

بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد لیستریا مونوسیتوژن در روند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی

رزاق محمودی^۱، علی احسانی^{۲*}، حسین تاجیک^۳، افسین آخوندزاده‌بستی^۴

- ۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
 - ۲- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
 - ۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
 - ۴- استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
- *آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، تلفن: ۰۴۴۱ (۲۷۷۰۵۰۸)، نماابر: ۰۴۴۱ (۲۷۷۱۹۲۶)؛ پست الکترونیک: a.ehsani@urmia.ac.ir

تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۲۸

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۹

چکیده

مقدمه: نگهداری مواد غذایی در برگیرنده روش‌هایی است که سلامت، بهداشت و ماندگاری بهینه غذا در آن تامین شود، در جهت تحقق این امر استفاده ترکیبی از محافظت‌کننده‌های زیستی، مانند اسانس‌های گیاهی و پروبیوتیک‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

هدف: این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی علیه لیستریا مونوسیتوژن در پنیر سفید ایرانی طراحی و به اجرا گذاشده شده است.

روش بررسی: اسانس گیاه مذکور به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب آن با دستگاه گازکروماتوگرافی طیف سنج جرمی GC/MS تعیین شد. در ادامه رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژن تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک (به تنها یابی و توام) در زمان‌های مختلف نگهداری پنیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که اسانس پونه کوهی در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک از بالاترین تاثیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژن برخوردار بوده است. همچنین بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت از رشد لیستریا مونوسیتوژن و تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۰۱۵ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک بود.

نتیجه‌گیری: اثر سینرژیستی بین حالت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک در مقایسه با تیمار کنترل و تیمارهای دارای اسانس و قادر پروبیوتیک کنترل، معنی‌دار بود که این بیانگر تاثیر مهاری اسانس و باکتری پروبیوتیک بر روی لیستریا مونوسیتوژن بوده و در صورت به کارگیری توام با پروبیوتیک می‌توان از غلظت‌های پایین‌تری از اسانس برای اثر مهاری مشهود، استفاده کرد.

گل واژگان: پونه کوهی، لاکتوباسیلوس کازئی، لیستریا مونوسیتوژن، پنیر سفید ایرانی



مقدمه

کولیت اولسراتیو و اختلالات کبدی به اثبات رسیده است. همچنین خصوصیات ضدمیکروبی و آنتیاکسیدانی گونه‌های متعدد این گیاه به خوبی مشخص شده است [۵,۶]. پروبیوتیک‌ها، میکرووارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی دارای اثرات مفید سلامتی می‌باشند، باکتری‌های اسید لاتکتیک و بیفیدوباکترها معمول‌ترین پروبیوتیک‌هایی هستند که در فرآورده‌های لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷]. تاثیرات مطلوب فراوان باکتری‌های پروبیوتیک در بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، تقویت سیستم دفاعی موکوسی علیه پاتوژن‌ها، افزایش پاسخ‌های ایمنی، کاهش کلسترول خون و فعالیت ضدسرطانی و ضدمیکروبی‌شان، سبب افزایش کاربرد آنها در دسته‌ای از مواد غذایی موسوم به غذاهای عملگر شده و مقبولیت مصرف غذاهای پروبیوتیکی در سراسر جهان را افزایش داده است [۸]. اغلب تحقیقات در زمینه اثر ضدمیکروبی انسان‌ها در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و بدین ترتیب مطالب کمی پیرامون تاثیر آنها در مدل‌های غذایی، گزارش شده است [۲]. لزوم به کارگیری غلظت‌های بالاتر انسان در غذا در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نشان‌دهنده پیچیده بودن شرایط رشد در غذا بوده که می‌تواند اثرات محافظتی روی سلول‌های میکروبی در مقابل ترکیبات ضدمیکروبی داشته باشد، این امر از یک طرف به دلیل تاثیرات نامطلوب ارگانولپتیکی در غذا و از سوی دیگر به علت اقتصادی نبودن استفاده از یک نگاهدارنده به تنها یی در مقایر زیاد، موجب محدود شدن کاربرد انسان‌های گیاهی به تنها یی در مواد غذایی شده است [۹,۱۰]. با توجه به عدم کفايت باکتریوسبین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاتکتیک علیه باکتری‌های گرم منفی و مخمرها، موارد استفاده آنها نیز به تنها یی به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی دارای محدودیت می‌باشد [۱۱]. استفاده توام از انسان‌های گیاهی و پروبیوتیک‌ها جهت بهبود عملکرد خصوصیات ضدمیکروبی آنها پیشنهاد شده است [۱۲]. هدف از این مطالعه بررسی رشد باکتری لیستریا مونوستیوژن در پنیر سفید ایرانی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف انسان‌پونه کوهی و باکتری لاکتو‌بایسیلوس کازئی در طی زمان‌های مختلف تولید و نگهداری و رسیدن

سلامت غذا یک ضرورت اساسی از دیدگاه مصرف‌کننده و دست‌اندرکاران صنعت غذا می‌باشد، به ویژه آنکه گزارش موارد عفونت‌های حاصل از غذا رو به گسترش است [۱]. افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل از آن، سبب انجام تحقیقات گستره‌ای برای تولید غذای سالم و توسعه عوامل ضدمیکروبی جدید شده است [۲]. لیستریا مونوستیوژن (*Listeria Monocytogenes*) یک باکتری بیماری‌زای غذایی است که باعث مسمومیت می‌شود. مسمومیت‌های حاصل از این باکتری بیشتر در اثر مصرف شیر و فرآورده‌های آن به ویژه پنیر عارض می‌شود [۳,۴]. ویژگی‌هایی همچون پراکنده‌گی گستره در محیط، توانایی رشد در دامنه وسیعی از pH، شرایط یخچال و تحمل مقادیر بالای نمک، این باکتری را به عنوان پاتوژن بسیار خطرناک در مواد غذایی مطرح نموده است. توجه به سلامت برخی نگاهدارنده‌های شیمیایی و عکس‌العمل منفی مصرف‌کنندگان به نگاهدارنده‌های شیمیایی، باعث افزایش تمایل به ترکیبات طبیعی گردیده است. خصوصیات ضدمیکروبی انسان‌های (Essential Oils) گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروب‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها به اثبات رسیده است [۳,۲]. گیاه پونه کوهی (*Laminaceae*) از اعضاء خانواده (*Mentha longifolia L.*) بوده و به صورت یک گیاه چند ساله می‌باشد. این جنس شامل بیش از ۲۵ گونه است و به صورت وحشی در مناطق مرطوب نواحی مرکزی و جنوب اروپا، جنوب غربی آسیا و شمال آفریقا می‌روید. ساقه‌های این گیاه به صورت چند ساله و بر افزایش بوده، که در مراحل نهایی بلوغ گیاه به طول ۱/۵ متر می‌رسد. برگ‌های آن به صورت ساده، و چسییده (بدون پایه) به ساقه، به طول ۹۹ میلی‌متر و عرض ۲۲ میلی‌متر می‌باشد. همچنین این گیاه واجد گلهای کوچک (به طول ۳ میلی‌متر) به رنگ سفید متمایل به ارغوانی روشن می‌باشد. از قسمت‌های مختلف این گیاه در ترکیب ادویه‌جات تجاری به عنوان طعم‌دهنده در غذا استفاده می‌شود. خصوصیات درمانی این گیاه در برطرف کردن اختلالات گوارشی، استفراغ، بی‌اشتهایی،



آماده‌سازی و محاسبه میزان تلقيق باکتری لیستریا مونوسيتوژن

پنیر سفید می‌باشد.

در این مطالعه باکتری لیستریا مونوسيتوژن ATCC 19118 تهیه شده از بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. ابتدا کشت یوفیلیزه باکتری مذکور در محیط دو مرتبه متوالی در BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس جهت تهیه میزان تلقيق باکتری لازم (CFU/ml)، مقادیر مختلفی از کشت مرحله دوم انتخاب و به کووت‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر BHI Broth منتقل شده و با استفاده از خواندن جذب نوری کووت‌های مذکور (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، کووت حاوی تعداد مناسب باکتری جهت تلقيق به نمونه‌های شیر مشخص شد [۱۲].

آماده‌سازی و محاسبه میزان تلقيق باکتری پروبیوتیک لاكتوباسیلوس کازئی

در این مطالعه باکتری لاكتوباسیلوس کازئی ATCC 3939 تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به عنوان پروبیوتیک استفاده شد. محتويات آمپول یوفیلیزه حاوی باکتری لاكتوباسیلوس کازئی در شرایط استریل به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS منتقل و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به اrlen حاوی ۹۵ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق منتقل و تحت شرایط ذکر شده در بالا، انکوبه شد. این عمل ۲ تا ۳ بار تکرار شد تا تعداد باکتری‌ها به مقدار لازم در $10^9 - 10^{10} cfu/ml$ برسد. سپس سلول‌های میکروبی توسط سانتریفیوژ یخچالدار با دور ۱۵۰۰ گرم و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برداشت شد. باکتری‌های برداشت شده دو بار با آب پیتون ۰/۱ درصد استریل شستشو داده شد و جهت تلقيق در شیر مورد استفاده قرار گرفت [۱۴].

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

این مطالعه شامل ارزیابی اثر غلطت‌های مختلف انسس پونه کوهی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) و باکتری پروبیوتیک لاكتوباسیلوس کازئی به تنها بی و در تیمار توازن بر روی باکتری بیماری‌زا مهم با منشا غذایی، *Listeria monocytogenes* در روند تهیه، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی می‌باشد.

تهیه انسس و آنالیز آن

گیاه پونه کوهی پس از جمع‌آوری توسط گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی از نظر صحت نام علمی تایید شد. چون انسس گیاه در مقایسه با پودر و عصاره خاصیت ضدمیکروبی بیشتری دارد، اقدام به تهیه انسس این گیاه به روش تقطیر با بخار آب گردید. آنالیز انسس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Agilent 6890 با ستون مویینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا به صورت ۵۰ درجه سانتی‌گراد با توقف ۵ دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. دمای اتفاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ درجه سانتی‌گراد و دمای منع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد استریل و تیره‌رنگ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



آماده سازی استارتر جهت تلقیح در شیر

در این مطالعه از استارتر پنیر Chr. Hansen R 704 (استارتر مزو فیل شامل لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه کرموریس و لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه دی استیلاکتیس تهیه شده از شرکت کریستین هانس دانمارک) استفاده شد.

تولید پنیر سفید ایرانی

برای تهیه پنیر سفید، شیر تازه و کامل گاو که در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ درجه پاستوریزه شده بود، استفاده شد. قبل از شروع به انجام مراحل مختلف پنیرسازی، دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتی گراد رسانده و در هریک از ظروف استریل مخصوص تهیه پنیر مقدار ۵ لیتر از شیر ریخته شد. سپس باکتری لیستریا مونوسیتوژن با دوز مورد نظر (۱۰^۳ cfu/ml) به نمونه های شیر آماده شده تلقیح شد. پس از آن، استارتر به مقدار ۰/۵ درصد (حجمی / حجمی) و باکتری پرو بیوتیک لاکتو باسیلوس کائزی به میزان ۱۰^۹ - ۱۰^۸ cfu/ml همزمان به نمونه های شیر اضافه شدند، و پس از گذشت نیم ساعت مقدار ۰/۰۲ درصد (وزن به حجم) از کلرور کلسیم (CaCl₂) اضافه شد. نهایتاً پس از آنکه pH شیر به ۵/۶ رسید، رنت (Rennet) به مقدار ۰/۰۰۱ درصد (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن در آب مقطر استریل به شیر افزوده شده و در همین زمان انس پونه کوهی نیز در غلظت های (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اضافه شد. به منظور کارایی بهتر رنت، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتی گراد حفظ شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده به قطعات ۲ - ۱ سانتی متر مکعبی برش داده شده و جهت آبگیری به مدت شش ساعت تحت فشار وزنه استریل قرار گرفت. سپس قطعات لخته آبگیری شده در آب نمک ۲۰ درصد (وزن به حجم) استریل به مدت ۸ ساعت قرار گرفت. بعد از آن، نمونه های پنیر ضمیم انتقال به آب نمک ۸ درصد استریل، تا ۱۵ روز در دمای ۱۴ - ۱۲ درجه سانتی گراد و پس از طی دوره رسیدن اولیه جهت دوره رسیدن نهایی نمونه ها به مدت ۴۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن انسانس پونه کوهی و پرو بیوتیک به پنیر سفید ایرانی از تست پذیرش حسی استفاده شد. برای این منظور پنیر سفید آماده شده با



نرم افزار SPSS ۱۷ انجام شد. نتایج معنی دار در $p < 0.05$ مدنظر قرار گرفت.

نتایج

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس پونه کوهی استفاده شده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در این میان پولگون (Pulegone) با ۳۱/۵۴ درصد و سینولئون (Cineole) با ۱۵/۸۹ درصد بیشترین ترکیبات موجود در اسانس بودند. نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیات ارگانولپتیکی پنیر در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. غلظت ۱۵٪ درصد اسانس در ترکیب با پروپیوتیک بهترین تیمار از لحاظ خصوصیات حسی بود. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH پنیر در مراحل مختلف تهیه و نگهداری آن نشان دهنده فقدان تاثیر اسانس پونه کوهی بود (جدول شماره ۳). به گونه‌ای که تغییرات pH در طی تولید پنیرها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) در دوره‌های زمانی مشابه، اختلاف آماری معنی داری را نشان نداد ($p > 0.05$).

غلظت‌های مختلف اسانس و پروپیوتیک به هفت قسمت (هر قسمت شامل ۵۰۰ گرم پنیر در ظروف سفید و تمیز) تقسیم شد. ارزیابی حسی به وسیله یک پانل هفت نفره که عمدتاً از کارکنان و اعضای گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه بودند، صورت پذیرفت. بعد از اتمام ارزیابی هر تیمار، قبل از ارزیابی تیمار جدید جهت شنتشوی دهان از آب استفاده شد. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی پنیر سفید حاوی اسانس و پروپیوتیک را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای (9-point hedonic scale) مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد، لحاظ شد [۱۵].

تحلیل آماری: کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. اثر اسانس به تنهایی و تداخل اسانس با پروپیوتیک بر روی شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژن توسط آنالیز واریانس (ANOVA) انجام گرفت. تفاوت در بررسی‌های ارگانولپتیک مورد نظر با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و least significant difference procedure (LSD) صورت گرفت، لازم به ذکر است تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس پونه کوهی مورد بررسی با استفاده از GC/MS

درصد	شاخص بازداری	ترکیب
۱/۸۶	۹۳۹	α - Pinene
۳/۰۷	۹۸۰	2- β - Pinene
۱۵/۸۹	۱۰۳۱	1,8- Cineole
۰/۵۴	۱۰۶۸	P- Mentha- 3,8- Diene
۰/۹۱	۱۰۹۹	Iso pentyl 2- Menthyl Butanoate
۷	۱۱۴۹	P- Menth- 3- En- 8- ol
۱۱/۸	۱۱۶۳	Menthofuran
۹/۷۴	۱۱۷۵	Cis- Iso Pulegone
۱/۰۱	۱۱۹۰	Borneol
۱/۷۸	۱۲۲۰	(Neo- Iso) Dihydrocarveol
۳۱/۵۴	۱۲۴۵	Pulegone
۳/۰۸	۱۳۴۲	2- Cyclohexan- 1- one
۱/۵۸	۱۳۵۰	1- Decene
۰/۵۲	۱۵۷۵	Spathulenol
۱/۶۰	۱۵۸۰	Caryophyllene oxide
۹۲/۰۴		مجموع

جدول شماره ۲- میزان میانگین پذیرش حسی پنیر سفید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی و پروبیوتیک

EO ($\mu\text{l } 100 \text{ mL}^{-1}$)	Probiotic ($10^8 - 10^9 \text{ cfu/mL}^{-1}$)	Mean rating $\pm \text{SD}$
.	-	۸/۰۰ \pm ۰/۰۰ ^a
۵	-	۷/۱۲ \pm ۰/۱۴ ^a
۱۵	-	۷/۶۸ \pm ۰/۲۱ ^a
۳۰	-	۶/۰۵ \pm ۰/۴۲ ^b
۴۵	-	۴/۹۶ \pm ۰/۳۳ ^d
۶۰	-	۳/۰۲ \pm ۰/۴۱ ^e
.	+	۸/۲۵ \pm ۰/۱۱ ^a
۵	+	۷/۲۹ \pm ۰/۲۵ ^a
۱۵	+	۷/۸۹ \pm ۰/۳۲ ^c
۳۰	+	۷/۱۴ \pm ۰/۴۲ ^e
۴۵	+	۵/۲۳ \pm ۰/۲۸ ^d
۶۰	+	۳/۴۳ \pm ۰/۱۹ ^e

(+) : قادر پروبیوتیک، (+) : وجود پروبیوتیک)

جدول شماره ۳- تغییرات میزان pH در طی مرحل مختلف تولید و نگهداری در پنیر سفید ایرانی. A: دارای پروبیوتیک، B: قادر پروبیوتیک، ۱: بدون اسانس، ۲: غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس، ۳: غلظت ۰/۱۵ درصد اسانس، ۴: غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس

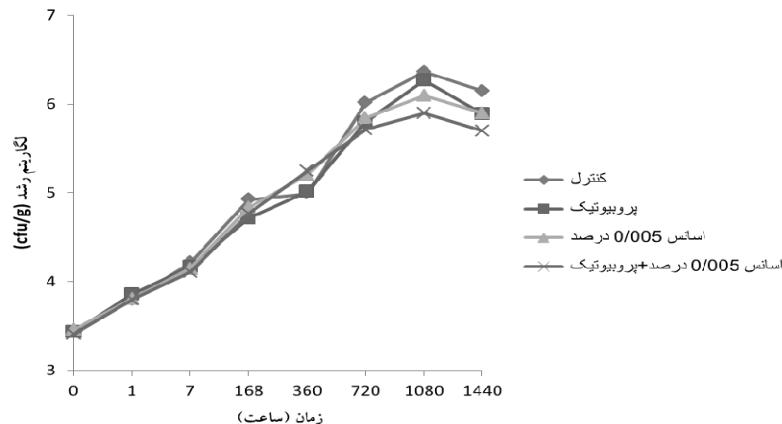
نمونه	ساعت ۰	ساعت ۱	ساعت ۷	ساعت ۱۶۸	ساعت ۳۶۰	ساعت ۷۲۰	ساعت ۱۰۸۰	ساعت ۱۴۴۰
A _۱	۶/۷۷	۷/۶	۵/۰۶	۵/۲۷	۴/۸۵	۴/۸۱	۴/۸۰	۴/۸۰
A _۲	۶/۷۷	۷/۶۲	۵/۶۱	۵/۲۱	۴/۸۳	۴/۸۰	۴/۷۶	۴/۷۶
A _۳	۶/۷۷	۷/۶۱	۵/۵۶	۵/۱۷	۴/۹۱	۴/۸۰	۴/۷۵	۴/۷۳
A _۴	۶/۷۷	۷/۶۳	۵/۰۵	۵/۱	۴/۹۰	۴/۷۷	۴/۷۱	۴/۶۹
B _۱	۶/۷۷	۷/۶۰	۵/۶۵	۵/۲۸	۴/۹۹	۴/۸۵	۴/۸۹	۴/۸۳
B _۲	۶/۷۷	۷/۶۰	۵/۶۳	۵/۲۰	۴/۹۷	۴/۸۰	۴/۸۳	۴/۸۱
B _۳	۶/۷۷	۷/۵۹	۵/۶۰	۵/۱۹	۴/۹۰	۴/۸۰	۴/۸۰	۴/۷۴
B _۴	۶/۷۷	۷/۶۳	۵/۵۷	۵/۰۸	۴/۸۶	۴/۷۷	۴/۷۴	۴/۷

لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با نمونه کترول و نمونه‌های دارای اسانس قادر پروبیوتیک، معنی دار می‌باشد. بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت رشد لیستریا مونوسيتوژنر و نیز از نظر تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۱۵ درصد در تیمار توان با باکتری پروبیوتیک بود. همچنین افزایش غلظت اسانس، بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری به طور معنی داری موثر بود ($p < 0/05$).

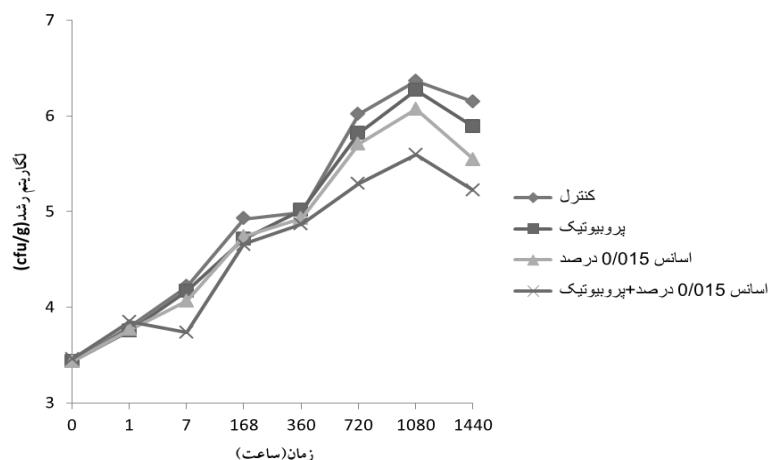
ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی در کلیه تیمارها در پایان مرحله رسیدن پنیر سفید ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمامی موارد شمارش باکتری پروبیوتیک مذکور بیش از 10^7 cfu/g پنیر بود.

نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری لیستریا مونوسيتوژنر در طی مراحل مختلف تولید و نگهداری پنیر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در نمودارهای شماره ۲، ۱ و ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر اسانس مذکور در غلظت‌های مختلف و پروبیوتیک هر کدام به تنها یی در ممانعت از رشد این باکتری در مقایسه با کترول معنی دار بود. نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داد که اسانس مذکور در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توان با پروبیوتیک از بالاترین تاثیر بر رشد لیستریا مونوسيتوژنر برخوردار بود، به عبارت دیگر اثر سینترزیستی بین غلظت‌های مختلف اسانس (به ویژه دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) و باکتری پروبیوتیک

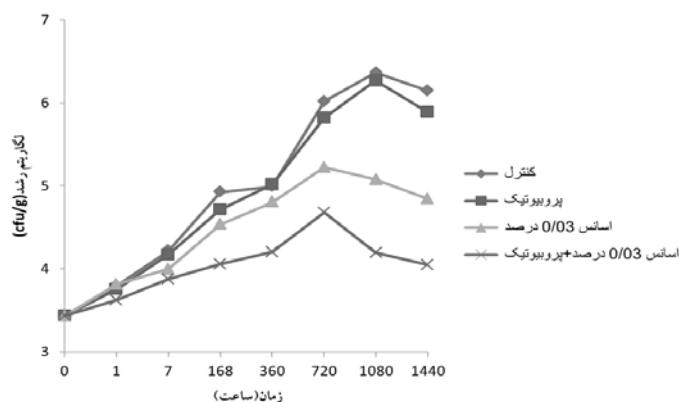




نمودار شماره ۱- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۰۵ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



نمودار شماره ۲- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۱۵ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



نمودار شماره ۳- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۳ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



بحث

کوهی (ppm ۲۰۰-۴۰) بر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک نظیر لاکتوپاسیلوس پلاتاروم و پدیکوکوس اسیدولاکتیس در محیط کشت مایع مشاهده ننمودند [۲۱]. مواد غذایی عملگر مطالعات در زمینه تولید غذای سالم و به کارگیری ترکیبات ضدمیکروبی جدید شده است [۲]. انسان‌های حاصل از گیاهان و باکتریوسمین‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک (به ویژه گونه‌های مختلف لاکتوپاسیلوس‌ها) وارد اثرات ضدمیکروبی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند در جهت کنترل و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد متغیر از مواد غذایی به جای نگاهدارنده‌های شیمیایی و سنتیک مورد استفاده قرار گیرند [۱۶، ۲]. انسان حاصل از گونه‌های مختلف گیاه *M. lonifolia* علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی قابل مقایسه با داروهای استاندارد می‌باشد [۵]. اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی برجی از اجزای انسان گونه‌های مختلف *M. lonifolia* (شامل *cis-piperitone epoxide* و *cis-piperitenon oxide*) در بسیاری از مطالعات گزارش شده است [۱۷، ۱۸]. در مطالعه حاضر نیز بالاترین ترکیب موجود در انسان پونه کوهی مورد استفاده *pulegon* بوده که اثرات ضدمیکروبی آن در مطالعات قبلی گزارش شده است. توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسمین در زمینه کنترل میکروارگانیسم‌های نامطلوب در پنیر به خوبی مشخص شده است [۱۹]. واژکوئز و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت ضدمیکروبی باکتری پروبیوتیک لاکتوپاسیلوس کازئی را مرتبط با تولید باکتریوسمین گزارش نمودند [۲۰]. در این مطالعه نیز اثرات ضدمیکروبی لاکتوپاسیلوس کازئی علیه لیستریا مونوستیوژن مشهود بود. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH پنیر در مراحل مختلف تهیه و نگهداری آن در این مطالعه نشان‌دهنده فقدان تاثیر انسان پونه کوهی بود. به عبارت دیگر غلظت‌های مختلف پونه کوهی تاثیر معنی‌داری بر رشد و فعالیت پروبیوتیک و باکتری‌های مولد اسید لاکتیک موجود در استارترب به کار رفته در این مطالعه نداشت. زایکا و همکاران (۱۹۸۳) نیز در مطالعه مشابهی هیچ گونه اثر مهاری در غلظت‌های مختلف انسان پونه



دماهای ۴ و ۲۰ درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش pH باعث کاهش تأثیر هر دو ماده شد. در ضمن تأثیر هر دو ماده در دماهای ۴ درجه سانتیگراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتیگراد بود [۲۶]. در این مطالعه، غلظت 10^{-3} درصد انسانس پونه کوهی از بالاترین تأثیر ممانعت‌کننده‌گی بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژن برخودار بود، به گونه‌ای که در تیمار توام با پروپیوتیک به طور سینرژیک از بالاترین اثر ضدمیکروبی برخوردار بودند، زیرا باکتری‌های پروپیوتیک نیز قادرند با تولید باکتریوسین‌ها و افزایش اسیدیتیه و رقابت میکروبی تا حدودی از رشد بسیاری از باکتری‌های پاتوژن جلوگیری نمایند. بهترین غلظت انسانس از نظر ممانعت رشد لیستریا مونوسیتوژن و نیز از نظر تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت 10^{-5} درصد در تیمار توام با باکتری پروپیوتیک بود. بنابراین با کاربرد توام ترکیبات محافظت‌کننده زیستی مختلف به ویژه انسانس‌های گیاهی و پروپیوتیک‌ها، می‌توان از غلظت‌های پائین‌تری از انسانس‌ها جهت کنترل و ممانعت از رشد ارگانیسم‌های پاتوژن و عامل فساد در مواد غذایی جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی و اثرات نامطلوب غلظت‌های بالاتر انسانس‌ها بر خصوصیات ارگانولپتیکی مواد غذایی بهره جست.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و از همکاری آقایان پروفسور سید مهدی رضوی روحانی، دکتر امیر تکمehچی و دکتر محمدرضا پژوهی تشکر و قدردانی می‌شود.

پنیر سفید ایرانی ارزیابی شد، علاوه بر مقاومت باکتری‌های استارتر به انسانس مذکور، رشد باکتری‌های پاتوژن مذکور در غلظت‌های بالاتر از 10^{-5} درصد انسانس، و استارتر و در تیمارهای توام تحت تأثیر قرار گرفت، بنابراین اثرات سینرژیستی بین انسانس مذکور و استارتر مشاهده شد [۲۵]. آرکوز و همکاران (۲۰۰۵) اثر ترکیبی تیمار با فشار بالا و باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین را بر روی بقای لیستریا مونوسیتوژن در لگاریتم $4/8 \text{ cfu/mL}$ تجاری و یکی از هفت سویه Producing-Lactic Acid Bacteria) در پنیر حاصل از شیر خام بررسی کردند. در روز سوم شمار لیستریا مونوسیتوژن در پنیر کنترل (بدون BP-LAB و تیمار با HP) به $7/0^3$ در پنیرهای حاوی BP-LAB به $7/0^3$ در $4/7 \text{ log cfu/g}$ BP-LAB که در روز دوم با فشار 300 MPa (Mega Pascal Atmospheric) تیمار شده بود به $7/13 \text{ log cfu/g}$ در پنیرهای حاوی BP-LAB 500 MPa به $2/01 \text{ log cfu/g}$ تیمار شده با فشار 300 MPa که در روز دوم با فشار $3/83 \text{ log cfu/g}$ و در نمونه‌های مشابهی که با فشار 500 MPa تیمار شدند به $1/18 \text{ log cfu/g}$ یا کمتر رسید [۱۰]. در مطالعه انجام شده توسط بوریندر و همکاران (۲۰۰۱) اثر سینرژیک عصاره آلی سیر و نیسین به صورت تغییرات حداقل غلظت نگهدارنده بر روی ۶ سویه لیستریا مونوسیتوژن Triptose phosphate broth در یک مدل محیط کشت مایع بررسی شد و یک تأثیر سینرژیک ضدباکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد. علاوه‌بر این، تأثیر سایر فاکتورهای رشدی از قبیل pH و

منابع

- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M and Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005; 91: 621 - 32.
- Smith P, 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. Griffiths MV. *Listeria monocytogenes*: its important in the dairy industry. *J. of the Sci. Food and Agric.* 1989; 47: 133 - 58.
4. Bille J. Epidemiology of human *listeriosis* in Europe, with special to the swiss outbreak. In A. J. Miller, J. Miller, J. L. Smith and G. A. Somkuti (Eds.), *Foodborn listeriosis*. pp: 31-39. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
5. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A and Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha Longifolia* L. ssp. *Food Chem.* 2007; 103: 1449 - 56.
6. Codd LE. The genus *Mentha*. Flora of Southern Africa. 1985; 28 (4): 107 - 11.
7. Phillip SM, Kailasapathy K and Tran L. Viability of comrcial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int. J. of Food Microbiol.* 2006; 108: 276 - 80.
8. Ong L, Henriksson A and Shah NP. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 446 – 56.
9. Zhang CY, Yam kl and Chikindas ML. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released in to a broth system. *Int. J. of Food Microbiol.* 2004; 90: 22 - 25.
10. Arques JL, Rodriguez E, Gaya P, Medina M and Nunez M. Effect of combinations of high pressure treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 2005; 15: 898 - 900.
11. Powell MN, Armynot AM, Vinas M and DeBuochberg SM. Interactions between pairs of bacteriocins from *Lactic acid bacteria*. *J. Food Prot.* 1998; 61: 1210 - 2.
12. Amuna MB, Abusha ST and Jeevaratnam K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocin fro *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiol.* 2005; 22: 449 - 54.
13. Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT.* 2007; 40 (6): 973 - 81.
14. Krasaecko W, Bhandari B and Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 2004; 14 (8): 737 - 43.
15. Meilgaard M.C, Civille G.V, Carr B.T. Sensory evalution techniques. 2nd edition. Crc prees, inc. bocaration, florida. 1991, pp: 123 - 30.
16. Burt S. Essential: their antibacterial propertied application in foods-a review. *Int. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.
17. Karaman I, sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M and Adiguzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol exteracts of *Juniperus* L. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 85: 231 - 5.
18. Sahin F, Karaman I, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M, Adiguzel A, et al. Evaluation of antimicrobial activities *Satureja hortensis* L. *J. of Ethnopharmacol.* 2002; 14 (2): 141 - 6.
19. Bernardez PF, Amado IR, Castro LP and Guerra NP. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 in whey. *Int. Dairy J.* 2008; 18: 1057 – 65.
20. Vazquez JA, Gonzalez MP and Murado MA. Stimulation of bacteriocin production by dialyzed culture media from different lactic acid bacteria. *Current Microbiol.* 2005; 50: 208 – 11.
21. Zaika LL, Kissinger JC and Wasserman AE. Inhibition of Lactic Acid Bacteria by Herbs. *J. of Food Sci.* 1983; 48: 1445 - 9.
22. Kasimoglu A, Goncuoglu M and Akgun S.



- Probiotic With cheese *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.* 2004; 14: 1067 - 73.
- 23.** MenonVK and Grag SR. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocitogens* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18: 647 - 70.
- 24.** Burt S A and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli O157: H7*. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 36: 162 - 7.
- 25.** Abbasifar A, Basti AA, Karim G, Bokaie S, Abbasifar R, Villa AA, Misaghi A, Jamshidi AH, Gandomi H and Javan AJ. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and starter culture on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and storage of white brined cheese. *Milchwissenschaft*. 2009; 64 (4): 438 - 42.
- 26.** Bhurinder S, Bernadette F, Martin R. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *J. of Food Microbiol.* 2001; 18: 133 - 9.



The Antimicrobial Activity of *Mentha longifolia* L. Essential Oil and *Lactobacillus casei* on Growth of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture, Ripening, and Storage of Iranian white Cheese

Mahmoudi R (Ph.D. Student)¹, Ehsani A (Ph.D.)^{1*}, Tajik H (Ph.D.)¹, Akhondzade Basti A (Ph.D.)²

1- Department of Food Hygiene & Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding author: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Iran. P.O.Box: 571531177

Tel: +98 - 441 - 2770508, Fax: +98 - 441 - 2771926

E-mail: a.ehsani@urmia.ac.ir

Abstract

Background: Food preservation includes procedures to assure higher level of food safety, hygiene and stability. To achieve this goal, the use of combination biopreservatives, such as Essential oils and Probiotics, has gained increased attention.

Objective: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese.

Methods: The essential oil of this plant was prepared by steam distillation and analyzed by GC/MS method. The inhibitory effect of different concentrations of this essential oil and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes* were determined by the method of viable colony count on the selective media in different interval of production and storage of Iranian white cheese.

Results: The results showed that 0.03 and 0.015 % of this essential oil when used in combination with *Lactobacillus casei* had the highest inhibitory effect on the growth of *Listeria monocytogenes*, Furthermore, 0.015% of this essential oil combined with *Lactobacillus casei* had not only inhibitory effect on growth of *Listeria monocytogenes* but also maintained optimum taste quality of the cheese.

Conclusion: The effects of used concentrations of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* showed significantly higher antibacterial activity compared to the control and treatments containing essential oil without probiotic bacteria. This reveals inhibitory effect of essential oil of *Mentha longifolia* L. and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes*. It was concluded that lower concentrations of *Mentha longifolia* L. essential oil could be used for inhibitory activity combined with probiotic bacteria.

Keywords: *Mentha longifolia* L., *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, Iranian White Cheese

