ارزیابی اثر اسانس آویشن شیرازی بر رفتار *Staphylococcus aureus* در پنیر فتا

آرش عباسی‌فر[۱]، افشین آخوندزاده‌بستی[۲*]، گیتی کریم[۱]، علی میثاقی[٤]، سعید بکایی[۲]، حسن گندمی[۱]، اشکان جبلی‌جوان[۱]، حسن حامدی[۱]، عباسعلی ساری[۱]

۱- دستیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۲- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۳- استاد، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
٤- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
* آدرس مکاتبه: تهران، خیابان آزادی، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، صندوق پستی: ٦٤٥٣ - ١٤١٥٥، تلفن: ٦٦٩٢٣٥١٠ (٠٢١)، نمابر: ٦٦٩٣٣٢٢٢ (٠٢١)
پست الکترونیک: aakhond@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۹ **تاریخ تصویب:** ۸٦/۳/۱۱

چکیده

مقدمه: گیاه آویشن شیرازی ***Zataria multiflora* Boiss** از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده و بررسی اثر ضدمیکروبی آن در زمینه مواد غذایی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مهمی که از عوامل مسمومیت‌های غذایی رایج هستند لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

هدف: هدف این بررسی ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس این گیاه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر فتا بود.

روش بررسی: اسانس گیاه آویشن شیرازی به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب آن با دستگاه گاز کروماتوگرافی طیف سنج جرمی **GC/MS** تعیین گردید. تاثیرغلظت‌های مختلف اسانس مذکور بر باکتری مورد نظر که به شیر پنیر افزوده شده بود از طریق سنجش میزان رشد باکتری در محیط کشت اختصاصی در آزمایشگاه و در پنیر فتا صورت پذیرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که اسانس مذکور دو غلظت **ppm** ۳۰۰ و ۱۵۰ به ترتیب از بالاترین تاثیر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار بوده و در ترکیب با استارتر پنیر به میزان ۰/۵ درصد به طور معنی‌داری از رسیدن شمار این باکتری به دز مسمومیت‌زای خود در فراورده غذایی مورد بررسی جلوگیری کردند.

نتیجه‌گیری: تاثیر ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی در غلظت **ppm**۳۰۰ بالاتر از مقادیر پایین‌تر آن بود و با توجه به گروه‌های شاهد برای حصول این تاثیر مهاری به اثر سینرژیک آن در کنار استارترهای پنیر نیاز است.

گل‌واژگان: آویشن شیرازی، استافیلوکوکوس اورئوس، استارتر، پنیر

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

مقدمه

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضدباکتریایی هستند [۱،۲]. کاربردهای فراوان آن‌ها به منظور کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا با منشا غذایی و یا باکتری‌های عامل فساد، موجب به کارگیری آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های غذایی شده است. استقبال از این موضوع از یک طرف به علت رویکرد جدید عموم مردم و از طرف دیگر سازمان‌های بین‌المللی و ملی مسؤول در زمینه بهداشت مواد غذایی و نیز صنایع غذایی در استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مختلف به جای شیمیایی (که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد) است.

به طور کلی غلظت‌های بالای اسانس‌های گیاهی در غذا نسبت به محیط‌های آزمایشگاهی به منظور اثر بخشی اثرات ضدباکتریایی آن‌ها لازم است [۳،٤]. این امر از یک طرف به دلیل اثرات معکوس احتمالی که در طعم، مزه، بو و رنگ می‌گذارد و از طرف دیگر اقتصادی نبودن استفاده از یک نگهدارنده در مقادیر زیاد، استفاده تنها از اسانس‌های گیاهی (به عنوان یک نگهدارنده غذایی) یا هرگونه نگهدارنده غذایی طبیعی را در مواد غذایی محدود ساخته است. باکتریوسین‌ها یا باکتری‌های اسید لاکتیک مولد باکتریوسین[1] نیز ممکن است شمار برخی از پاتوژن‌ها، از جمله استافیلوکوکوس اورئوس[2] را در پنیر آلوده کاهش دهند. افزودن باکتریوسین به شیر یا تلقیح شیر با BP-LAB می‌تواند در ترکیب با سایر روش‌ها، این باکتری را از پنیر حاصل از شیر خام حذف نماید [۵]. بنابراین متخصصان بهداشت مواد غذایی با به گارگیری سیستم تحقیقاتی جدید یعنی سیستم تکنولوژی مانعی[3]، ابتدا در مدل‌های آزمایشگاهی و سپس در مدل‌های اصلی یعنی ابتدا مدل‌های غذایی مایع و سپس جامد، سعی بر به کارگیری اسانس‌های گیاهی به تنهایی و توام با سایر نگهدارنده‌های طبیعی دیگر در غلظت‌ها و درجات ترکیبی مختلف با اثر بر روی باکتری‌های بیماری‌زای مهم با منشا غذایی[4] نموده‌اند تا به توان به ترکیب سینرژیستی مطمئن و مناسبی از نگهدارنده‌های طبیعی با بیشترین اثر ضدپاتوژنی و درعین حال با کمترین اثر معکوس ارگانولپتیکی دست یافت [٦، ۵، ۳،٤].

استافیلوکوکوس اورئوس یک باکتری بیماری‌زای مهم با دامنه وسیعی از عفونت‌های انسانی و حیوانی است که شامل بیماری‌های غذایی ناشی از تولید توکسین است. در بسیاری از کشورها، این باکتری پس از سالمونلا و کلستریدیوم پرفرینجنس به عنوان دومین یا سومین باکتری از سه باکتری بیماری‌زایی است که موجب شیوع مسمومیت‌ها و عفونت‌های غذایی می‌گردند. انسان‌ها و اغلب حیوانات اهلی به عنوان پناهگاهی برای این باکتری هستند و بنابراین ما انتظار داریم که استافیلوکوک‌ها در اغلب یا تمام محصولات غذایی با منشا دامی یا آن‌هایی که به طور مستقیم توسط انسان‌ها دستکاری می‌شوند حضور داشته باشند. به علاوه، استافیلوکوکوس اورئوس عامل رایجی برای بیماری‌های پستان در گاوهای شیری است، بنابراین اگر شیر مربوط به حیوانات مبتلا به بیماری ورم پستان مصرف شود یا برای تهیه پنیر به کار رود، احتمال خطر بالایی از نظر مسمومیت غذایی وجود خواهد داشت [۷].

افزایش بیماری‌های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل، به معنای آن است که لزوم کوشش مداومی برای تولید غذای سالم‌تر و توسعه عوامل ضدمیکربی جدید وجود دارد. توجه به سلامت برخی نگهدارنده‌های شیمیایی و عکس‌العمل منفی مصرف‌کننده به نگهدارنده‌های مصنوعی و شیمیایی، باعث افزایش تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی تر گردید. این امر مخصوصاً در مورد محصولاتی که به عنوان ماده آلی وارد بازار می‌شوند حایز اهمیت است، یعنی جایی که نیاز به جایگزین‌های سالم و موثر برای تیمارها و نگهدارنده‌های شیمیایی است. تمایل ویژه بر روی کاربردهای بالقوه اسانس‌های گیاهی متمرکز شده و خصوصیات ضدمیکربی اسانس‌های گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها تایید شده است. اما اغلب این تحقیقات در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و بدین‌ترتیب

[1] BP-LAB
[2] *Staphylococcus aureus*
[3] Hurdle Technology
[4] Emerging Food-borne Pathogens

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

مطالب کمی پیرامون تاثیر آن‌ها در زمان به کارگیری در ماده غذایی، روشن شده است [۲].

در مورد ضرورت انجام تحقیق، از آنجا که سلامت غذا یک مسأله بنیادی، چه از دیدگاه مصرف‌کننده مواد غذایی و چه از دیدگاه صاحبان صنایع غذایی بوده است و با عنایت به گزارش‌های مرتبط با موارد متعدد عفونت‌های حاصل از مواد غذایی آلوده، توجه به سلامت غذا و ارائه راهکارهایی جهت حفظ هر چه بیشتر سلامت مواد غذایی در حال گسترش است. به علت دیدگاه منفی روز افزون و ناخوشایند مصرف‌کنندگان در استفاده از مواد غذایی که در آن‌ها از نگهدارنده‌های شیمیایی استفاده شده از یک طرف و از طرف دیگر دیگر مشکلات متعدد مسؤولان در روش‌ها و سیستم‌های کنترلی مواد غذایی که گران و وقت‌گیر است، توجه روز افزون تولیدکنندگان و مسؤولین بهداشتی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و گیاهی طرف و نیز به کارگیری روش‌های کنترلی کم‌هزینه و مطمئن، از جمله استفاده از مدل‌سازی و مدل‌های پیشگو در کنار یا به جای روش‌های کنترلی رایج از جمله روش‌های قدیمی کنترل محصول نهایی و یا روش HACCP و غیره معطوف شده است. در این بررسی، برای اولین بار در یک مدل غذایی (پنیر فتا)، (با استفاده از Hurdle Technolog) [۸] سعی به بررسی اثر اسانس آویشن شیرازی (که یک گیاه بومی ایرن بوده و به صورت سنتی به عنوان طعم‌دهنده مواد غذایی در بسیاری از تقاط ایران استفاده می‌شود) به تنهایی یا توام با باکتری‌های مولد اسید لاکتیک (گونه‌های لاکتوکوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) در یک مدل غذایی پنیر فتا بر روی باکتری بیماری‌زای مهم با منشای غذایی یعنی استافیلوکوکوس اورئوس، در مراحل مختلف پنیرسازی شده است [۳،٤،٥،٦].

آویشن شیرازی، سر شاخه‌های گل‌دار خشک شده گیاه *Zataria multiflora* Boiss. از خانواده نعناع (Lamiaceae) است که حداقل واجد ۰/٦ درصد اسانس (حجم/ وزن) است. در خانواده نعناع بالغ بر ۲۰۰ جنس و حدود ٤۰۰۰ گونه وجود دارد که معمولاً دارای اسانس هستند. سابقه انتشار آن‌ها در منطقه مدیترانه بوده و گیاهان معروفی چون نعناع، اسطوخودوس، بادرنجبویه، پونه، مریم‌گلی، آویشن، مرزه، ریحان، مرزنجوش و آویشن شیرازی در این خانواده قرار دارند [۱،۳،۹].

انتشار عمومی این گیاه در ایران، افغانستان و پاکستان بوده و در ایران مناطق اصفهان (۱۰ کیلومتر شمال نجف‌آباد، ۲۷ کیلومتری جنوب اصفهان، منطقه حفاظت شده کلاه قاضی، جنوب شرقی اصفهان، شاه کوه)؛ لرستان (شاهبازان)؛ خوزستان (شمال شرقی دزفول)؛ فارس (فیروزآباد، کوه سیوند، کوه موزموج نزدیک بوشهر و لار)؛ کرمان (بین کرمان و زرند، علی‌آباد به سمت گاوکشی، شرق حاجی‌آباد، گوهره در شمال بندرعباس، کوه‌های گنو و آب گرم فارس: شمال غربی فورگ، بین جهرم و منصورآباد نزدیک طارم)؛ بلوچستان (۱۰ کیلومتری خاش به سمت ایرانشهر، شمال بزمان: جنوب شرقی تنگه سرخ)؛ خراسان (گردو در جنوب ازبگو)؛ یزد (غرب چاه‌نبک، خورمیز در جنوب غربی مهریز، بین جندق و یزد) گزارش شده است [۳،٤،۱۰].

سر شاخه هوایی آویشن شیرازی حداقل ۰/٦ درصد اسانس، اسیدهای چرب، اسید الثانولیک، بتاسیتوسترول و بتولین دارد. اسانس گیاه به طور متوسط حاوی ٦۹ درصد فنل و غالباً کارواکرول[1] بوده و پاراسیمن[2] جزء اصلی ترکیبات غیر فنلی آن است. ترکیبات عمده موجود در اسانس گیاه ایرانی کارواکرول و تیمول[3] و پس از این‌دو، لینالول[4] و پاراسمین است که به ترتیب حدود ٦۱/۲۹، ۲۵/۱۸، ۱/۹٦ و ۱/۹۰ درصد از اسانس حاصل از نمونه خشک گیاه را تشکیل می‌دهد. اسانس این گیاه باید در ظروف دربسته و دور از نور نگهداری شود [۳].

مواد و روش‌ها

فرضیات

بررسی رفتار باکتری بیماری‌زای مهم با منشا غذایی، یعنی *Staphylococcus aureus* در پنیر فتا متاثر از غلظت‌های مختلف (ppm صفر، ۵۰، ۱۵۰، ۳۰۰) آویشن شیرازی در دمای پنیرسازی است.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه آویش شیرازی در فصل تابستان از استان فارس جمع‌آوری شد و توسط گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی

[1] Carvacrol
[2] *p*-Cymene
[3] Thymol
[4] Linalool

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

جهاددانشگاهی نام علمی آن تایید شد (*Zataria multiflora* .Boiss). پس از تهیه اسانس گیاه به روش Steam distillation از سرشاخه‌های هوایی گیاه، آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Finnigan با ستون موبینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲٦۵ و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲٦۵ به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه فارنهایت و گاز حاصل از هلیم با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه فارنهایت بود.

باکتری مورد بررسی

شامل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، زیر گونه اورئوس ATCC 6538 بود. این باکتری‌های لیوفلیزه در محیط آبگوشت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ۱٦ ساعت (over night) حداقل ۲ مرتبه به طور متوالی کشت شده، سپس از کشت دوم به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و در حجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری در میکروتیوب‌های اپندروف در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و برای هر آزمایش از این کشت‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده گردید و این کشت دوم جهت انجام تحقیق به کار گرفته شد.

تهیه میزان تلقیح باکتریایی: تهیه میزان تلقیح باکتری با انتقال کشت نگهداری شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد بر روی محیط کشت براث (BHI) و نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ – ۱٦ ساعت و مجدداً کشت دومی از این آبگوشت ۱۸ ساعته اول بر روی براث دیگر به مدت ۱۸ ساعت و ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس لوله‌های استریل تهیه شده و به آن‌ها ۵ میلی‌لیتر از محیط مایع[1] استریل اضافه گردید. ابتدا برای بار اول مقادیر مختلفی از آبگوشت ۱۸ ساعته دوم برروی لوله‌های Cuvett حاوی ۵ میلی‌لیتر برات (BHI) برده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس این لوله‌های Cuvett جهت شمارش تعداد باکتری‌ها استفاده گردید تا در نهایت لوله Cuvett که دارای ۲×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر باشد، مشخص گردد (که با کشت بر روی آگار شمارش تایید می‌شود). سپس، همان‌گونه که بعداً بیان می‌شود از این لوله Cuvett حاوی ۲×۱۰^{۷} باکتری در هرمیلی‌لیتر سریال‌های رقت ۱۰ تایی از $۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر تا $۱۰^{۲}$ باکتری در هر میلی‌لیتر با استفاده از سوبسترای برات[1] در ترکیب با فاکنورهای مورد نظر آزمایش، که در قسمت بعدی توضیح داده می‌شود، تهیه گردید. سپس از این لوله Cuvett حاوی ۲×۱۰^{۷} باکتری جهت تهیه دوز تلقیح مورد استفاده در تحقیق یعنی $۱۰^{۳}$ باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد.

آماده‌سازی استارتر جهت تلقیح در شیر پنیر: ازباکتری‌های لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس تهیه شده از شرکت‌های ANISCO/Bulk Set Culture و CHR HANSEN استفاده گردید.

تولید پنیر فتا: برای تهیه پنیر فتا، شیر تازه و کامل گاو که در دمای ۲± ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شده بود، استفاده گردید. قبل از شروع به انجام مراحل مختلف پنیرسازی، دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتی‌گراد رسانده و در هریک از ظروف استریل مخصوص تهیه پنیر مقدار ۵ لیتر از شیر ریخته شد. سپس با دوز مورد نظر از کشت ۱۸ ساعته استافیلوکوکوس اورئوس یعنی $۱۰^{۷}$ باکتری در هر میلی‌لیتر محیط آبگوشت BHI با حجم مناسب به گونه‌ای آلوده گردید که در نهایت دوز تلقیح مورد نظر یعنی $۱۰^{۳}$ باکتری در هر میلی‌لیتر از شیر پنیر به دست آمد. پس از آن، استارتر به مقدار ۰/۵ درصد (حجم به حجم) به شیری که از آن نمونه‌های پنیر دارای استارتر تهیه می‌گردید اضافه شد.

مقدار ۰/۰۲ درصد (وزن به حجم) از کلرور کلسیم[2] را در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً حل نموده و به طور یکنواخت به شیر پنیر اضافه گردید.

[1] BHI

[2] $CaCl_2$

[1] BHI

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

نهایتاً پس از آن‌که pH شیر به ۵/٦ رسید، رنت به مقدار ۰/۰۰۱ درصد (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن درآب مقطر استریل به شیر افزوده شده و در همین زمان اسانس آویشن شیرازی نیز در غلظت‌های مذکور اضافه گردید.

به منظور کارایی بهتر رنت، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده به قطعات ۲ – ۱ سانتی‌متر مکعبی برش داده شد و طبق دستورالعمل ساخت پنیر فتا جهت آب‌گیری به مدت شش ساعت تحت فشار وزنه استریل ۱۰ کیلوگرمی قرار گرفت. سپس لخته به صورت قطعاتی به ابعاد ٦ × ۸ × ۱۲ سانتی‌متری برش داده شده و در آب نمک ۲۰ درصد (وزن به حجم) استریل به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۲–۱٤ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. بعد از آن نمونه‌های پنیر ضمن انتقال به آب نمک ۸ درصد استریل، تا ۱۵ روز در دمای ۱۲ – ۱٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از طی دوره رسیدن اولیه جهت دوره رسیدن نهایی نمونه‌ها به مدت ٤۵ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

به منظور شمارش استافیلوکوکوس اورئوس، اندازه‌گیری pH، تعیین درصد ماده خشک، درصد رطوبت و درصد نمک نمونه‌های پنیر، آزمایش‌های میکروبی و شیمیایی در مراحل زیر انجام پذیرفت:

الف– ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح استافیلوکوکوس ارئوس در شیر)

ب– بعد از افزودن استارتر و پایین آمدن pH

ج– پس از ایجاد لخته

د– پس از آب‌گیری لخته

ر– روز ۷

ز– روز ۱۵ (متعاقب اتمام دوره رسیدن اولیه پنیر در انبار سبز با دمای ۱٦–۱٤ درجه سانتی‌گراد)

و– روز ۳۰

ه– روز ٤۵

ی– روز ٦۰

تفسیر میکروبی: پرگنه‌های قابل مشاهده استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان شمار شاخص بر روی پلیت‌های تکرار شده محیط آگار اختصاصی برد پارکر[1] همراه با ذخیره انتخابی برای برد پارکر پس از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت تعیین گردید.

تحلیل آماری: تحلیل واریانس کشت BP-LAB، غلظت‌های اسانس آویشن شیرازی، روزهای مرحله رسیدن و آزمون تولید پنیر به عنوان عوامل اصلی موثر بر روی شمارش‌های استافیلوکوکوس اورئوس و مقادیر pH پنیر با استفاده از برنامه spss با نرم‌افزار Win 9.0 در نظر گرفته شد. اختلافات شاخص توسط آزمون Tukey در $p < ۰/۰۵$ ضمن استفاده از همین برنامه انجام گرفت.

نتایج

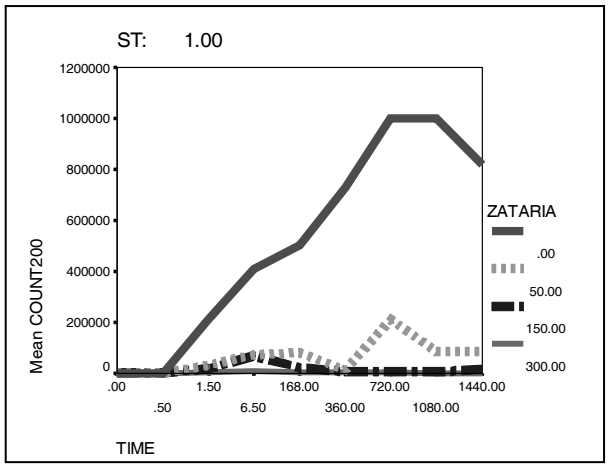
اسانس گیاه آویشن شیرازی استخراج و فعالیت ضدمیکروبی آن در پنیر فتا بررسی شد. از آنجا که استارتر مورد استفاده در پنیر خود می‌تواند با رقابت میکروبی و تولید باکتریوسین‌ها تا حدودی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را مهار سازد، بنابراین ضمن استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس، نمونه‌های مورد بررسی به دو گروه حاوی استارتر (در غلظت ۰/۵ درصد) و بدون استارتر تقسیم شدند و نیز جهت حصول اطمینان از عدم اثر ممانعت‌کنندگی این اسانس بر رشد استارترها، در تمامی مراحل نمونه‌برداری، اندازه‌گیری pH نیز انجام گرفت که نتایج آن در جدول شماره ۱ نشان داده شده است و با توجه به اختلاف آن در دو گروه مذکور و پایین‌تر بودن pH در گروه حاوی استارتر، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این اسانس به طور معنی‌داری بر رشد استارتر پنیر تاثیر ندارد ($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری مورد نظر در بافت پنیر در نمودارهای شماره ۱ و ۲ ارایه شده است. با مقایسه رشد باکتری *Staphylococcus aureus* در این دو گروه می‌توان نتیجه گرفت که این اسانس در دو غلظت ppm ۱۵۰ و ۳۰۰ قادر به مهار رشد این باکتری بوده و در غلظت ppm ۳۰۰

[1] Merck

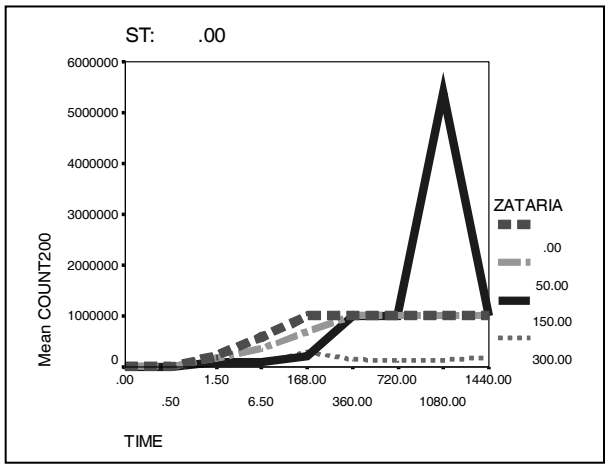
[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

جدول شماره ۱- تغییرات میزان pH در پنیر فتا. A: دارای استارتر، B: بدون استارتر، 1: بدون تیمار با اسانس آویشن شیرازی، 2: تیمار با ppm ۵۰ اسانس، 3: تیمار با ppm ۱۵۰ اسانس، 4: تیمار با ppm ۳۰۰ اسانس

pH	زمان تلقیح باکتری	سی دقیقه بعد از تلقیح استارتر	یک ساعت بعد از افزودن رنت	بعد از آب‌گیری لخته	روز ۷	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
A1	۶/۴۸	۶/۴۲	۶/۳۸	۵/۸۸	۵/۳۸	۵/۴۳	۵/۳۶	۵/۳۹	۵/۲۹
A2	۶/۴۸	۶/۴۲	۶/۳۵	۵/۸۷	۵/۵۸	۵/۴۳	۵/۳۳	۵/۳۴	۵/۳۳
A3	۶/۴۷	۶/۴۲	۶/۳۸	۵/۶۰	۵/۲۲	۵/۱۷	۵/۴۰	۵/۲۰	۵/۱۰
A4	۶/۴۹	۶/۴۲	۶/۳۴	۵/۳۶	۵/۳۳	۵/۲۵	۵/۲۲	۵/۱۹	۵/۲۱
B1	۶/۴۷	۶/۴۴	۶/۳۹	۶/۳۸	۶/۲۷	۵/۸۴	۵/۸۰	۵/۶۳	۵/۶۳
B2	۶/۴۸	۶/۴۴	۶/۳۹	۶/۳۹	۶/۲۵	۵/۸۴	۵/۸۰	۵/۶۱	۵/۶۱
B3	۶/۴۸	۶/۴۴	۶/۴۰	۶/۳۶	۶/۲۶	۵/۸۱	۵/۷۸	۵/۶۰	۵/۶۱
B4	۶/۴۸	۶/۴۴	۶/۳۸	۶/۳۵	۶/۲۲	۵/۷۸	۵/۷۵	۵/۵۸	۵/۵۵



نمودار شماره ۱- میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس (cfu/gr) در نمونه‌های دارای استارتر در پنیر فتا در حضور مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی(ppm) بر حسب ساعت



نمودار شماره ۲- میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس (cfu/gr) در نمونه‌های بدون استارتر در پنیر فتا در حضور مقادیر مختلف اسانس آویشن شیرازی (ppm) بر حسب ساعت

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

کاملاً از نزدیک شدن شمار این باکتری به دوز مسمومیت‌زای خود یعنی log 6 cfu/gr جلوگیری نموده است که البته ضمن مقایسه آن با گروه فاقد استارتر چنین نتیجه‌گیری شد که این اثر تنها به طور سینرژیک و در ترکیب با استارتر پنیر حاصل گردید. هم‌چنین با در نظر گرفتن میزان رشد استافیلوکوکوس اورئوس در آب پنیر حاصل از آبگیری لخته، متعاقباً طبق نتایج ارائه شده در نمودارهای شماره ۳ و ٤، کمترین میزان آلودگی و بیشترین اثر بازدارندگی در گروه دارای استارتر و غلظت ppm ۳۰۰ اسانس آویشن شیرازی و بالاترین میزان آلودگی در گروه فاقد این دو متغیر مشاهده شد.

بحث

با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و مضرات آن‌ها، در سال‌های اخیر تولید کنندگان مواد غذایی گرایش به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی پیدا نموده‌اند. لذا بررسی‌های مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است [۱،۳،٦،۹،۱۱،۱۷].

همان‌گونه که عنوان شد، بررسی‌هایی در مورد اثر ترکیبی نیسین و کارواکرول که یکی از ترکیبات ضدمیکروبی آویشن شیرازی است انجام شده و هیچ پژوهشی در مورد اثر توام ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی (که اضافه بر کارواکرول دارای ترکیبات ضدمیکروبی دیگری نیز است) و باکتری‌های مولد اسید لاکتیک بر روی استافیلوکوکوس اورئوس انجام نپذیرفته است. بررسی‌های دیگری بر روی نقش و اثرات اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دیگر بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی و سلامت غذا، در مدل‌های محیط کشت و غذایی انجام شده است:

در پژوهش انجام شده توسط Bhurinder singh و همکاران در سال (۲۰۰۱) اثرات سینرژیک عصاره آلی سیر[1] و نیسین[2] که یکی از نگهدارنده‌های طبیعی دیگر است به صورت تغییرات حداقل غلظت نگهدارنده[1] بر روی ٦ سویه لیستریا منوسیتوژنز در یک مدل محیط کشت مایع Triptose phosphate broth بررسی شد و یک تاثیر سینرژیک ضدباکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد. علاوه بر این، تاثیر سایر فاکتورهای رشدی از قبیل pH و دماهای ٤ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش pH باعث کاهش تاثیر هر دو ماده (Nisin و AGE) شد. در ضمن تاثیر هر دو ماده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود [۱].

در بررسی دیگری از سوی Smith و همکاران (۲۰۰۱) اثرات چهار اسانس طبیعی گیاهی یعنی اسانس برگبو، میخک، دارچین و آویشن، به عنوان یک نگهدارنده غذایی طبیعی در غلظت‌های صفر، ۰/۵ و ۱ درصد در پنیرهای نرم با چربی کم (Low-fat) و زیاد (Full-fat)، بر علیه لیستریا منوسیتوژنز و سالمونلا انتریتیدیس در دماهای ٤ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد در طی ١٤ روز مورد بررسی قرار گرفت. در پنیر با چربی کم هر چهار اسانس طبیعی در غلظت ۱ درصد باعث کاهش رشد لیستریا منوسیتوژنزتا کمتر از یک کلنی در هر گرم شدند، در مقابل در پنیر با چربی زیاد اسانس میخک تنها اسانسی بود که باعث کاهش مشابه گردید [۲].

همین افراد در بررسی دیگری در سال ۲۰۰٤، توانایی غلظت‌های زیرمهاری اسانس‌های گیاهی را برای تاثیر بر تولید انتروتوکسین‌های A، B و توکسین آلفا از استافیلوکوکوس اورئوس مورد سنجش قرار دادند. غلظت‌های زیر مهاری در اسانس‌های برگبو، میخک، دارچین، جوزهندی و آویشن اثر شاخصی بر کمیت کلی پروتئین خارج سلولی تولید شده نداشتند. همولیز مربوط به اثر توکسین آلفا به طور شاخصی پس از کشت با پنج اسانس گیاهی مذکور کاهش یافت. بالاترین کاهش در نمونه‌های حاوی برگبو، دارچین و میخک بود. هم‌چنین، این سه اسانس به طور شاخصی تولید انتروتوکسین A را کاهش دادند [۱۲].

[1] Aoreous Garlic Exteract, AGE

[2] Nisin

[1] MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

تاسو[1] و نیکاس[2] در سال ۱۹۹٤ اولئوروپین[3] و ترکیبات فنولیک خالص تجاری را از زیتون استخراج کرده و رشد و تولید انتروتوکسین استافیلوکوکوس اورئوس S-6 را در محیط مایع و هم‌چنین در شیر بازساخته (سیستم غذایی مدل) مهار نمودند. آنان دریافتند که مهار این ارگانیسم در محیط مایع N-Z amine A توسط میزان تلقیح، اندازه pH محیط و غلظت افزودنی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. به ویژه، رشد و تولید انتروتوکسین B در محیط مایع با غلظت بالای اولئوروپین (۰/٦ درصد) و هم‌چنین در مورد شیر با غلظت اولیه عصاره، مهار گردید [۱۸]. در بررسی دیگری توسط Canillac و همکاران (۲۰۰۱) اثرات ضدباکتریایی، یعنی MIC و LBC (Lowest Bactericidal Concentration) اسانس طبیعی Picea excelsa بر روی یک سویه Listeria ivanovi، ٦ سویه L.monocytogenes، ۳ سویه Staph. auerus.، ۳ سویه E. coli، ۱ سویه Kelebsiella pneumoniea تحت گروه pneumoniae، ۱ سویه Enterobacter cloacae در یک مدل محیط کشت مایع یعنی Tripticase soy broth همراه با مکمل عصاره مخمر بررسی شد. غلظت‌ها به میزان ۰ تا ۱٦ درصد از اسانس مورد نظر در محیط کشت مذکور مورد استفاده قرار گرفت و بعد از تلقیح باکتریایی نتایج به این ترتیب به دست آمد که برای باکتری‌های گرم مثبت غلظت ۰/۰۷ درصد اسانس گیاه مذکور سبب جلوگیری از رشد حدود ۱۰۵ باکتری در هر میلی‌لیتر از محیط کشت گردید و غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد دارای خاصیت باکتریوسیدی برای حدود ۱۰۷ – ۱۰۵ باکتری در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. درحالی‌که کلی فرم‌ها در تعداد ۱۰۵ در هر میلی‌لیتر مقاوم بوده و در ۸ درصد از این اسانس طبیعی پایدار بودند.

در بررسی دیگری توسط ویریندا[4] و همکاران، اثرات ضدلیستریایی روغن میخک در مدل‌های غذایی یعنی گوشت و پنیر در دو دمای ۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد لیستریا منوسیتوژنز در هر دو دما و هر دو مدل غذایی گردید. بنابراین، چنین نتیجه‌گیری شد که اسانس میخک دارای یک اثر بالقوه به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و پنیر است [۱۳].

بررسی‌های مشابه دیگر توسط Pao chuan hedieh و همکاران و Skandamis و همکاران (۲۰۰۱) پیرامون اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی برخی از اسانس‌های طبیعی گیاهی بر روی پاتوژن‌های مهم غذایی در مدل‌های غذایی و محیط کشت انجام شده است [۱٤،۱۵].

هم‌چنین Arques و همکاران (۲۰۰۵) اثر ترکیبی تیمار با فشار بالا (HP) و باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین (BP-LAB) را بر روی بقای لیستریامنوسیتوژنز Scott A در لگاریتم ٤/۸۰ cfu/mL همراه با استارتر تجاری و یکی از هفت سویه BP-LAB در پنیر حاصل از شیرخام بررسی کردند. در روز سوم، شمار لیستریا منوسیتوژنز در پنیر کنترل (بدون BP-LAB وتیمار با HP) به ۷/۰۳ log cfu/g، در پنیرهای حاوی BP-LAB به ٦/۷٤–٦/۰٦ log cfu/g، در یک پنیر فاقد BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa تیمار شده بود به ٦/۱۳ log cfu/g، در نمونه دیگر با فشار ۵۰۰ MPa به ۲/۰۱ log cfu/g، در پنیرهای حاوی BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa تیمار شده بودند به ۵/٤۳ – ۳/۸۳ log cfu/g و در نمونه‌های مشابهی که با فشار ۵۰۰MPa تیمار شدند به ۱/۸۱ log cfu/g یا کمتر رسید [۵].

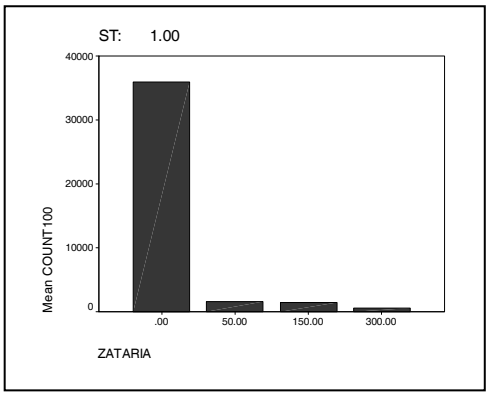
Oussalah و همکاران (۲۰۰۵) اثرات مهارکنندگی ۲۸ نوع اسانس گیاهی انتخاب شده را برروی رشد چهار باکتری پاتوژن شامل: اشرشیا کلی O157:H7، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسیتوژنز بررسی نمودند. نتایج نشان داد که Corydothimus capitatus، Cinnamomum Cassia و Origanum heracleoticum فعال‌ترین اسانس‌ها علیه باکتری‌های مذکور هستند [۱٦].

Aercolini و همکارانش (۲۰۰۵) نشان دادند که علیرغم اعمال استرس حرارتی به میزان ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ ساعت در طی روند تولید پنیرگرانا پادانو و بیشترین میزان اثر آن در بخش مرکزی نسج پنیر، این فرآیند از تاثیری نسبی بر مهار باکتری‌های تلقیح شده اشریشیا کولی، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار است [۱۰].

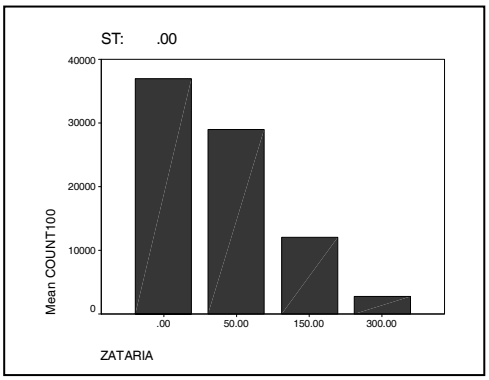
[1] Tassou
[2] Nychas
[3] Oleuropein
[4] Vrinda

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

بدین‌ترتیب بررسی متون نشان می‌دهد که تاکنون در زمینه اثرات ضدمیکربی اسانس‌های گیاهی در طی مراحل تولید و رسیدن پنیر پژوهشی صورت نگرفته است. در این بررسی، غلظت ppm ۱۵۰ و ۳۰۰ اسانس آویشن بالاترین اثر مهارکنندگی را بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند، که در ترکیب با غلظت ۰/۵ درصد استارتر پنیر توانستند به طور سینرژیک از رسیدن شمار این باکتری بیماری‌زا به دوز مسمومیت‌زا در پنیر ممانعت نمایند، زیرا استارترهای پنیر نیز قادرند با افزایش اسیدیته و رقابت میکروبی تا حدودی از رشد بسیاری از باکتری‌های دیگر جلوگیری نمایند. در گروه فاقد استارتر، به غیر از نمونه‌های حاوی بالاترین غلظت اسانس مذکور، میزان آلودگی بقیه نمونه‌ها به بالاتر از دوز مسمومیت‌زای این باکتری رسید، که نشانگر ارتباط معنی‌دار بین استارتر پنیر و اسانس آویشن شیرازی از نظر تاثیر ضدمیکربی است ($p<۰/۰۵$). با مقایسه میزان تغییرات و کاهش مقادیر pH در جدول شماره ۱ و پایین‌تر بودن میزان آن در گروه حاوی استارتر، به ویژه در دو هفته نخست دوره رسیدن پنیر، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که خوشبختانه این اسانس گیاهی در کنار اثر مهارکنندگی خود بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، تاثیر بازدارنده معنی‌داری بر فعالیت استارتر پنیر نداشته و بدین ترتیب اختلالی در پنیر فتا و کیفیت آن نداشته است. با توجه به نتایج نمودارهای شماره ۳ و ٤ و از آنجا که در طول فرایند آب‌گیری لخته بیشترین تعداد باکتری‌ها در بافت لخته به دام افتاده و شمار کمتری وارد فاز آب پنیرشده، لذا در قسمت آب پنیر آلودگی کمتری حاصل گردیده است، به گونه‌ای که پایین‌ترین میزان آن در نمونه حاوی استارتر و دارای اسانس با غلظت ppm ۳۰۰ و بالاترین میزان در نمونه‌های فاقد این دو متغیر مشاهده شد.



نمودار شماره ۳- میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در آب پنیر حاصل از پنیرسازی (cfu/ml) مربوط به نمونه‌های دارای استارتر



نمودار شماره ٤- میزان آلودگی به استافیلوکوکوس اورئوس در آب پنیر حاصل از پنیرسازی (cfu/ml) مربوط به نمونه‌های بدون استارتر

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]
[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت کارخانه‌های شیر پاستوریزه می‌ماس و پگاه به خاطر همکاری‌هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Bhurinder S, Bernadette F, Martin R. Synergistic hnhibition of *listeria monosytogenes* by nisin and garlic exteract. *Food Microbiology*. 2001; 18: 133 - 9.

2. Smith P, Stewart J and Fyfe L. The poten tial appliction of plant essental oils as natrural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*. 2001; 18: 463 - 70.

3. Chi-Zhang Y, Yam K L and Chikindas M L. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *Int. J. Food Microbiol*. 2004; 90: 15 - 22.

4. Ettayebi K, Yamani J and Rossi-Hassani B D. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereu*s. *FEMS Microbiol Letters*. 2000; 183: 191 - 5.

5. Arques JL, Rodriquez E, Gaya P, Medina M and Nunez M. Effect of combinations of high-pressure Treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal*. 2005; 15: 893 - 900.

6. Leistner, L and Gorris, L M G. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol*. 1995; 6: 35 - 67.

7. Munoz AS. et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*. 2006; 45: 281 - 8.

8. Yamazaki K, Yamamoto T, and Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiology*. 2004; 21: 283 - 9.

9. Ali MS, Saleem M, Ali Z and Ahmad Z. Chemistry of zataria multiflora (lamiaceae). *Food microbiology*. 2000; 55 (8): 933 - 6.

10. Aercolini D[1] VF[1], Blaiotta G[1], Sarghini F [2] and Coppola S[1]. Response of *Escherichia coli*O157: H7, *Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* to theThermal Stress Occurring in Model Manufactures of Grana Padano Cheese. *J. Dairy Sci*. 2005**;** 88: 3818 - 25.

11. Canillac N and Moury. Antibacterialacctivity fo the essetial oil of picea excelsa on listeria, Staphylococcus aureus and colifom bacteria. *Food Microbiology*. 2001; 18: 261 - 8.

12. Smith P, Stewart J A and Fyfe L. Influence of subinhibitory conditions of plant essential oils on the productions A and B and alfa-toxin by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53: 1023 - 7.

13. Vrinda MK and Grag R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monositogens* in meat and Cheese. *Food Microbiology*. 2001; 18: 647 - 50.

14. Heieh PC, Mau JL and Huang SH. Antimicrobial effect of varius combination of plant exteracts. *Food Microbiology*. 2001; 18: 35 - 43.

15. Skandamis P, Tsingarida E and Nychas G. the effect of organoessentialoil on survival/ death of *salmonella thyphimurium* in meat stored at 5º under aerobic, VP/MAP Conditions. *Food Microbioloy* 2002; 19: 379 - 85.

16. Oussalah M, Caillet S, Saucier L and Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on The growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7*, Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus*

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]

aureus and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007; 18: 414 - 20.

17. Hossienzadeh H, Ramezani Mand G and Salmani A. Chemistry of *zataria multiflora* Boiss exteracts in mice and rats. *Journal of Ethno Pharmacology*. 2000; 73: 379 - 85.

18. Tassou C and NychasG. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Olive Phenolics in Broth and in a Model Food System. *Journal of Food Protection*. 1994; 57: 120 - 4.

[Downloaded from jmp.ir on 2025-08-30]

[DOR: 20.1001.1.2717204.2008.7.25.13.9]