اثر ترکیبی اسانس دارچین و آویشن شیرازی بر رشد *Bacillus cereus* در یک مدل غذایی

زهره مشاک[1]*، بیژن مرادی[2]، بهروز مرادی[3]

۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان
۳- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
*آدرس مکاتبه: کرج، خیابان شهید موذن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، تلفن: ۳٤٤٠٥١٣٠ (٠٢٦)
پست الکترونیک: mashak@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۹ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۱/۳۰

چکیده

مقدمه: ***Bacillus cereus*** **باکتری غذازاد و اسپورداری است که اغلب در فرآورده‌های غذایی مانند گوشت، سبزیجات، سوپ، برنج، شیر و سایر فرآورده‌های لبنی می‌تواند تکثیر نماید. استفاده از اسانس‌های گیاهی از جمله اسانس آویشن شیرازی و دارچین به عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی برای غذا رشد بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا را مهار می‌کنند.**

هدف: **هدف از این تحقیق ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس دارچین و آویشن شیرازی علیه باکتری** ***Bacillus cereus*** **در یک مدل غذایی است.**

روش بررسی: **تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس دارچین و اسانس آویش شیرازی بر باکتری** ***Bacillus cereus*** **در سوپ جو تجاری در دو دمای نگه‌داری ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی زمان‌های معینی از آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.**

نتایج: **در دمای نگهداری ۱۰ درجه سانتی‌گراد غلظت‌های $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ ٤٥ اسانس آویشن شیرازی به همراه $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ ۳۰ دارچین به طور معنی‌داری سبب مهار رشد باکتری** ***Bacillus cereus*** **شد ($p <$ ۰/۰۵). در دمای نگه‌داری ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد باکتری در نمونه‌های حاوی تمامی غلظت‌های دارچین (صفر، ۵، ۱۵ و $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ ۳۰) به همراه غلظت‌های ۳۰ و $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ ٤٥ اسانس آویشن شیرازی نسبت به سایر غلظت‌های آویشن کمتر بود ($p <$ ۰/۰۵).**

نتیجه‌گیری: **اسانس آویشن شیرازی به همراه دارچین در دمای نگهداری ۱۰ درجه سانتی‌گراد و اسانس آویشن شیرازی به تنهایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند رشد باکتری** ***Bacillus cereus*** **را مهار کند. کاربرد این اسانس‌ها به همراه هم می‌تواند در غلظت‌های کمتری موجب مهار رشد باکتری** ***Bacillus cereus*** **شود، و بنابراین خصوصیات حسی قابل قبول غذا نیز حفظ شود.**

گل‌واژگان: **اسانس دارچین، اسانس آویشن شیرازی،** ***Bacillus cereus*****، سوپ جو تجاری**

www.SID.ir

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان به اثرات مضر نگهدارنده‌ها و افزودنی‌های غذایی بیش از پیش اهمیت می‌دهند. لذا تمایل روزافزونی به استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی در مقایسه با کاربرد نگه‌دارنده‌های غذایی شیمیایی به منظور ارتقای کیفیت و سلامتی غذاها پدید آمده است. از بین ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده در فراوری غذا که سبب افزایش ماندگاری آن نیز می‌شود می‌توان به منابع گیاهی نظیر ادویه‌جات، گیاهان، اسانس‌های روغنی و سایر ترکیبات آنها اشاره نمود [۱،۲،۳،٤].

اسانس‌های گیاهی، مایعات روغنی فراری هستند که دارای خواص ضدمیکروبی بوده و تاکنون مطالعات متعددی برای استفاده از آنها جهت کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا و باکتری‌های مولد فساد ارایه شده است [٥،٦]. چون اسانس‌های گیاهی در بسیاری از مواد غذایی جهت ایجاد طعم مطبوع به کار برده می‌شوند، وجود همزمان خواص ضدمیکروبی آنها می‌تواند استفاده از آنها را بدین‌منظور ترغیب نماید [۷]. اداره دارو و غذای کشور امریکا (American Food (FDA) and Drug Administration) نیز استفاده از اسانس‌های روغنی را به عنوان افزودنی‌های غذایی که عموماً بی‌خطر هستند (Generally recognized as safe (GRAS)) به رسمیت شناخته است [۸].

آویشن شیرازی گیاهی از خانواده نعنا است که تنها در کشورهای ایران، پاکستان و افغانستان می‌روید و از دیرباز به طور سنتی به عنوان ماده‌ای ضدمیکروبی و ضدتشنج مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۳،۹،۱۰]. دارچین نیز گیاهی همیشه سبز متعلق به تیره برگ‌بو بوده که عمدتاً بومی کشورهای سریلانکا، هند و چین می‌باشد [۱۱]. اسانس روغنی این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی بوده و به عنوان چاشنی و طعم‌دهنده در غذاها استفاده می‌شود [۱۲]. اجزای تشکیل دهنده این اسانس‌ها بارها مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شده است که سینامالدهاید موجود در دارچین و کارواکرول موجود در آویشن شیرازی از فعالیت ضدباکتریایی برخوردار می‌باشند [۱،۱۳،۱٤]. کارواکرول از طریق ایجاد سوراخ در غشای سلولی باکتری‌های گرم مثبت و تخریب غشاء خارجی (Outer membrane) باکتری‌های گرم منفی و سینامالدهاید از طریق اتصال گروه کربونیلی به پروتئین باکتری‌ها و ممانعت از دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه، خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می‌نمایند [۲].

تعدادی از ترکیبات این اسانس‌ها به وسیله هیأت اروپایی بهداشت غذا، جهت استفاده در مواد غذایی به عنوان طعم‌دهنده ثبت شده است که هیچ‌گونه خطری علیه سلامتی مصرف‌کنندگان ندارند؛ از جمله کارواکرول، کارون، سینامالدهاید، پاراسمین و... معمولاً این طعم‌دهنده‌ها بعد از مطالعات سم‌شناسی و متابولیکی تأیید می‌شوند [۲].

زمان مناسب جهت جمع‌آوری این گیاهان اواخر تابستان بوده و بهترین روش برای تهیه اسانس آن تقطیر با بخار آب (Steam Distillation) است. زیرا در این روش اجزای اسانس با درصد خلوص بالا و به صورت مرغوب‌تری استخراج می‌شوند [۲].

اما از آنجایی که اضافه کردن غلظت‌های بالای اسانس‌ها به مواد غذایی سبب ایجاد طعم نامطلوب می‌شود مصرف آنها با محدودیت‌هایی رو به رو است [۱۵،۱٦،۱۷]. از این رو توصیه می‌شود که اسانس‌ها در قالب مدل سیستم‌های مانعی (Hurdle technology)، در ترکیب با سایر نگه‌دارنده‌های غذایی طبیعی که موجب افزایش اثرات آنها می‌شود مورد استفاده قرار گیرند [۱۵]. بدین ترتیب با پایین آوردن غلظت اسانس‌ها در غذا ویژگی‌های مطبوع غذا نیز حفظ می‌شود.

باکتری *Bacillus cereus* یکی از گونه‌های جنس باسیلوس می‌باشد که از نظر مسمومیت غذایی در صنعت غذا مطرح بوده و تظاهرات مسمویت حاصله به دو صورت استفراغی و اسهالی می‌باشد [۱۸]. وجود اندوسپورهای مقاوم به حرارت این باکتری که در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه مقاومت می‌نماید و همچنین تحمل آن نسبت به سایر استرس‌های فیزیکی و شیمیایی سبب بقا، رشد، تکثیر

Archive of SID
www.SID.ir

و توکسین‌زایی آن در انواع غذاهای گوشتی، غلاته، لبنی، انواع سوپ، پودر و اغذیه خشک و ... می‌شود [۱۴،۱۸،۱۹]. *Bacillus cereus* به میزان ۸۰ تا ۱۰۰ درصد از نمونه‌های غذایی پخته شده، پاستوریزه شده و یخچال‌گذاری شده نظیر نخود، کلم بروکلی، هویج، سیب‌زمینی و پوره سبزیجات نگهداری شده در ۱۰ درجه سانتی‌گراد جدا شده است [۱۹].

تاکنون موارد شیوع زیادی از مسمومیت حاصله از این باکتری، از طریق مصرف سوپ گزارش شده است [۲۰]. چرا که با توجه به اسپوردار بودن این باکتری، حرارت فرآوری به کار برده شده در تهیه انواع سوپ‌های تجاری که به روش غلتک داغ و با استفاده از دمای حدود ۹۵ - ۹۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد، برای از بین بردن آنها مؤثر نمی‌باشد و لذا باکتری *Bacillus cereus* می‌تواند به عنوان یک عامل مخاطره‌آمیز در سوپ‌های تجاری مطرح باشد [۲۱]. در مطالعات پیشین نیز نشان داده شد که اسانس آویشن شیرازی و دارچین به تنهایی در محیط BHI دارای اثرات مهاری بر رشد باکتری *Bacillus cereus* می‌باشد [۱،۲۱،۲۲،۲۳]. به همین دلیل در این مطالعه اثر همزمان این دو اسانس بر روی این باکتری در مدل غذایی سوپ جو تجاری مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه، استخراج اسانس و آنالیز آن

بخش‌های مختلف گیاهان آویشن شیرازی (از شهر شیراز، جنوب ایران) و دارچین (از شهر تریوندروم (Trivandrum)، جنوب غربی هندوستان) شامل گل، برگ، شاخه و پوست درخت در فصل تابستان جمع‌آوری شده و نام علمی گیاه توسط پژوهشکده گیاهان دارویی ایران مورد تأیید قرار گرفت. اسانس از سرشاخه‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی و پوست درخت دارچین به روش تقطیر با بخار آب تهیه شد و سپس توسط دستگاه رنگ‌نگار گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (Gas Chromatography/ Mass Spectrophotometer (GC/MS)) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۲]. بدین منظور دستگاه GC/MS (ترموکوئست فینیگان (Thermoquest Finnigan)) با ستون مویینه به طول ۳۰ m و قطر داخلی ۲۵۰µm و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ µm، با برنامه دمایی ۲۶۵ - ۵۰ درجه سانتی‌گراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و نگه‌داری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گاز حامل هلیم بود که با سرعت $1/5 mm\ min^{-1}$ از لوله عبور می‌کرد. همچنین ظرفیت الکتریکی شناساگر ۷۰ eV IE و دمای منبع یونیزاسیون آن ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود.

تهیه باکتری *Bacillus cereus* و دوز تلقیح باکتریایی

ابتدا کشت لیوفیلیزه *Bacillus cereus* ATCC11778 از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ایران تهیه شد. سپس باکتری لیوفیلیزه دو مرتبه به طور متوالی در لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI Broth (مرک (Merk)، آلمان) در دمای ۳۷ Merk به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد تا باکتری‌ها به حالت رویشی و فعال در بیایند. سپس کشت دوم به میزان پنج به یک با گلیسیرین (Glycerin) استریل مخلوط و در قسمت‌های مساوی در لوله‌های میکروسانتریفیوژ اپندورف (Ependorph micro-centerphuge) استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در طی تحقیق از این کشت‌های نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

جهت تهیه دوز تلقیح، باکتری از لوله میکروسانتریفیوژ به لوله آزمایش حاوی محیط BHI Broth انتقال داده شد و دو بار متوالی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. در این مدت زمان دقیق ۱۸ ساعت، باکتری‌ها به تعداد معینی ازدیاد یافته‌اند. پس مقادیر مختلفی از کشت مذکور به لوله‌های کووت (Cuvett) حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط BHI Broth استریل انتقال داده شد و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (شرکت میلتون ری (Milton Roy company)) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری این لوله‌های کووت

Archive of SID

www.SID.ir

قرائت شد. همزمان محتویات هر یک از لوله‌های کووت به روش کشت سطحی (Double Surface Plating) شمارش شد. بدین‌منظور از هر لوله کووت رقت‌های موازی ۱۰ تایی در محیط آب پپتونه تهیه شد و دو بار کشت سطحی بر محیط BHI Agar انجام گرفت. کشت مذکور به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس شمارش شد. بدین‌ترتیب لوله کووت حاوی 10^{7} CFU ml^{-1} باکتری و جذب نوری لوله مربوطه مشخص شد (OD600nm= ۰/۲۰) و نشان داده شد که برای تهیه تعداد باکتری موردنظر بایستی میزان ۱۳۸۵ µl از محیط کشت BHI Broth ۱۸ ساعت دوم به ۵ میلی‌لیتر محیط BHI Broth استریل اضافه شود [۳،٦،۱٤،۲۳].

طراحی مدل غذایی و تهیه سوپ

جهت ارزیابی اثر اسانس آویشن شیرازی به همراه اسانس دارچین و دمای نگهداری بر باکتری *Bacillus cereus* یک مدل آزمایشی چندعاملی (Multi-factorial) طراحی شد. این مدل شامل دو گروه نمونه‌های سوپ تجاری بود که به طور جداگانه در دو دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد (به عنوان دمای یخچالی) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (به عنوان دمای اتاق) نگهداری می‌شد و در هر گروه پنج غلظت مختلف اسانس آویشن شیرازی (صفر، ۵، ۱۵، ۳۰ و ٤۵ µl 100 ml^{-1}) در ترکیب با چهار غلظت اسانس دارچین (صفر، ۵، ۱۵ و ۳۰ µl 100 ml^{-1}) اعمال شده بود. بنابراین ٤۰ حالت مختلف (۲×۵×٤) سوپ تهیه شد که در طی ۱۲ دوره زمانی (روزهای صفر، ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۹، ۱۲، ۱۵، ۱۸ و ۲۱) مورد آزمایش قرار گرفتند. تمامی مراحل آزمایش سه مرتبه تکرار شد که نتایج تکرارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

سوپ جوی تجاری مورد آزمایش حاوی جو، سیر، پیاز، نمک، روغن، مونوسدیم گلوتامات، اسید سیتریک، آرد گندم و ادویه‌جات بود که بر طبق فرمول کارخانه تهیه شد. از نظر ارزش غذایی هر ۱۰۰ گرم سوپ حاوی ۱ ± ۹ گرم پروتئین، ۱ ± ۸ گرم چربی، ۱ ± ۵۹ گرم کربوهیدرات و ۱۷ ± ۳٤٤ کیلوکالری انرژی بود. سوپ جو مزبور در حجم ۸۰ میلی‌لیتر، در فلاسک‌های استریل توزیع و اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در ۱۵ دقیقه) شد. بعد از نگهداری سوپ‌ها به مدت یک شب در دمای یخچالی، pH آنها توسط pH متر دیجیتال (کورنینگ ام ۲۲۰ (M220 Corning)، امریکا) اندازه‌گیری شد (pH~ ۵/۹). سپس غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و دارچین با توجه به مطالعات پیشین تعیین و به نمونه‌های سوپ اضافه شد [۱،۳،۲۳]. pH نمونه‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد و تغییری در pH نمونه‌ها مشاهده نشد. همزمان نمونه‌های مشابهی از این مدل غذایی، عاری از باکتری، جهت سنجش میزان pH در طی مدت نگهداری (۲۱ روز) در نمونه‌های مختلف سوپ تهیه شد. در هیچ‌یک از مراحل نگهداری سوپ تغییری در میزان pH نمونه‌ها مشاهده نشد.

ارزیابی حسی

اثرات حسی ناشی از افزودن و به کارگیری اسانس آویشن شیرازی به همراه دارچین در سوپ جو تجاری با استفاده از آزمایش قابلیت پذیرش حسی مورد ارزیابی قرار گرفت. هر نمونه سوپ که دارای غلظت‌های معینی از هر دو اسانس دارچین و آویشن بود، به طور مساوی در ظروف شیشه‌ای (۱۰۰ میلی‌لیتر) تقسیم شد. جهت جلوگیری از مخدوش شدن نتایج، ظروف به طور تصادفی کدگذاری شده بودند. ارزیابی حسی توسط یک گروه هفت نفری پس از آموزش آزمون به آنها، صورت پذیرفت. هر یک از اعضای این گروه، سنجش نمونه‌ها را با در نظر گرفتن یک رده‌بندی نه امتیازی بر اساس ویژگی‌های مختلفی نظیر ظاهر، رنگ، بو و طعم انجام داد که بدین شرح بود: ۹= بسیار عالی، ۸= خیلی خوب، ۷= خوب، ٦= نسبتاً خوب، ۵= نه خوب و نه بد، ٤= نسبتاً بد، ۳= بد، ۲= خیلی بد و ۱= بیش از اندازه نامطلوب [۳،۲٤].

تلقیح باکتری به نمونه‌های سوپ و شمارش باکتریایی در طی دوره نگه‌داری

۸ میکرولیتر از سوسپانسیون مرحله قبل حاوی 10^{7} CFU ml^{-1} *Bacillus cereus*، به هر ظرف محتوی ۸۰ میلی‌لیتر سوپ با

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌های معین اسانس‌ها تلقیح شد تا به میزان نهایی 10^3 CFU ml^{-1} *Bacillus cereus* در آنها رسید. رقت‌های متوالی ۱۰ برابر حاوی آب پپتونه ۰/۱ درصد (مرک، آلمان) از نمونه‌های مزبور تهیه شد و از این لوله‌ها کشت سطحی بر روی BHI Agar صورت پذیرفت (۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت) و این شمارش باکتری‌ها طی ۲۱ روز نگهداری نمونه‌ها ادامه یافت.

تحلیل آماری

میانگین داده‌های حاصل از سه بار آزمایش گرفته شد و نمونه‌های حاوی مقادیر بالاتر از 10^6 CFU ml^{-1} و کمتر از 10^2 CFU ml^{-1} مورد ارزیابی قرار نگرفت. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی به همراه دارچین، دمای نگهداری و مدت زمان نگه‌داری بر تغییرات لگاریتم تعداد باکتری در نمونه‌های سوپ به کمک نرم‌افزار SPSS 16.0 (SPSS تحت سیستم عامل ویندوز) و توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه آنووا (ANOVA) با حد معنی‌دار $p<0/05$ و آزمون ضریب همبستگی انجام گرفت. سپس اختلافات شاخص در هر گروه آزمایشی توسط آزمون توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

تحلیل اسانس‌ها

بازدهی بخش‌های هوایی نمونه گیاه آویشن شیرازی که در مجاورت هوا خشک شده بود، در تهیه اسانس برابر با ۱/٦٦ درصد (وزنی/حجمی) بود. درصد اجزای تشکیل‌دهنده اسانس که با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی - طیف نگار جرمی به دست آمد، به طور خلاصه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در این روش ۱۲ نوع ترکیب مختلف شناسایی شدند که ۹۱/۹ درصد از اسانس فوق را تشکیل می‌دهند. عمده‌ترین ترکیب موجود، کارواکرول منوترپن فنولی (Phenolic Monoterpene Carvacrol) به میزان ۷۱/۱۲ درصد و سایر ترکیبات مهم شامل γ- ترپینن (Gamma-terpinene) (۷/۳٤ درصد)، α- پینن (alpha-pinene) (٤/۲٦ درصد) و یوکالیپتول (eucalyptol) (۳/۳۷ درصد) بود.

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد بررسی با استفاده از GC/MS

نام ترکیب	زمان استخراج (min)	درصد
توجن (Thujene)	۹,۳۰	۰/۱۹
آلفا پنین	۹,۳۷	٤/۲٦
بتا پنین	۹,۷٦	۰/٤۳
بتا میرسین (Beta-Myrcene)	۹,۸۵	۰/۸۵
اوکالیپتول	۱۰,۲٤	۳/۳۷
گاما ترپنین	۱۰,۵۵	۷/۳٤
لینالول	۱۰,۹۰	۰/٦۸
تیمول متیل اتر	۱۲,۳٦	۰/٤۷
کارواکرول متیل اتر	۱۲,٤۳	۰/٤٦
کارواکرول	۱۲,۹۹	۷۱/۱۲
ترنس کارفیلن	۱٤,۱۸	۰/٤۱
گلوبولول	۱۵,۸۲	۲/۳۲
جمع	-	۹۱/۹۰

Archive of SID
www.SID.ir

بازدهی پوست خشک شده درخت دارچین نیز، در تهیه اسانس برابر با ٤/٦ درصد (وزنی/حجمی) بود. بر اساس نتایج حاصل از روش رنگ‌نگاری گازی ۹ نوع ترکیب مختلف شناسایی شدند که ۹٦/۹۰ درصد از اسانس فوق را تشکیل می‌دهند (جدول شماره ۲). عمده‌ترین ترکیب موجود، سینامالدهاید (Cinnamon Aldehyde) به میزان ۷۹/۱۰ درصد و سایر ترکیبات مهم شامل سینامیل استات (Cinnamil Acetate) (۵/۲۳ درصد)، اوژنول (Eugenol) (٤/۲۷ درصد) و کاریوپیلن (Caryophyllene) (۳/۳ درصد) بود.

اثرات حسی اسانس‌ها در سوپ تجاری

بهترین غلظت‌های اسانس‌ها برای سوپ جو تجاری غلظت‌های صفر و ۵ $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ دارچین به همراه غلظت ۱۵ $\mu l\ 100ml^{-1}$ آویشن شیرازی بود. با این حال تمامی غلظت‌های اسانس‌ها تقریباً درجه کیفی خوب تا خیلی خوب را کسب کردند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۲- نتایج آنالیز اسانس دارچین مورد بررسی با استفاده از GC/MS

نام ترکیب	زمان استخراج (min)	درصد
ترپنین ٤-ال	۱۰،۳۷	۰/٤۱
۸ و ۱-سینئول	۱۳،۸۳	۰/٦۰
لینالول	۳٤،۵۱	۲/٦٤
آلفا ترپینئول	٤٤،۳۷	۰/۷۰
کاریوپیلن	۵۵،۸۲	۳/۲٦
سینامالدهاید	٦۵،۳۵	۷۹/۱۰
اوژنول	٦۹،٦٤	٤/۲۷
سینامیل استات	۷۱،٦٤	۵/۲۳
کومارین	۸٤،۱٦	۰/٦۹
جمع	-	۹٦/۹۰

جدول شماره ۳- نتایج آزمون اثرات حسی اسانس‌های دارچین و آویشن شیرازی در سوپ تجاری

میانگین پذیرش حسی ± خطای معیار	غلظت اسانس دارچین در نمونه سوپ ($\mu l\ 100\ ml^{-1}$)	غلظت اسانس آویشن شیرازی در نمونه سوپ ($\mu l\ 100\ ml^{-1}$)
۱/۳۸ ± ۷/۷۱	۰	۰
۱/۰٦ ± ۸/۰۷	۰	۵
۱/۳٤ ± ۸/۱٤	۰	۱۵
۱/٤٦ ± ۷/۸۵	۰	۳۰
۱/۵۱ ± ۷/۵۷	۰	٤۵
۱/۲۳ ± ۸/۱۲	۵	۰
۱/۹٦ ± ۷/۹٤	۵	۵
۱/۷٤ ± ۸/۱۷	۵	۱۵
۰/٦۹ ± ۷/۷٤	۵	۳۰
۱/٤۱ ± ۷/۷۳	۵	٤۵

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول شماره ۳

میانگین پذیرش حسی ± خطای معیار	غلظت اسانس دارچین در نمونه سوپ ($\mu l\ 100\ ml^{-1}$)	غلظت اسانس آویشن شیرازی در نمونه سوپ ($\mu l\ 100\ ml^{-1}$)
۱/۰۳ ± ۷/۹۲	۱۵	۰
۱/۴۳ ± ۷/۸۱	۱۵	۵
۱/۵۲ ± ۷/۳۱	۱۵	۱۵
۱/۷۶ ± ۷/۱۱	۱۵	۳۰
۱/۰۴ ± ۷/۰۹	۱۵	۴۵
۱/۴۷ ± ۷/۱۲	۳۰	۰
۱/۵۳ ± ۷/۲۷	۳۰	۵
۱/۳۹ ± ۶/۹۴	۳۰	۱۵
۱/۳۷ ± ۷/۰۵	۳۰	۳۰
۰/۸۶ ± ۷/۰۲	۳۰	۴۵

اثر اسانس‌ها و دمای نگه‌داری بر رشد باکتری *Bacillus cereus* در سوپ جو تجاری

دمای نگهداری تأثیر معنی‌داری بر رشد باکتری *Bacillus cereus* در نمونه‌ها داشت ($p<0/05$). به طوری که دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش رشد باکتری نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شده بود. بنابراین جهت بررسی اثر مهاری اسانس‌ها بر رشد باکتری *Bacillus cereus* در طی ۲۱ روز، نمونه‌های مورد بررسی در دو گروه آماری (نگهداری شده در ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری مورد نظر در نمونه‌های مدل غذایی در نمودار شماره ۱ ارایه شده است.

در دمای نگهداری ۱۰ درجه سانتی‌گراد اسانس‌ها در ترکیب با هم توانستند به طور معنی‌داری موجب کاهش تعداد باکتری شوند. این کاهش در غلظت $\mu l\ 100ml^{-1}$ ۴۵ اسانس آویشن شیرازی به همراه $\mu l\ 100ml^{-1}$ ۳۰ دارچین مشاهده شد و کاربرد هر یک از اسانس‌ها به طور جداگانه و همچنین به صورت توام در قالب سایر غلظت‌های نام برده نتوانست موجب کاهش معنی‌دار باکتری شود (نمودار شماره ۱).

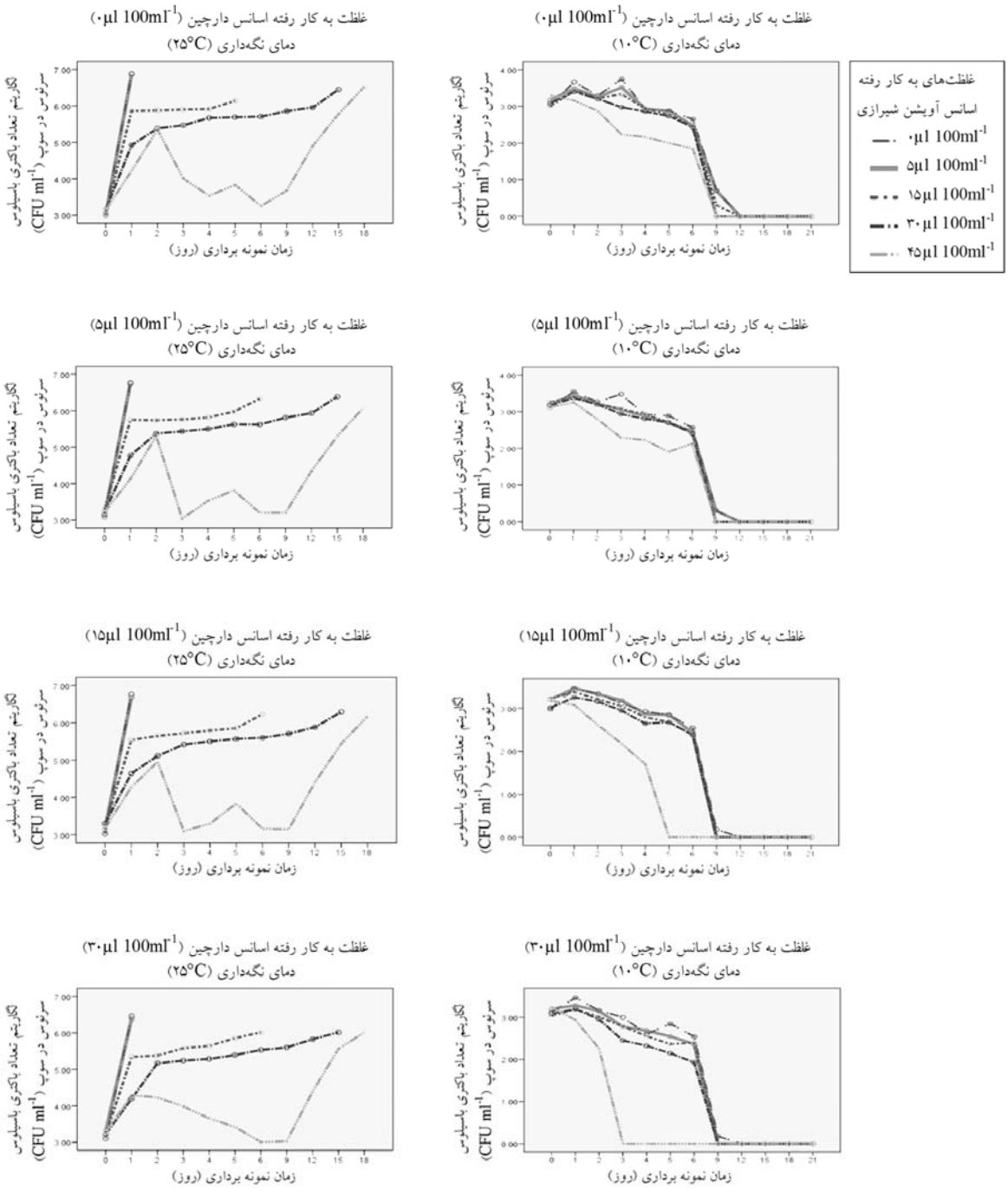
در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اثر مهاری ترکیبی بین اسانس‌های دارچین و آویشن شیرازی مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هیچ‌یک از غلظت‌های اسانس دارچین به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر مهار رشد باکتری *Bacillus cereus* ندارد. غلظت‌های ۳۰ و ۴۵ $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با غلظت‌های دیگر آن (صفر، ۵ و ۱۵ $\mu l\ 100ml^{-1}$) در دمای مزبور بدون این که اثر سینرژیکی با اسانس دارچین (صفر، ۵، ۱۵ و ۳۰ $\mu l\ 100ml^{-1}$) داشته باشد به طور معنی‌داری موجب کاهش رشد باکتری *Bacillus cereus* شد.

داده‌ها توسط آزمون پراکنش دوطرفه ANOVA مورد تحلیل قرار گرفت و نتایج نشان داد که در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد اثر ترکیبی اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین می‌تواند به طور معنی‌داری موجب مهار رشد باکتری مزبور شود ($p<0/05$). در صورتی که چنین اثر ترکیبی بین اسانس‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده نشد.

بحث

در ایران از دیرباز استفاده از ترکیب دو یا چند ادویه با هم جهت ایجاد طعم، بو و رنگ و نهایتاً خوشمزگی غذا مرسوم بوده است و اثرات ضدمیکروبی این اسانس‌ها به عنوان نگهدارنده‌های غذایی در مطالعات مختلف بارها مورد تأیید

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار شماره ۱- روند رشد باکتری *Bacillus cereus* (log10 CFU ml^{-1}) در دو دمای نگهداری ۱۰ (سمت راست) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد (سمت چپ) حاوی غلظت‌های مختلف اسانس دارچین (صفر، ۵، ۱۵ و ۳۰ µl 100 ml^{-1}) و آویشن شیرازی (صفر، ۵، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ µl 100 ml^{-1})، در طی مدت نگهداری (۲۱ روز) در نمونه سوپ جو تجاری

www.SID.ir

قرار گرفته است. لذا در این مطالعه تصمیم گرفته شد که از ترکیب دو اسانس دارچین و آویشن شیرازی جهت بررسی اثرات ضدمیکروبی و همچنین ایجاد یک چاشنی جدید استفاده شود. مطالعات پیشین نشان داده است که اگر به جای یک اسانس به عنوان نگهدارنده غذایی دو یا چند اسانس با هم مورد استفاده قرار گیرد، با کاربرد غلظت‌های کمتری از آنها می‌توان ضمن دستیابی به خواص ضدمیکروبی قابل قبول در غذا به حفظ خصوصیات حسی و تغذیه‌ای آن نیز کمک نمود [۱،۳].

در مطالعات بسیاری اثرات کاربرد اسانس‌های آویشن شیرازی و یا دارچین به همراه سایر اسانس‌ها به عنوان نگهدارنده غذایی مورد بررسی قرار گرفته است. سینرژیسم بین دو اسانس روغنی زمانی مشاهده می‌شود که اثر ضدمیکروبی ترکیبی آنها بیش از اثر کاربرد هر یک از آن‌ها به تنهایی باشد [٤].

در مطالعه هسیه و همکاران (۲۰۰۱) به منظور افزایش اثرات مهاری سینرژیکی، از ترکیب ۳ عصاره گیاهی (دارچین، موسیر و شهد کورنی) به نسبت‌های مختلف (۸:۱:۱) بر رشد ۱۵ گونه باکتریایی استفاده شد که تحت نسبت‌های مزبور خاصیت ضدباکتریایی مطلوبی به دست آمد [۱۵].

نتایج به دست آمده از مطالعات دیگر نشان داد که افزایش فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی و دارچین به همراه سایر اسانس‌های گیاهی افزایش داشت [۲۱،۲۵،۲٦]. والرو (Valero) و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اثرات باکتریوسیدال سینامالدهاید علیه *Bacillus cereus* به همراه تیمول افزایش می‌یابد [۱۷،۲۷].

در این مطالعه نیز اثر ترکیبی اسانس دارچین (صفر، ۵، ۱۵ و ۳۰ $\mu l\ 100ml^{-1}$) و آویشن شیرازی (صفر، ۵، ۱۵، ۳۰ و ٤۵ $\mu l\ 100ml^{-1}$) بر مهار رشد *Bacillus cereus* در سوپ جو تجاری در دو دمای ۱۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد طی ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفته است که این اثر در دماهای مختلف نگهداری متفاوت بود.

بر اساس نتایج به دست آمده مهار رشد باکتری توسط ترکیب دو اسانس در دمای نگهداری ۱۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۲۵ درجه سانتی‌گراد از نظر آماری قابل توجه می‌باشد و بهترین نتایج مهار رشد باکتری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در نمونه دارای غلظت‌های $30\mu l\ 100ml^{-1}$ اسانس دارچین به همراه $\mu l\ 100ml^{-1}$ ٤۵ اسانس آویشن شیرازی به دست آمد. اما در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گونه اثر مهاری بر رشد باکتری توسط اسانس دارچین به تنهایی و همچنین دو اسانس به صورت سینرژیکی مشاهده نشد. هر چند اسانس آویشن شیرازی به تنهایی در غلظت‌های ۳۰ و $\mu l\ 100\ ml^{-1}$ ٤۵ توانست به طور معنی‌داری موجب کاهش رشد *Bacillus cereus* شود.

با توجه به این که بیشترین اجزای حاصله از تجزیه دو اسانس آویشن شیرازی و دارچین با استفاده از روش GC/MS به ترتیب کارواکرول (۷۱/۱۲ درصد) و سینامالدهاید (۷۹/۱۰ درصد) بود، نتایج به دست آمده از بررسی اثرات ضدباکتریایی این اجزا در مدل‌های مختلف غذایی در مطالعات پیشین قابل توجه می‌باشد.

مشابه نتایج به دست آمده از غلظت‌های مختلف دو اسانس دارچین و آویشن شیرازی در مطالعه کنونی، اولتی (Ultee) (۲۰۰۰) در مطالعه خود از عصاره کارواکرول به میزان ۰/۱۵ تا $\mu l\ g^{-1}$ ۵۰ در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد در برنج پخته حاوی *Bacillus cereus* استفاده نمود که تعداد باکتری‌ها در مقایسه با گروه کنترل به میزان قابل توجهی کاهش یافت. در حالی که کاربرد اسانس دارچین (Sage Oil) به میزان ۰/۲ تا $\mu l\ g^{-1}$ ۰/۵ علیه *Bacillus cereus* موجود در برنج غیرمؤثر بود [۲۲]. به طور کلی می‌توان چنین استنباط کرد که خصوصیات ضدباکتریایی کارواکرول بیش از سینامالدهاید است [۲].

پیش از این عنوان شده بود که سینامیک آلدهید در غلظت‌های مشابه کارواکرول و تیمول، سبب مهار رشد E.coli O157:H7 و سالمونلا تیفی‌موریوم نمی‌شود و غشای خارجی سلول را تجزیه ننموده و ATP آن تخلیه نمی‌شود. ولی گروه کربونیل آن با اتصال به پروتئین‌ها از عمل دکربوکسیلاسیون اسید آمینه در انتروباکتر آئروژنز جلوگیری می‌کند [۲۸].

Archive of SID

www.SID.ir

در مقابل، کارواکرول دارای یک گروه هیدروکسیلی متصل به حلقه فنولی می‌باشد که سبب قابل نفوذ شدن غشای سلولی می‌گردد و از طریق قرار گرفتن در بین زنجیره‌های اسیدهای چرب غشای سلولی باکتری *Bacillus cereus* موجب تخریب آن می‌شود [۲۲]. این تغییر ساختار فیزیکی باکتری منجر به گستردگی و عدم ثبات غشا، افزایش حالت مایع غشا و در نتیجه افزایش قابلیت نفوذ غیرفعال در آن می‌گردد [۲۵]. در مطالعه دیگری از اولتی (۱۹۹۹) نشان داده شد که پس از مواجهه باکتری *Bacillus cereus* با کارواکرول مقادیر ATP در داخل سلول در مقایسه با خارج سلول و همچنین پتانسیل غشایی سلول‌ها در مرحله رشد نمایی پس از افزودن کارواکرول کاهش مشخص یافته که دال بر ضعیف شدن نیروی محرکه پروتونی در باکتری مزبور بوده است [۲۲].

در مطالعه دی پاسکووا (Di Pasqua) و همکاران (۲۰۰۶) اسانس‌های روغنی لیمو، دارچین، کارواکرول و اوژنول از طریق تغییر در ترکیب اسیدهای چرب غشا و زنجیره‌های طویل اسیدهای چرب اشباع سویه‌های سالمونلا و اشریشیاکلی سبب مهار رشد آنها شده است [۲۹].

پیش از این اثرات ضدمیکروبی اسانس دارچین (توسط والرو؛ ۲۰۰۶) و آویشن شیرازی (توسط میثاقی و آخوندزاده بستی؛ ۲۰۰۶) علیه باکتری *Bacillus cereus* نشان داده شده است [۱،۲۷]. والرو (۲۰۰۶) تأثیر سینامالدهاید بر روی سینتیک رشد چهار سویه *Bacillus cereus* در آبگوشت هویج تندالیزه شده را در دماهای نگهداری ۵ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار داد و نشان داد که افزودن ۲ میکرولیتر سینامالدهاید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آبگوشت هویج در حرارت کمتر از ۸ درجه سانتی‌گراد، قادر به جلوگیری از جوانه‌زنی اسپورهای سویه‌های سرمادوست *Bacillus cereus* در طی ۶۰ روز شده است. ولی در دماهای بالاتر از ۱۲ درجه سانتی‌گراد قادر به جلوگیری از رشد باکتری نبوده است [۲۱].

در مطالعه حاضر نیز اثر مهاری اسانس دارچین به طور سینرژیکی همراه با اسانس آویشن شیرازی بر روی رشد باکتری *Bacillus cereus* تنها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده است.

میثاقی و آخوندزاده بستی (۲۰۰۶) مهار رشد باکتری *Bacillus cereus* را در محیط BHI Broth توسط اسانس آویشن شیرازی در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با غلظت $15\ \mu l\ 100\ ml^{-1}$ مشخص کردند. به طور کلی عوامل زیادی در شناسایی اثر ضدمیکروبی یک غلظت خاص از اسانس‌های روغنی مؤثر می‌باشد؛ از جمله خصوصیات داخلی غذا (نظیر میزان pH و ...)، خصوصیات خارجی غذا (نظیر دما و بسته‌بندی و ...) و همچنین مشخصات سویه‌ای و میزان تلقیح میکروارگانیسم‌ها و نهایتاً وضعیت فیزیکی غذا (به صورت ژل، امولسیون، خشک، مایع و ...) می‌باشد [۲]. بر اساس مطالعات اسمید (Smid) و گوریس (Gorris) (۱۹۹۹) نیز باید جهت حفظ خصوصیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی در غذا از غلظت‌های بالاتر اسانس در مقایسه با غلظت‌های مشابه در محیط‌های آزمایشگاهی استفاده نمود [۸]. در مطالعه حاضر نیز در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد هیچ‌کدام از غلظت‌های اسانس‌های آویشن شیرازی یا دارچین به تنهایی نتوانستند مانع رشد باکتری *Bacillus cereus* در سوپ تجاری شوند.

یافته‌های این مطالعه مؤید اثر سینرژیستی اسانس دارچین و آویشن شیرازی بر مهار رشد باکتری *Bacillus cereus* در دمای یخچالی می‌باشد. با کاربرد ترکیبی این اسانس‌ها ضمن فراهم آمدن اثرات ضدمیکروبی مناسب، می‌توان به اغذیه‌ای با طعم و رایحه دلخواه دست یافت. همچنین بررسی اثر چنین اسانس‌های گیاهی و مکانیسم عمل آنها بر سایر باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند در راهبرد حذف افزودنی‌های شیمیایی مضر از فرآورده‌های غذایی مؤثر باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Akhondzadeh Basti A, 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 Sc. Tech*. 2007; 40: 973 - 81.

2. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review, *Int. Food Microbiol*. 2004; 4 (3): 233 - 53.

3. Moosavy MH, Akhondzadeh Basti A, Misaghi A, Zahraei Salehi T, Abbasifar R, Ebrahimzadeh Mousavi HA, Alipour M, Razavi NE, Gandomi H and Noori N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Res. Int*. 2008; 41 (10): 1050 - 7.

4. Davidson PM, Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Doyle MP, Beuchat LR and Montville TJ. (Eds.), *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*, ASM Publications, Washington, DC, 1997, pp: 520 - 56.

5. Hao YY, Brackett RE and Doyle MP. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol*. 1998; 15: 367 - 78.

6. 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.

7. Ghahreman A. Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Iran. 1986, pp: 102 - 5.

8. Smid EJ and Gorris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman MS. *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker Inc. New York. 1999, pp: 285 - 308.

9. Ali MS, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Laminaceae). *Phytochem*. 2000; 55: 933 - 6.

10. Hosseinzadeh H, Ramezani M and Salmani GA. Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. *J. Enthopharmacol*. 2000; 73: 379 - 85.

11. Wijesekera ROB, Jayewardene AL and Rajapakse L S. Volatile constituents of leaf, stem and root oils of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *J. Sc. Food and Agric*. 2006; 25 (10): 1211 - 20.

12. Chen CP. Development and Characterization of the Natural Antimicrobials. M.Sc. Thesis, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung, Taiwan. 1998, pp: 76 - 103.

13. Chang HW. Antibacterial effect of spices and vegetables. *Food Industries (ROC).* 1995; 27: 53 - 61.

14. Jay MJ. Modern Food Microbiology. 6nd ed. An Aspen Publication. USA. 2000, pp: 441-456.

15. Hsieh PC, Mau JL and Huang SH. Antimicrobial Effect of Various Combinations of Plant Extracts. *Food Microbiol*. 2001; 18: 35 - 43.

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

17. Pol LE and Smid EJ. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Lett. Applied Microbiol.* 1999; 29: 166 - 70.

18. Varnam AH and Evance MG. Foodborne Pathogens: An Illustrated Text, Section 13. *Bacillus*. Washington DC, 1991, pp: 266 - 87.

19. Kramer JM and Gilbert RJ. *Bacillus cereus*

Archive of SID

www.SID.ir

and other Bacillus species: Doyle MP. *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker Inc. New York. 1989, pp: 21 - 70.

20. CDC. *Communicable Disease Report*. 1986; 35 (25): 408 - 10.

21. Valero M and Frances E. Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiol*. 2006; 23: 68 - 73.

22. Ultee A and Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol*. 2001; 64 (3): 373 - 8.

23. Misaghi A and Akhondzadeh Basti A. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control* 2007; 18 (9): 1043 - 9.

24. Larmond E, Butter G, Mackie DA, Paste LM. Laboratory methods for sensory evaluation of food. Research Branch, Agriculture Canada Publication 1864/E. Ministry of Supply and Services. Canada. 1991, pp: 64 - 7.

25. Ultee A, Bennik HJ and Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *App. Environ. Microbiol*. 2002; 68: 1561 - 8.

26. Pajohi MR, Tajik H, Farshid AA, Akhondzadeh Basti A, Hadian M. Effects of *Mentha longifolia* L. Essential Oil and Nisin Alone and in Combination on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in a Food Model and Bacterial Ultrastructural Changes. *Foodborne Pathgens and Disease*. 2011; 8 (2): 283 - 90.

27. Valero M and Giner MJ. Effect of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory qualities of carrot broth. *Int. J. Food Microbiol*. 2006; 106 (1): 90 - 4.

28. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Protec*. 1995; 58 (3): 280 - 3.

29. Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem*. 2006; 54 (7): 2745 - 9.

Archive of SID

www.SID.ir