی متقاطع، عفونت لیستریایی (لیستریوز) رخ می‌دهد که با علایمی شبیه آنفلوانزا، سپتی سمی و مننژیت خصوصاً در نوزادان، خانم‌های باردار، افراد مسن و اشخاص با نقص سیستم ایمنی همراه می‌باشد [۵]. تاکنون موارد بسیاری از شیوع لیستریوز در انسان توسط مصرف انواع غذاها نظیر شیر و فراورده‌های لبنی ارائه شده است که بیش‌ترین موارد سفید ایرانی نیز از این دسته می‌باشد [۲، ۸، ۹]. ناکارآمدی حرارت پاستوریزاسیون در نابودی کامل این باکتری (در صورتی که تعداد باکتری بیش از ۱۰<sup>۳</sup>cfu/ml در شیر باشد) [۲] و هم‌چنین رشد آن در دمای یخچالی ۴ درجه سانتی‌گراد (که در صورت نگه داری طولانی مدت پنی‌های آلوده در این دما موجب افزایش تعداد باکتری می‌گردد) اهمیت بررسی این باکتری را بیشتر آشکار می‌سازد [۹]. بنابراین در این مطالعه رفتار باکتری لیستریا منوسیژنوز در پنی سفید ایرانی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی (صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm) در مدل غذایی پنی سفید ایرانی (دارای استراتر و فاقد آن) در طی زمان‌های مختلف تولید پنی تحت بررسی قرار گرفت. این غلظت‌ها بر اساس آزمایش‌های انجام شده در تحقیقات پیشین تعیین و تلقیح شد [۴].

با توجه به اثرات مضر نگه دارنده‌های شیمیایی غذایی، استفاده از نگه دارنده‌های طبیعی رشد روزافزونی دارد. اسانس‌ها<sup>۱</sup> (روغن‌های فرار یا روغن‌های اتری) مایعات روغنی معطری هستند که از اجزای مختلف گیاه به دست می‌آیند [۱]. خواص ضد میکروبی اسانس‌ها سال‌ها است که شناخته شده است و امروزه رویکرد عموم مردم و هم‌چنین سایر سازمان‌های ملی و بین‌المللی مسؤول در زمینه بهداشت مواد غذایی در استفاده از نگه دارنده‌های طبیعی مختلف به جای مواد شیمیایی منجر به تمایل بیشتر برای شناخت علمی این مواد شده است [۱، ۲]. اما اثرات ناخواسته احتمالی که اسانس‌ها در مقادیر زیاد بر طعم، مزه، بو و رنگ غذا می‌گذارند، استفاده از آن‌ها را به تنهایی به عنوان یک نگه دارنده غذایی محدود می‌سازد. بنابراین تکنولوژی مانعی<sup>۲</sup> در بهداشت مواد غذایی [۳]، به صورت بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف و توأم با سایر عوامل درون اثر و برون اثر علیه باکتری‌های پاتوژن مهم غذازاد، ابتدا در محیط‌های کشت آزمایشگاهی و سپس در فراورده‌های غذایی، در قالب مطالعات تلقیحی<sup>۳</sup> مورد استفاده قرار می‌گیرد که در نهایت می‌تواند به صورت مدل‌های پیشگویی‌کننده رشد میکروبی در مواد غذایی و جهت تامین سلامتی انسان‌ها به کار برده شود.

اسانس‌ها با داشتن خاصیت آب‌گریزی موجب نفوذ در لیپید غشایی<sup>۴</sup> سلول باکتری شده و منجر به خارج شدن یون‌ها و محتویات سلولی از آن می‌شوند. خروج این مواد از سلول، با ایجاد اختلال در عملکرد سلولی باعث مرگ آن می‌شود [۱، ۲]. آویشن شیرازی<sup>۵</sup> از خانواده‌ی نعناع<sup>۶</sup> حداقل واجد ۰/۶ درصد اسانس و هم‌چنین مقادیری از اسیدهای چرب<sup>۷</sup>، اسید التانولیک<sup>۸</sup>، بتاسیتوسترول<sup>۹</sup> و بتولین<sup>۱۰</sup> است [۴]. ترکیبات اسانس آویشن شیرازی توسط کمیسیون اروپایی جهت استفاده به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی به ثبت رسیده است که خطری برای

<sup>1</sup> Essential oils

<sup>3</sup> Inoculums Pack Study

<sup>5</sup> *Zataria multiflora* Boiss.

<sup>7</sup> Fatty Acid

<sup>9</sup>  $\beta$ -Cytosterol

<sup>2</sup> Hurdle Technology

<sup>4</sup> Cell Membrane

<sup>6</sup> Lamiacea

<sup>8</sup> Oleanolic acid

<sup>10</sup> Betoline

<sup>1</sup> *Listeria monocytogenes*



## مواد و روش‌ها

**الف. تهیه گیاه، اسانس و آنالیز آن:** گیاه آویشن شیرازی از استان فارس در فصل تابستان جمع‌آوری شد و نام علمی گیاه توسط پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی تایید شد. چون اسانس گیاه در مقایسه با عصاره یا پودر آن خاصیت ضد میکروبی بیشتری دارد، به روش تقطیر با بخار آب از سرشاخه‌های هوایی گیاه تهیه شد و سپس توسط دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف نگار جرمی<sup>۱</sup> تحلیل قرار گرفت. بدین منظور دستگاه Thermoquest GC/MS Finnigan با ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاق تریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گاز حاصل، هلیوم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. هم‌چنین شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

**ب. تهیه میزان تلقیح باکتریایی:** ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری لیستریا منوسایتوزنز، ATCC 19118 تهیه شده از بخش میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران دو مرتبه به طور متوالی در محیط<sup>۲</sup> BHI Broth در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، کشت داده شد. سپس جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت مرحله دوم مقادیر مختلفی به کووت‌های<sup>۳</sup> حاوی ۵ میلی‌لیتر BHI Broth استریل منتقل شده و با استفاده از خواندن جذب نوری کووت‌های مذکور (Abs: ۰/۱۷۵ - ۰/۱۹۰) در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، کووت حاوی حدود ۱۰۷ cfu/ml جهت تلقیح به نمونه‌های مورد آزمایش مشخص شد [۴،۹].

**ج. تهیه پنیر سفید ایرانی:** استارتر به کمک شیر باز ساخته (شیر خشک بدون چربی و آب مقطر استریل به نسبت ۱۱ درصد) و باکتری‌های لیوفلیزه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس شرکت‌های ANISCO/Bulk Culture Set و CHR HANSEN ساخته شد که به نسبت برابر و ۰/۵ درصد، تحت شرایط استریل در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به آن افزوده شد. برای تولید پنیر، شیر پاستوریزه تازه و کامل گاو به مقدار ۵ لیتر درون ظروف مخصوص پنیرسازی ریخته و به دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس با تلقیح سوسپانسیون باکتری لیستریا منوسیتوزنز از کووت حاوی حدود ۱۰۷ cfu/ml، به نسبت ۱/۱۵۰۰۰ در شیر، تعداد نهایی باکتری مورد نظر به ۱۰۳ cfu/ml در نمونه‌ها رسانده شد [۴].

پس از آن به نمونه‌های شیر، مقدار ۰/۵ درصد از استارتر ساخته شده و پس از نیم ساعت مقدار ۰/۰۲ درصد کلرید کلسیم افزوده شد. در همین زمان نیز اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm به نمونه‌ها اضافه شد. پس از رسیدن pH شیر به ۵/۶، رنت<sup>۱</sup> حل شده در آب مقطر استریل به مقدار ۰/۰۰۱ درصد افزوده و یکنواخت شد. پس از نگهداری نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، لخته حاصله به صورت قطعات ۱ الی ۲ سانتی‌متر مکعبی برش خورد و به مدت شش ساعت تحت فشار وزنه استریل آگیری شد. سپس لخته فشرده قطعه قطعه شده و به مدت ۸ ساعت در آب نمک ۲۰ درصد استریل و پس از آن تا پایان روز شصت در آب نمک ۸ درصد استریل قرار داده شد. نمونه‌ها ابتدا، به مدت ۱۵ روز در دمای ۱۴ درجه و سپس به مدت ۴۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**د. کشت میکروبی و آزمایش‌های شیمیایی:** در آزمایش‌های میکروبی که به منظور شمارش لیستریا منوسیتوزنز انجام شد از محیط آگار انتخابی لیستریا (پالکام)<sup>۲</sup> به روش کشت سطحی استفاده شد و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد

<sup>۱</sup> Gas Chromatography/ Mass Spectrophotometer (GC/MS)

<sup>۲</sup> Brain Heart Infusion Broth

<sup>۳</sup> Cuvett

<sup>۱</sup> Rennet

<sup>۲</sup> (PALCAM) Listeria Selective Agar



آویشن شیرازی (صفر، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ ppm) در دوره‌های زمانی مشابه، اختلاف آماری (آنالیز واریانس) معنی‌داری را نشان ندادند ( $p < 0/05$ ).

نمودار شماره ۲ و ۳ به ترتیب نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز در نمونه‌های پنیر و هم‌چنین آب نمک در طی فرایند تولید پنیر است؛ به عبارتی با افزایش غلظت اسانس، تعداد باکتری کاهش می‌یابد. به طوری که کاهش معنی‌دار لگاریتم تعداد باکتری در نمونه‌های پنیر و آب نمک به طور مشابه در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm آویشن شیرازی در مقایسه با نمونه‌های فاقد اسانس دیده می‌شود ( $p < 0/05$ ).

## بحث

از دیرباز اثر بازدارندگی رشد میکروبی اسانس‌های گیاهی شناخته شده و به تازگی توجه زیادی به سوی تاثیر آن‌ها بر روی عوامل پاتوژن و فساد مواد غذایی معطوف شده است [۲۰۱]. در این راستا بررسی اثر اسانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های پاتوژن غذازاد مانند لیستریا مونوسی‌توزنز نشان دهنده تلاش محققان برای جایگزین نمودن نگه دارنده‌های طبیعی به جای نگه دارنده‌های شیمیایی می‌باشد [۲۰۱].

تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد اثر سینرژیستی اجزای مختلف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی مختلف جهت افزایش قدرت ضد میکروبی آن‌ها انجام شده است. به طوری که تاثیر ضد میکروبی توام دو جز کارواکرول و تیمول موجود در اسانس آویشن شیرازی بیش‌تر از تاثیر هر یک از آن‌ها به تنهایی گزارش شده است [۱۳، ۱۲، ۱]. کارامان<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۱) و رسولی<sup>۲</sup> و میرمصطفی<sup>۳</sup> (۲۰۰۲) در مطالعات خود فعالیت ضد میکروبی بالای اسانس‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولیک (کارواکرول و تیمول) را خاطر نشان نمودند [۱۲]. در بررسی دیگر نیز توسط ناواس<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۹۶) نشان داده

به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت نگهداری شد [۵، ۱۰] و در آزمایش‌های شیمیایی نیز اندازه‌گیری pH توسط دستگاه pH متر دیجیتال کارخانه Corning و در طی مراحل زیر صورت پذیرفت:

- نمونه‌برداری از شیر در ساعت صفر (لحظه تلقیح باکتری) و ساعت نیم (پس از افزودن استارتر و رنت)
- نمونه‌برداری از لخته تشکیل شده در ساعت ۱/۵ (پس از ایجاد لخته) و ساعت ۷/۵ (پس از آبیگری لخته)
- نمونه‌برداری از پنیر و آب نمک در ساعت ۱۶۸ (روز هفتم)، ساعت ۳۶۰ (روز پانزدهم و متعاقب تمام دوره رسیدن اولیه پنیر در انبار سبز)، ساعات ۷۲۰ (روز ۳۰)، ۱۰۸۰ (روز ۴۵) و ۱۴۴۰ (روز ۶۰). [۲۰۹].

۵. **تحلیل آماری:** جهت بررسی تغییرات لگاریتم تعداد باکتری و pH نمونه‌های پنیر و آب نمک آن، تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی در طی زمان تولید پنیر، از ضریب همبستگی و آزمون آنالیز واریانس SPSS 15.0 for Windows استفاده شد. بررسی اختلافات شاخص توسط آزمون Tukey در  $p < 0/05$  و  $p < 0/01$  انجام گرفت.

## نتایج

ترکیبات اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این تحقیق با استفاده از GC/MS بررسی شد که در این میان کارواکرول<sup>۱</sup> (با میزان ۷۱/۱۲ درصد) بیشترین ترکیب موجود در اسانس را دارا بود. سایر ترکیبات اسانس عبارت بود از گاما ترپنین<sup>۲</sup> (۷/۳۴ درصد)، آلفا پنین<sup>۳</sup> (۴/۲۶ درصد)، اکالیپتول<sup>۴</sup> (۳/۳۷ درصد)، گلوبولول<sup>۵</sup> (۲/۳۲ درصد)، بتا میرسین<sup>۶</sup> (۰/۸۵ درصد)، لینالول<sup>۷</sup> (۰/۶۸ درصد)، تیمول متیل اتر<sup>۸</sup> (۰/۴۷ درصد) و سایر ترکیبات فرعی.

نتایج موجود در نمودار شماره ۱ نیز نشانگر عدم تاثیر اسانس آویشن شیرازی بر تغییرات pH است. به طوری که تغییرات pH در طی تولید پنیرها تحت اثر غلظت‌های مختلف

<sup>1</sup> Carvacrol

<sup>3</sup> Alpha-Pinene

<sup>5</sup> Globulol

<sup>7</sup> Linalool

<sup>2</sup> Gamma-Terpinene

<sup>4</sup> Eucaliptol

<sup>6</sup> Beta-Myrcene

<sup>8</sup> Thymol Methyl Ether

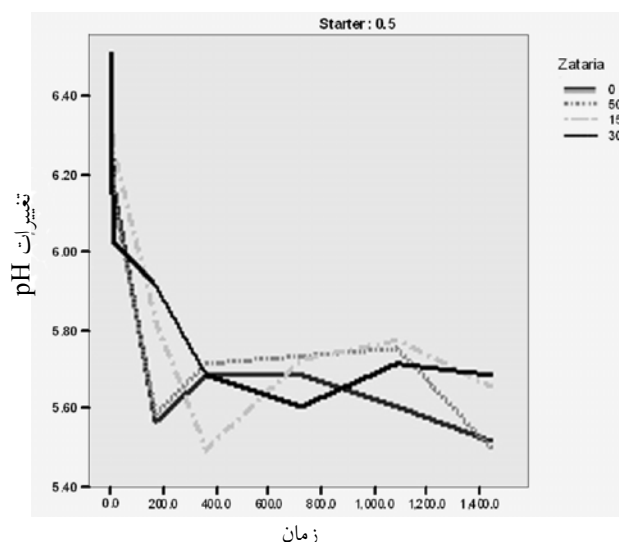
<sup>1</sup> Karaman  
<sup>3</sup> Mirmostafa

<sup>2</sup> Rasooli  
<sup>4</sup> Navas

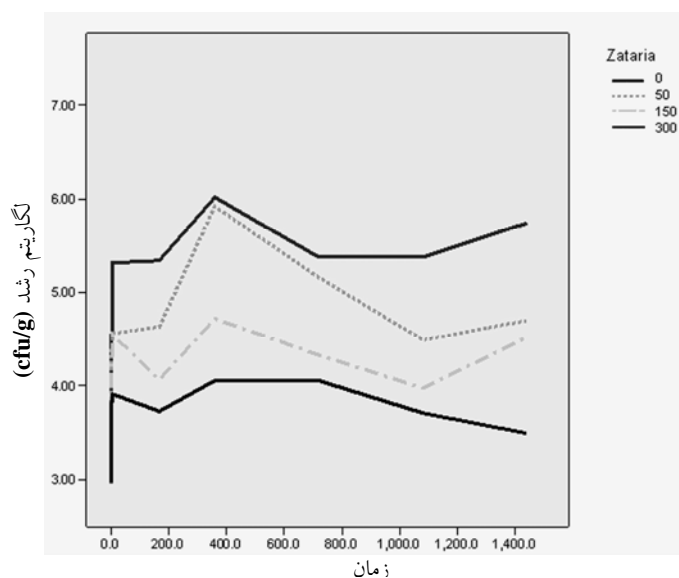


تغییرات کاهشی pH در طی روند ساخت و نگهداری پنیر در طی زمان‌های مختلف نمونه‌برداری قابل توجه می‌باشد و حداقل pH که حدود ۵/۵ می‌باشد به طور متوسط در ساعات ۳۶۰ مشاهده شده است. به نظر می‌رسد که کاهش pH در نمونه‌های پنیر به علت وجود میکروارگانیسم‌های مولد اسیدلاکتیک و اسیدهای آلی موجود در استارتر باشد [۱۱].

شد که آویشن کوهی در مقایسه با سایر اسانس‌های گیاهی، به دلیل مقادیر بالای کارواکرول و تیمول از خاصیت ضد میکروبی بالاتری برخوردار می‌باشد [۱۴]. نتایج حاصل از تجزیه اسانس آویشن شیرازی در این مطالعه نیز مشابه مطالعات قبلی دال بر وجود ترکیبات کارواکرول (بیشترین ترکیب به میزان ۷۱/۱۲ درصد) و تیمول در اسانس می‌باشد. در این مطالعه

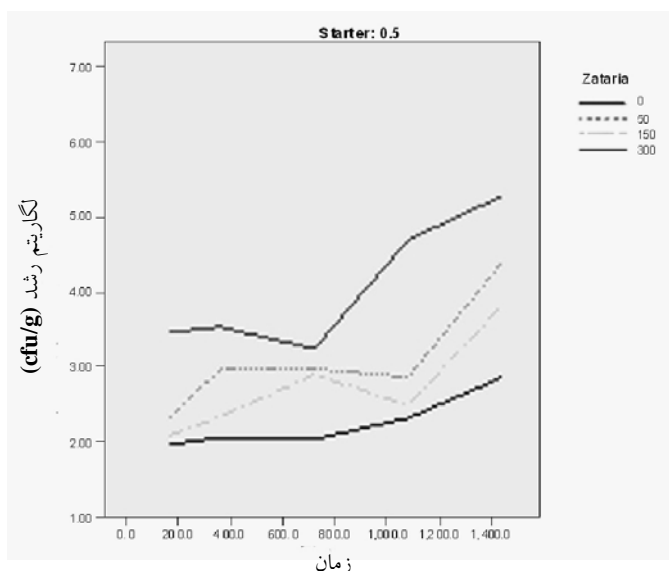


نمودار شماره ۱- تغییرات pH در نمونه‌های پنیر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (ppm) طی زمان تولید پنیر (ساعت)



نمودار شماره ۲- لگاریتم رشد لیستریا (cfu/g) در نمونه‌های پنیر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (ppm) طی زمان تولید پنیر (ساعت)





نمودار شماره ۳- لگاریتم رشد لیستریا مونوسیتوژنز (cfu/ml) در نمونه‌های آب نمک مورد استفاده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (ppm) طی زمان تولید پنیر (ساعت)

آن در نمونه‌های آب نمک می‌گردد ( $p < 0.05$ ). کوتر<sup>۱</sup> (۲۰۰۱) تاثیر عصاره گیاهان مختلف را بر باکتری‌های اشرشیاکلی، سالمونلاتیفی موریوم و لیستریا مونوسیتوژنز در گوشت گوساله بررسی کرد و نتیجه گرفت که کاربرد عصاره گیاهان مزبور در گوشت، سبب کاهش جمعیت باکتری‌ها می‌شود [۱۶]. در مطالعه پالمر<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۱) نیز اثرات اسانس برگ بو، میخک، دارچین و آویشن در غلظت‌های صفر، ۰/۱ و ۱ درصد، در پنیرهای نرم علیه لیستریا مونوسیتوژنز در طی ۱۴ روز بررسی شد که هر چهار اسانس در غلظت ۰/۱ درصد سبب کاهش تعداد لیستریا تا کم‌تر از یک کلنی در هر گرم شد [۲]. در این مطالعه نیز با کاربرد اسانس آویشن شیرازی (۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ ppm) کاهش معنی‌داری در لگاریتم تعداد باکتری لیستریا در مقایسه با نمونه‌های فاقد آویشن مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ بالاترین اثر مهاري را بر رشد باکتری در نمونه‌های پنیر و آب نمک نشان دادند و به طور چشم‌گیری از افزایش باکتری جلوگیری کردند. ضریب همبستگی غلظت اسانس با لگاریتم باکتری در نمونه‌های پنیر برابر ۰/۴۵۸- بود که نشانگر کاهش میزان رشد باکتری همگام با افزایش غلظت اسانس به کار برده شده می‌باشد ( $p < 0.01$ ).

در این مطالعه هیچ‌یک از غلظت‌های آویشن شیرازی (صفر، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰ ppm) بر تغییرات pH حاصله در طی تولید و نگهداری و در دوره‌های زمانی، از نظر آماری (آنالیز واریانس) تاثیر معنی‌داری نداشت ( $p < 0.05$ ). به عبارتی غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی تاثیر معنی‌داری بر رشد و فعالیت باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک موجود در استارتر به کار برده شده در پنیرها، یا به بیان دیگر کاهش pH پنیرها ندارد. در بررسی‌های به عمل آمده اظهار شده است که با وجود اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها بر روی مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت، این تاثیر بر روی مهار رشد باکتری‌های مولد اسید لاکتیک موجود در استارتر چشمگیر نبوده است [۱۰]. زایکا<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۸۳) نیز در مطالعه مشابهی هیچ‌گونه اثر مهاري در غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی (۲۰۰-۴۰ ppm) را بر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک نظیر لاکتوباسیلوس پلاننتوروم و پدیوکوکوس اسیدولاکتیس در محیط کشت مایع مشاهده نمودند [۱۵].

براساس نتایج این مطالعه، اسانس آویشن شیرازی از خاصیت ضد لیستریایی برخوردار بوده و کاربرد آن سبب کاهش لگاریتم باکتری لیستریا در نمونه‌های پنیر و به موازات

<sup>1</sup> Cutter

<sup>2</sup> Palmer

<sup>1</sup> Zaika



هم‌چنین تغییر حرارت محیط نیز عامل دیگری جهت کنترل رشد لیستریا مونوسیتوژنز محسوب می‌شود [۷،۹].

لیستریا مونوسیتوژنز قادر به بقا در شرایط محیطی مختلفی نظیر محلول نمکی ۱۰ درصد، دمای یخچالی ۴ درجه سانتی‌گراد و pH ۳/۵-۵/۵ بوده که این قابلیت تطبیق با محیط، کنترل آن را در محصولات غذایی با مشکل رو به رو می‌سازد [۸،۱۹]. امروزه به دلیل اثرات سو و محدودیت در کاربرد هر یک از فاکتورهای داخلی و خارجی محدودکننده رشد باکتری‌ها به تنهایی، از عوامل چند فاکتوری<sup>۱</sup> به صورت توأم با یکدیگر و در مقادیر کمتر از حدمطلوب<sup>۲</sup>، به منظور مهار رشد باکتری در غذا و هم‌چنین حفظ ویژگی‌های حسی و حفظ ارزش غذایی فرآورده‌های غذایی مختلف استفاده می‌شود [۳،۷].

به طوری که در مطالعات بستی<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر فاکتورهای مختلفی نظیر غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی (صفر، ۰/۱۵، ۰/۰۳ و ۰/۰۶ درصد)، pH (۷/۳ و ۶) و دماهای نگهداری (۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتی‌گراد) در زمان نگهداری بیش از ۴۳ روز، بر میزان رشد باکتری سالمونلاتیفی موریوم و استافیلوکوکوس ارئوس در محیط BHI Broth مدل‌سازی شد و توقف رشد هر دو باکتری تحت تاثیر عوامل چند فاکتوری نظیر غلظت ۰/۰۶ درصد اسانس آویشن شیرازی pH ۶ و دماهای پایین‌تر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد [۴]. رضویلر<sup>۴</sup> و همکاران (۱۹۹۸) در مطالعات خود اثرات تلقیح تعداد ۱۰۵ - ۱ باکتری را در pH پایین و با غلظت‌های بالای مواد شیمیایی گزارش نمودند و نتیجه گرفتند که هر چه میزان تلقیح اولیه باکتریایی بیشتر باشد، اولاً رشد آن‌ها در مراحل بعدی بیشتر بوده و ثانیاً جهت مهار آن‌ها باید عوامل مهارکننده در غلظت‌های بیشتری به کار برده شوند [۷]. بنابراین در مطالعات اخیر به میزان تلقیح باکتریایی اولیه و بررسی روند رشد آن اهمیت زیادی داده می‌شود [۲۰]. رابینسون<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۰۱) رشد لیستریا مونوسیتوژنز را با

بر طبق نمودار لگاریتم رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر (نمودار شماره ۲) لگاریتم تعداد باکتری در ساعات آغازین تهیه پنیر (طی ۷/۵ ساعت اولیه) به میزان  $\log 2/5 - 1$  افزایش می‌یابد که در مقایسه با میزان رشد باکتری در سایر مراحل تولید پنیر قابل توجه می‌باشد ( $p < 0/01$ ). اما بر اساس نتایج حاصله کاربرد غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ ppm اسانس آویشن شیرازی می‌تواند به طور معنی‌داری از افزایش لگاریتم باکتری‌ها در این مرحله جلوگیری کند ( $p < 0/05$ ).

این رشد قابل توجه باکتری در ساعات اولیه تولید پنیر می‌تواند به دلیل اثرات محافظتی ترکیبات غذا بر روی میکروارگانیسم مزبور باشد [۱۷]. هم‌چنین وجود عوامل مهاری داخلی و خارجی پنیر نظیر استارتر، تغییر میزان aw، درصد نمک، pH، درجه حرارت، نوع سویه باکتریایی و میزان تلقیح باکتری می‌تواند در کند شدن رشد باکتری پس از ۷/۵ ساعت اولیه تولید پنیر موثر باشد. پیش از این نیز فعالیت ضد میکروبی استارترها به واسطه توانایی کاهش مقادیر pH ناشی از تولید اسید لاکتیک، رقابت برای مصرف ماده غذایی و تولید مواد باکتریوسیدال یا باکتریواستاتیک از جمله باکتریوسین‌ها یا پراکسید هیدروژن به اثبات رسیده است [۱۱]. در مطالعه رودرینگیوز<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۵) نیز اثر ضد میکروبی باکتری‌های لاکتوکوکوس لاکتیس موجود در استارتر پنیر، بر مهار رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشیریشیا کولی در مقایسه با پنیرهای فاقد استارتر آورده شده است [۱۸]. میل<sup>۲</sup> (۲۰۰۶) نیز دریافت که مهار رشد لیستریا در طی دوره رسیدن پنیرهای تولید شده با شیر غیرپاستوریزه، حاصل تغییرات pH و محتوای L-لاکتات می‌باشد [۹].

هم‌چنین دوچه<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعات خود به کاهش تولید پروتئین‌های باکتری در محیط نمکی ۱۰ درصد اشاره نمودند. پروتئین‌های مزبور شامل آنزیم‌های حیاتی جهت انجام واکنش‌های کاتابولیک در باکتری می‌باشد. بنابراین کاربرد نمک بالا سبب کاهش aw و مرگ باکتری می‌شود [۶].

<sup>1</sup> Multifactorial

<sup>3</sup> Basti

<sup>5</sup> Robinson

<sup>2</sup> Sub Optimal

<sup>4</sup> Razavilar

<sup>1</sup> Rodriguez

<sup>3</sup> Duche

<sup>2</sup> Millet



ترکیبات غذا، حالات فیزیولوژیکی سلول‌های ریشی و اسپورها و ... در سالیان اخیر مطالعه شده است و اخیراً مدل‌های ریاضی به منظور توصیف و یافتن کمیت واقعی این فاکتورهای محیطی به عنوان عوامل غیرفعال‌کننده لیستریا مونوسی‌توزنز تحت بررسی می‌باشد. در ادامه مطالعه کنونی بررسی اثرات این اسانس یا سایر اسانس‌های گیاهی بومی کشور توام با سایر فاکتورهای محیطی روی میکروب‌های پاتوژن و مولد فساد در مواد غذایی دیگر پیشنهاد می‌شود و به دنبال آن تهیه مدل‌سازی رشد انواع میکروب‌های پاتوژن در غذاهای مختلف توصیه می‌شود.

تلقیح اولیه ۱۰۵ cfu/ml - ۱ و نمک ۱/۸ مولار را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار دادند [۲۰].

در پایان باید خاطر نشان ساخت که یافته‌های این پژوهش نشانگر اثرات بالقوه ضد لیستریایی آویشن شیرازی در پنیر بود که قابل پذیرش مصرف‌کنندگان و سازمان‌های مسؤول ملی و بین‌المللی دخیل در امر بهداشت مواد غذایی، در مقایسه با سایر ترکیبات افزودنی شیمیایی می‌باشد. کاربرد غلظت ۱۵۰ ppm آویشن شیرازی در پنیر فتا می‌تواند سبب ایمنی و سلامت این گونه پنیرها با دستیابی به اثرات مفید ارگانولپتیکی و کاهش رشد باکتری لیستریا شود.

جهت دستیابی به ایمنی بیش‌تر در مواد غذایی فعالیت ترکیبی عوامل محیطی مختلف نظیر pH، aw، حرارت،

## منابع

1. Bart S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International J. of Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.
2. Palmer S, Stewart J and Fyfe L. The potential application of Plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18: 463 - 70.
3. Listner L and Gorris L M G. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 1995; 6: 35 - 68.
4. Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technol.* 2007; 40: 973 - 81.
5. Murray P, Barton EJO, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH. Manual of Clinical Microbiology, Diagnostic Microbiology, handbooks, manuals, etc. 8th ed. Vol 2. *National Institute of Health, ASM Press.* Washington DC. 2003; 37 - 9, 461 - 7.
6. Duche O, Tremoulet F, Glaser P and Labadie J. Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68 (4): 1491 - 8.
7. Razavilar V and Genigeorgis C. Prediction of *Listeria* spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in model broth. *Int. Food Microbiol.* 1998; 40: 149 - 57.
8. O'Donnel and Geraid. The incidence of *Salmonella* and *Listeria* in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. *Journal of Society of Dairy Technol.* 1995; 48: 25 - 32.
9. Millet L, Saubusse M, Didiene R, Tessier L and Montel M.C. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int. J. of Food Microbiol.* 2006; 108 (1): 105 - 14.
10. Jay M G. Modern Food Microbiology, 7<sup>th</sup> ed. *An Aspen Publication.* 2005, p: 232.
11. Rodriguez E, Gaya P, Nunez M and Medina M. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International J. of Food Microbiol.* 1998; 39: 129 - 32.





12. Karaman S, Digrak M, Ravid U and Ilcim A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. of Ethnopharmacol.* 2001; 76: 183 - 6.
13. Rasooli I, Mirmostafa SA. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus sepyllum* essential oils. *Fitoterapia.* 2002; 73: 244 - 50.
14. Navas MJ and Jimenez AM. Review of chemiluminescent methods in food analysis. *Food Chem.* 1996; 55 (1): 7 - 15.
15. Zaika LL, Kissinger JC and Wasserman AE. Inhibition of Lactic Acid Bacteria by Herbs. *J. of Food Sci.* 1983; 48: 1455 - 9.
16. Cutter C N, Antimicrobial effect of herb extracts against *E. coli* O157: H7, *L. monocytogenes* and *S.typhimurium* associated with beef. *J. Food Protec.* 2000; 63 (5): 601 - 7.
17. Hao YY, Brackett RE and Doyle MP. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated beef. *J. Food Prot.* 1998; 61: 307 - 12.
18. Rodriguez E, Calzada J, Arques JL, Rodriguez JM, Nunez M and Medina M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 2005; 15: 51 - 7.
19. McCluve PJ, Roberts TA and Oguru PO. Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and liquid medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989; 9: 95 - 9.
20. Robinson TP, Aboaba OO, Kaloti A, Ocio M J, Baranyi J and Mackey BM. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International J. of Food Microbiol.* 2001; 70: 163 - 73.

