اثر اسانس رزماری بر جمعیت لاکتوباسیل‌ها و میزان هیستامین طی دوره رسیدن در پنیر سنتی لیقوان

رامین شیشه‌گر[۱]، حمید میرزائی[۲*]، خسرو محمدی[۳]، گیتی کریم[٤]، ودود رضویلر[٥]

۱. دانشجوی دکترای بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ، تبریز، ایران
۳. استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز ، تبریز، ایران
٤. استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hmirzaei@iaut.ac.ir

(دریافت: ۹۷/٤/٦ پذیرش نهایی۹۷/۵/۱۳)

چکیده

مسمومیت هیستامینی یکی از نگرانی‌های مهم در سلامت پنیرهای سنتی رسیده بوده و مهم‌ترین عامل تولید آن میکرارگانیسم‌های دکربوکسیله کننده در طی دوره رسیدن می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر اسانس رزماری بر جمعیت لاکتو باسیلوس‌ها و میزان هیستامین در پنیر لیقوان در طول دوره رسیدن با روش HPLC بود. ترکیب شیمیائی اسانس با استفاده از GC/MS مورد شناسائی قرار گرفت. نمونه‌های پنیر حاوی صفر، ۱۲۵ و ppm ۲۵۰ از اسانس رزماری تهیه شد. نمونه‌ها در روزهای صفر، ۳۰، ۹۰ و ۱۵۰ دوره رسیدن از نظر تعداد باکترهای لاکتوباسیلوس و میزان هیستامین مورد آزمایش قرار گرفتند. آلفاپینن (Alfa pinene) با ۱۱/۱ درصد، کامفور (Camphore) با ۱۰/۲ درصد و لیمونن – د (Limonene-d) با ۵/۹ درصد، ۳ جزء عمده موجود در اسانس بود. میانگین تعداد لاکتوباسیل ها در روزهای ۳۰، ۹۰ و ۱۵۰ دوره رسیدن در نمونه‌های حاوی ۱۲۵ و ppm ۲۵۰ اسانس رزماری به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد بود (P<۰/۰۵). در طول دوره رسیدن میزان هیستامین در نمونه‌های حاوی اسانس کمتر از نمونه‌های شاهد بوده و در انتهای دوره رسیدن میزان هیستامین در نمونه‌های شاهد، حاوی ۱۲۵ و ppm ۲۵۰ اسانس رزماری به‌ترتیب برابر ۱۹۰، ۱۷۰ و ppm ۵۱/۰٤ بود. در مجموع می‌توان گفت که غلظت‌های ۱۲۵ و ppm ۲۵۰ از اسانس رزماری می‌تواند به‌عنوان یک ماده نگه‌دارنده طبیعی در پنیرهای سنتی لیقوان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس رزماری، هیستامین، لاکتوباسیلوس‌ها، پنیر لیقوان، دوره رسیدن

مقدمه

مسمومیت هیستامینی (Histamine poisoning) یکی از نگرانی‌های مهم در سلامت و ایمنی مواد غذائی می‌باشد (Nei *et al.*, 2017). مصرف مواد غذائی حاوی مقادیر بالای هیستامین، سلامت انسان را به مخاطره انداخته و منجر به بروز علائم و مشکلاتی از جمله تهوع، ناراحتی تنفسی، قرمزی صورت، عرق کردن، تپش قلب، سردرد، تب، سوزش دهانی، افزایش یا کاهش فشار خون در مصرف کنندگان می‌گردد (Nei *et al.*, 2017; ; Zoauali *et al.*, 2010; Ferreira and Viljoen, 2003). این علائم در افراد بیماری که از غذاهای حاوی مقادیر بالای هیستامین استفاده می‌کنند خیلی شدیدتر بروز می‌کند (Petrovic *et al.*, 2015). از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۶ در آمریکا ۱۸۷ مسمومیت هیستامینی و ۷۵۲ بیمار در این خصوص گزارش شده است (Toda *et al.*, 2009). در اروپا در فاصله بین سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۱۰، بیشتر از ۱۰۰ مورد از مسمومیت هیستامینی گزارش شده است (European Food Safety Authority, 2011). در ژاپن ۸۹ همه‌گیری مسمومیت هیستامینی شامل ۱۵۷۷ بیمار در فاصله بین سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۸ گزارش شده است (Toda *et al.*, 2009). در عمل تعداد مسمومیت هیستامینی می‌تواند بیشتر از این اعداد باشد زیرا ممکن است بسیاری از موارد مسمومیت با علائم ضعیف و متوسط گزارش نشده باشد (Nei *et al.*, 2017).

مقدار زیاد هیستامین معمولاً در فرآورده‌های تخمیری از جمله پنیر سنتی رسیده مشاهده می‌شود (Pircher *et al.*, 2007). پنیر بعد از ماهی دومین عامل مسمومیت هیستامینی می‌باشد (Stratton *et al.*,1991). غلظت این ترکیبات در پنیر می‌تواند به ۲۰۰۰ mg/kg برسد (Roig-Sagues *et al.*, 2002; Fernandez *et al*. 2007). برخی از شرایط امکان تولید مقدار زیاد هیستامین در دوره رسیدن پنیر را فراهم می‌نماید. میکروارگانیسم‌های دکربوکسیله کننده به‌عنوان مهم‌ترین عامل، مواد اولیه مورد نیاز، شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها مثل pH، آب فعال و دما از جمله این شرایط می‌باشد (Roig-Sagues *et al.*, 2002). گروه‌های مختلف باکتریایی از قبیل لاکتوباسیل ها، انتروباکتریاسه، انتروکوکسی‌ها، میکروکوکسی‌ها، لاکتوکوکوس‌ها و سودوموناس‌ها نقش بسیار مهمی را در تولید آمین‌های بیوژن در پنیرهای تهیه شده از شیر خام و دارای دوران رسیدن طولانی ایفا می‌کنند از میان این گروه‌های میکروبی لاکتوباسیل ها نقش مهمی را در تولید هیستامین بازی می کنند (Varnam and Sutherland, 1999; Mirzaie, 2011; Shanli and Shanel, 2015; Andiç *et al*, 2010) افزایش میزان هیستامین اغلب به استفاده از مواد خام با کیفیت پایین، آلودگی، فرآوری و یا نگهداری نامناسب ماده غذایی مربوط بوده و به همین علت مقدار هیستامین می‌تواند به‌عنوان شاخص خوبی برای بررسی کیفیت بهداشتی ماده غذایی و نشانگر درجه تازگی یا فساد غذا نیز کاربرد داشته باشد (Mahmoudi and Mardani, 2015; Razavi Rouhani *et al.*, 2013; Zaouali *et al.*, 2010; Ferreira and Viljoen, 2003). پنیر لیقوان به‌عنوان یک پنیر سفید رسیده در آب نمک بوده و یکی از پرمصرف‌ترین نیرهای سنتی ایران می‌باشد که در روستای لیقوان واقع در جنوب‌شرقی تبریز تولید می‌گردد. در تولید این پنیر از شیر خام گوسفند و معمولاً همراه با حدود ۲۰ الی ۳۰٪

شیر بز و بدون مایه کشت استفاده می‌گردد. این پنیر در طول دوره رسیدن ۳ تا ۱۲ ماهه، طعم ملایم نمکی و اسیدی و عطر و بوی بسیار مطبوع پیدا می‌کند (Mirzaie, 2011).

روش‌های مختلفی از جمله افزودن مواد نگهدارنده، اعمال فشار بالای هیدروستاتیک، پرتودهی، سالم سازی حرارتی، اضافه کردن مایه‌های کشت مکروبی و بسته‌بندی مناسب برای کاهش آمین‌های بیوژن در مواد غذائی پیشنهاد شده است (Es'haghi Gorji *et al.*, 2014). با عنایت به تولید پنیر لیقوان از شیر خام و عدم استفاده از مایه کشت میکروبی در تولید آن، به‌نظر می‌رسد که یکی از عملی‌ترین روش‌های قابل استفاده برای کاهش آمین‌های بیوژن استفاده از مواد نگهدارنده می‌باشد. نگرانی در خصوص استفاده از برخی نگهدارنده‌های شیمیایی و واکنش منفی مصرف کنندگان به استفاده از این مواد موجب افزایش توجه به نگهدارنده‌های طبیعی به‌عنوان جایگزین نگه دارنده‌های شیمیایی شده است. در این میان توجه تولید کنندگان و مصرف کنندگان به استفاده از اسانس‌های گیاهی معطوف شده است. خواص ضدمیکروبی این مواد بر علیه طیف وسیعی از باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به اثبات رسیده است (Semeniuc *et al.*, 2017; Sienkiewicz *et al.*, 2013; Burt, 2004; Smith-palmer *et al.*, 2001; Tassou *et al* ., 2000). اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیبات Generally Recognized as Safe (GRAS) می‌باشند که به‌طور گسترده در صنایع غذایی کاربرد دارند (Jafarzadeh khaledi *et al.*, 2011). به‌طور کلی هر چه مقادیر مواد فنولیک در اسانس بالاتر باشد، خواص آنتی‌باکتریال آن‌ها علیه پاتوژن‌های غذایی بیشتر خواهد بود. این ترکیبات شامل کارواکرول، اوژنول و تیمول می‌باشند (Bagamboula *et al.*, 2004; Burt, 2004). رزماری با نام علمی *Rosemarinus Officinalis* یکی از گیاهان معطر دارویی و از تیره نعناعیان (Lamiacea or Labiatae)، چند ساله و به فرم بوته‌ای بوده و در تمام فصول سال سر سبز می‌باشد از ویژگی‌های این گیاه بوی فراوان برگ‌ها می‌باشد این گیاه بومی مدیترانه بوده و در بخش‌های وسیعی از ایران نیز کشت می‌شود. اسانس رزماری با کاربرد طعم دهندگی در مواد غذایی استفاده می‌شود و هم‌چنین به‌خاطر داشتن خواص ضدمیکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وسیع و سالم بودن به‌عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است (Sienkiewicz *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2008; Gachkar *et al.*, 2007; Mangena and Muyima, 1999; Lemonica *et al.*, 1996; Zargari, 1990). اکثر ترکیبات مؤثر اسانس که خاصیت ضدمیکروبی دارند در اسانس رزماری ایرانی نیز وجود دارند (Malakootian and Hemmati, 2013).

لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین ترکیب شیمیائی اسانس رزماری و ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف آن بر جمعیت میکروبی لاکتو باسیل‌ها به‌عنوان گروهی از میکروب‌های دکربوکسیله کننده و میزان هیستامین در پنیر لیقوان در طول دوره رسیدن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- روش آماده‌سازی اسانس

برای انجام تحقیق، پس از تهیه گیاه رزماری و تأیید علمی گونه گیاه توسط متخصصین گیاه شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی جهاد کشاورزی استان آذربایجان‌شرقی، اسانس آن به‌روش تقطیر با بخار آب

استخراج شد. پس از شستشوی اولیه جهت جلوگیری از اثر دمای محیط بر روی ترکیبات آن، گیاه به‌مدت یک هفته در دمای محیط خشک شده و سپس آسیاب گردید. استخراج به‌وسیله تقطیر با آب (Hydrodistilation) به‌وسیله دستگاه کلونجر (Clevenger) انجام شد. به این منظور مقدار ۱۰۰ گرم گیاه خشک شده در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب تقطیر شده و به‌مدت حدود ۳ ساعت ادامه یافت. اسانس حاصله توسط سدیم سولفات بی‌آب خشک شده و سپس با کاغذ صافی watman شماره ۲ صاف گردید و تا زمان مصرف در شیشه‌های تیره در بسته در یخچال نگهداری شد ((Jafarzadeh Khaledi *et al*., 2011; Eshaghi Gorji *et al*., 2014).

- روش بررسی ترکیبات اسانس رزماری

اسانس رزماری مورد استفاده پس از آماده‌سازی به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (GC/MS) تزریق شد تا نوع ترکیبات آن‌ها مشخص شود. دستگاه به‌کار رفته از نوع Agillent 49-57-series1200، ساخت کشور آمریکا با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و گاز ناقل هلیوم بود. برای شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، نمونه توسط n–هگزان رقیق شده و به مقدار یک میکرولیتر توسط سرنگ همیلتونی به دستگاه GC/MS تزریق شد. دمای ابتدایی کوره در۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و اسانس در این دما به‌مدت ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه بود و افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و سپس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش و ۳ دقیقه در این دما متوقف گردید. دمای دریچه تزریق روی ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها و به‌دست آوردن شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های بازداری موجود در کتاب مرجع Adams (موجود در نرم‌افزار دستگاه)، با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری Willy (موجود در نرم‌افزار دستگاه)، صورت گرفت. به این نحو درصد ترکیبات اسانس تعیین شد (Tahmasebi *et al*, 2014).

- روش تعیین غلظت‌های مناسب اولیه اسانس جهت افزودن به پنیر

جهت تعیین غلظت‌های مناسب اسانس رزماری، ابتدا غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ppm ۳۰۰ از اسانس رزماری به نمونه‌های رسیده و آماده مصرف پنیر لیقوان خریداری شده از روستای لیقوان اضافه و بعد از همگن‌سازی، توسط گروه ارزیابان از نظر ویژگی‌های حسی مورد ارزیابی قرارگرفت. بر اساس یافته‌های اولیه حاصل از این مرحله مقادیر ۱۲۵ و ppm ۲۵۰ از اسانس رزماری جهت افزودن به شیر انتخاب و در مرحله تولید بلافاصله بعد از افزودن آنزیم رنین به نمونه‌های شیر اضافه و به‌طور کامل همگن شد.

- روش تهیه پنیر

نمونه‌های پنیر مورد نیاز در ۳ تکرار و با استفاده از شیر خام گوسفندی حاوی حدود ۳۰-۲۰ درصد شیر بز تولید شده در روستای لیقوان توسط تولید کنندگان محلی و طبق روش گزارش شده توسط Mirzaei در سال ۲۰۱۱ تهیه شد. در این فرآیند بلافاصله پس از اضافه کردن آنزیم رنین، غلظت‌های مورد نظر اسانس رزماری به شیر خام تلقیح و به‌طور کامل یکنواخت

گردید و در دمای حدود ۳۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ ساعت گرمخانه‌گذاری شد تا عمل انعقاد کامل شود. در ادامه عمل آب‌گیری از لخته و نمک‌زنی و در نهایت بسته‌بندی پنیرها صورت گرفت. سپس نمونه‌های پنیر در ظروف مناسب بسته‌بندی و در طول دوره رسیدن (تا روز ۳۰) در حدود ۱۰ درجه سلسیوس و سپس تا روز ۱۵۰ در دمای حدود ۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Mirzaie, 2011; Tornambe *et al.*, 2007).

- روش ارزیابی میکروبی

برای شمارش لاکتو باسیل‌ها از نمونه‌های پنیر در روزهای تعیین شده در طول دوره رسیدن پنیر (۰، ۳۰، ۹۰ و ۱۵۰) تحت شرایط سترون و بعد از همگن‌سازی، مقدار ۱۰ گرم برداشت و با ۹۰ میلی لیتر محلول سیترات سدیم ۲٪ در دستگاه استومیکر یکنواخت گردید و سپس رقت‌های سریال ۱۰برابر (تا رقت 10^{-8}) در محلول رقیق کننده سالین نرمال تهیه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-3} الی 10^{-8} در محیط کشت اختصاصی deMan Rogosa Sharpe (MRS) agar که pH آن با استفاده از محلول ۱۰ درصد اسید استیک روی ۵/۵ تنظیم شده بود به‌صورت سطحی کشت داده شد و به‌مدت ۲ روز در شرایط بی هوازی با استفاده از جار بی‌هوازی و گاز پک در ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری و در نهایت پرگنه‌های تشکیل شده شمارش و تعداد لاکتو باسیل‌ها در هر گرم از نمونه‌ها محاسبه شد (Forouhandeh *et al.*, 2010).

- آماده‌سازی نمونه برای کروماتوگرافی

دستگاه HPLC مورد استفاده از نوع SERIE 1200, AGILLENT ساخت کشور آمریکا با پمپ quaternary و ستون zorbax-c18 غیرقطبی با دتکتورDAD بود. آماده‌سازی نمونه‌ها با انجام اصلاحات جزئی در روش (Moret and Conte, 1996) از طریق استخراج اسیدی و مشتق‌سازی صورت گرفت. مقدار ۲ گرم ازهر نمونه مستقیماً در لوله سانتریفوژ وزن گردید و به آن ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱۰ درصد اضافه شد. سپس لوله‌های نمونه به‌مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر همگن گردید. سوسپانسیون حاصل در دور۱۲۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی هر لوله جمع آوری و رسوب باقی مانده مجدداً با همان شرایط فوق سانتریفوژ و مجددا مایع رویی حاصل با قبلی مخلوط و به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. به‌منظور مشتق‌سازی نمونه‌ها، ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره به‌دست آمده با ۸۰۰ میکرولیتر دانسیل کلراید مخلوط و سپس به محلول فوق ٤٠٠ میکرو لیتر بیکربنات سدیم اشباع اضافه شد. محلول فوق ۳۰ ثانیه توسط میکسر یکنواخت و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ٦٠ درجه سلسیوس و در محیط تاریک قرار گرفت سپس ۲۰۰ میکرولیتر استاندارد l-prolin به آن اضافه و دوباره توسط میکسر۳۰ ثانیه هم زده شد. محلول حاصله به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر تولوئن به آن اضافه و پس از یک دقیقه هم زدن به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور سانتریفوژ گردید. پس از تشکیل دو فاز متفاوت، فاز تولوئن توسط سمپلر جدا و به داخل بشرهای کوچک منتقل و در روی هات پلیت قرارداده شد تا تولوئن تبخیر گردد. پس از تبخیر، استو نیتریل اضافه و محلول حاصله به دستگاه HPLC تزریق گردید. مراحل فوق برای استاندارد هیستامین نیز انجام گرفت، به‌این ترتیب که در ابتدا از استاندارد هیستامین (Sigma,

Germany)، رقت‌های ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰و ppm ۲۰۰ از محلول استوک تهیه شده و به ستون کروماتوگرافی تزریق گردید و سطح زیر پیک‌های حاصل محاسبه شده و سپس نمودار خط رسم و فرمول خط به‌دست آمد و از آن برای محاسبه میزان آمین‌های بیوژن استفاده گردید (Moret and Conte, 1996; Aliakbarlu *et al.*, 2011; Razavi Rouhani *et al.*, 2013).

- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای ارزیابی و مقایسه میزان تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس روزماری روی میانگین تعداد لاکتوباسیل‌ها در زمان‌های مورد نظر از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرف و برای مقایسه دو به دوی میانگین‌ها از آزمون تعقیبی توکی در سطح $\alpha=$ ۰/۰۵ استفاده شده است.

یافته‌ها

نتایج مربوط به تجزیه اسانس رزماری با استفاده از GC/MS در جدول (۱) نشان داده شده است.

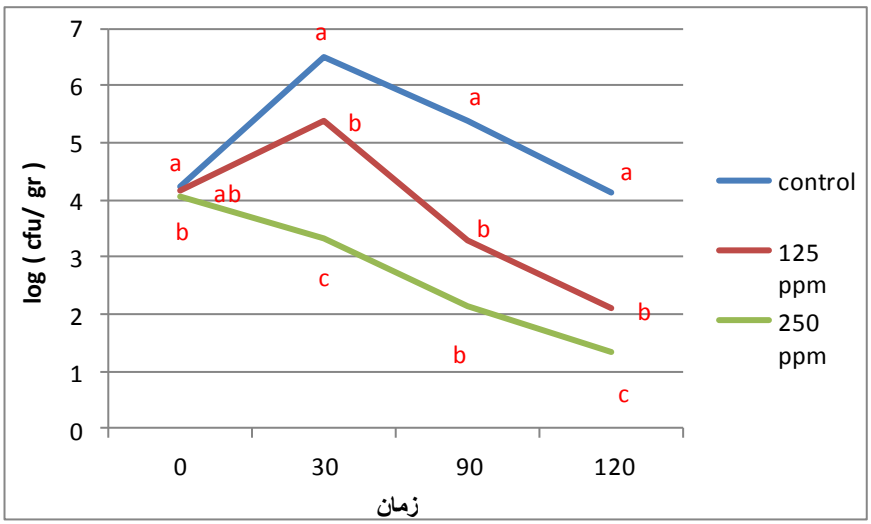
جدول (۱)- اجزای جدا شده از اسانس رزماری به‌روش GC-MS

نام جزء جدا شده	درصد از کل	زمان بازداری (Rt)	خانواده
Alfa pinene	۱۱/۱	۵/۹۰	Monoterpenoid
Verbenene	۴/۳	۶/۴۳	Monoterpenoid
myrcene	۳/۲	۷/۵۰	Monoterpenoid
Beta-myrcene	۱/۵	۷/۵۵	Monoterpenoid
Limonene-l	۳/۳	۸/۶۱	Monoterpenoid
Limonene-d	۵/۹	۸/۷۸	Monoterpenoid
1,8-cineol	۳/۲	۸/۸۷	Oxygenated monoterpenoid
Indene	۱/۱	۱۱/۰۵	Hydrocarbon(polycyclic)
Delta-carene	۲/۶	۱۱/۲۰	Monoterpenoid
Camphore	۱۰/۲	۱۲/۶۸	Monoterpenoid
Pinanone	۱/۴	۱۳/۰۸	Oxygenated monoterpenoid
Borneol-d	۵/۳	۱۳/۴۰	Oxygenated monoterpenoid
Borneol-l	۵/۲	۱۳/۵۸	Oxygenated monoterpenoid
gamma.-Terpinene	۱/۹	۱۳/۷۲	Monoterpenoid
Dehydro-p-cymene	۱/۶	۱۴/۴۳	Monoterpenoid(also is an aromatic Hydrocarbon)
Camphene	۱/۳	۱۴/۵۲	Monoterpenoid
`Verbenone	۵/۳	۱۵/۲۰	Oxygenated monoterpenoid
alpha-Bornyl acetate	۲/۵	۱۷/۳۰	Oxygenated monoterpenoid(as acetate form)
trans-Caryophyllene	۴/۶	۲۱/۵۸	Sesqiterpenoid
beta-Selinene	۱/۰	۲۲/۵۲	Sesqiterpenoid

در مجموع اسانس حاوی ۲۰ ماده بود که Alfa pinene با میزان ۱۱/۱ درصد، Camphore به‌میزان ۱۰/۲ درصد و Limonene-d به‌میزان ۵/۹ درصد ۳ جزء عمده موجود در آن بود.

- نتایج شمارش میکروبی

میانگین نتایج شمارش لاکتوباسیل‌ها به‌روش کشت سطحی در محیط کشت MRS agar برحسب Log cfu/gr در نمودار(۱) نشان داده شده است.



نمودار (۱)- تغییرات میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس در نمونه‌های مورد آزمایش در طول دوره رسیدن

a، b و c: حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها در هر کدام از زمان‌های مورد آزمایش می‌باشد (p<۰/۰۵).

- نتایج بررسی میزان هسیتامین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

میزان هسیتامین نمونه‌های مورد آزمایش در هر کدام از گروه‌های مورد بررسی در زمان‌های مورد آزمایش توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا سنجش گردید که نتایج حاصل در جدول شماره (۲) نشان داده شده است.

جدول (۲)- میزان هیستامین بر حسب میلی‌گرم در هر کیلوگرم (ppm) در نمونه‌های مورد آزمایش در طول دوره رسیدن

غلظت اسانس	روزهای مورد مطالعه			
(ppm) در نمونه‌ها	۰	۳۰	۹۰	۱۵۰
۰	۱/۵	٤۰/۱۷	۱۲۰	۱۹۰
۱۲۵	۱/۳	۳۹/٦۳	۸۱/۱۱	۱۷۰
۲۵۰	۱/۳	۱۳/۷	۲۱	۵۱/۰٤

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی اجزاء اسانس رزمای با دستگاه GC-MS، ۲۳ جزء شناسایی شد که ترکیبات Alfa pinene با ۱۱/۱ درصد، مشتقات Borneol با ۱۰/۵ درصد، Camphore با ۱۰/۲ درصد، Limonene-d با ۵/۹ درصد و Verbenone با ۵/۳ درصد به‌ترتیب بیشترین ترکیبات را به خود اختصاص دادند. در مطالعه‌ای که جهت ارزیابی خاصیت ضد میکروبی اسانس رزماری صورت گرفته است، گزارش شده که Verbenone با ۱۱/٤۲ درصد، Alfa pinene با ۱۰/٤٤ درصد، Camphore با

۹/۳۱ درصد و Boeneol با ۸/۳۷ درصد به‌عنوان بیشترین اجزاء تشکیل دهنده اسانس رزماری در GC-MS، شناسایی شده‌اند که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد و نیز ۱٤ مورد از ۲۱ مورد از اجزاء شناسایی شده در اسانس رزماری در این دو مطالعه یکسان بود (jafarzadeh Khaledi *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای دیگر ترکیبات 1,8-cineole، Camphore و Borneol به‌ترتیب به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس رزماری گزارش شده است (Marcela *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای که بر روی اسانس رزماری کشت شده در الجزایر انجام شده، ۳٤ جز از آنالیز اسانس رزماری به‌دست آمد که Camphore با ۱٤/٦درصد، 1,8-cineole با ۱۲/۲ درصد، Borneol با ۱۰/٦ درصد و Camphene با ۷/۲ درصد به‌عنوان بیشترین ترکیبات موجود در آن گزارش شده است (Djeddi *et al.*, 2007). هم‌چنین می‌توان به نتایج حاصله از آنالیز اسانس رزماری کشت شده در شهر کرمان اشاره کرد که ٤۱ ترکیب در اسانس مورد آزمون شناسایی شد که به‌ترتیب Alpha pinene با ۱۵/۵۲درصد، Verbenone با ۱۱/۱۰ درصد، 1,8-cineole با ۱۰/٦۳و Borneol با ۷/۲۹ درصد بیشترین درصد از اجزا را به خود اختصاص دادند (Malakootian and Hemmati, 2013). در کل می‌توان گفت خواص ضد باکتریایی اسانس رزماری به‌خاطر داشتن ترکیبات ترپنی و حلقوی می‌باشد (Amin afshar *et al.*, 2016). کمیت، کیفیت و ترکیب شیمیائی اسانس‌های روغنی اخذ شده از یک نوع گیاه ادویه‌ای می‌تواند بر اساس منطقه جغرافیائی گیاه، شرایط آب و هوائی منطقه، ترکیب شیمیائی خاک، قسمتی از گیاه که برای استخراج اسانس مورد استفاده قرار گرفته، سن و فصل جمع‌آوری گیاه به‌طور اساسی متفاوت باشد. به‌علاوه مراحل خشک کردن و طول مدت انبارداری می‌تواند کمیت و کیفیت ترکیب اسانس را تغییر دهد (Bakkali *et al.*, 2008; Jafarzadeh Khaledi *et al.*, 2011).

لاکتو باسیل‌ها دارای قابلیت دکربوکسیلاسیون آمینواسیدها بوده و جزو گروه‌های باکتریایی مهم تولید کننده آمین‌های بیوژن از جمله هیستامین در انواع پنیر می‌باشند. *لاکتوباسیلوس بورویس* (*Lactobacillus brevis*) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*) قادر به دکربوکسیله کردن تیروزین (Tyrosine) بوده و برخی گونه‌ها نیز همانند *لاکتوباسیلوس کورواتوس* (*Lactobacillus curvatus*) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (*Lactobacillus helveticus*) که از انواع پنیر از جمله پنیر اسپانیایی جدا شده‌اند قادر به دکربوکسیله کردن هیستیدین (Histidine) و تولید هیستامین می‌باشند (Shanli and Shenel). همان‌طور که در نمودار شماره (۱) مشاهده می‌شود میانگین تعداد لاکتوباسیل‌ها در روزهای ۳۰، ۹۰ و ۱۵۰دوره رسیدن در نمونه‌های حاوی ppm ۱۲۵ و ۲۵۰ اسانس رزماری به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌های شاهد در روزهای مشابه بود ($P<۰/۰۵$). میزان باکتری تا روز ۳۰ در گروه شاهد افزایش را نشان داد و سپس تا روز ۱۵۰ رو به کاهش بود. کاهش میزان باکتری از روز ۳۰ به بعد می‌تواند به‌علت کاهش منابع لاکتوز، تولید اسیدهای آلی و متابولیت‌های مختلف توسط سایر میکروارگانیسم‌های فلور میکروبی در داخل لخته و پنیر تازه باشد، که این اتفاق معمولاً در مراحل اولیه و نیز در طول فرایند رسیدن پنیر رخ می‌دهد. در

سال ۲۰۱۱ اثر مهاری این اسانس بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ تجاری آماده (Jafarzadeh Khaledi *et al.*, 2011) و در سال ۱۹۹٤ اثر ضدمیکروبی آن بر روی لیستریا در محیط سوسیس گوشت خوک در طول نگهداری در یخچال نشان داده شده است (Pandit and Shelef, 1994). عمده مطالعات مربوط به اثر ضدباکتریائی اسانس رزماری در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت حداقل غلظت مهاری (MIC) اسانس رزماری بر روی باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *ژئوباسیلوس استئاروترموفیلوس* µg/ml ٦٤٠، باسیلوس سوبتیلیس µg/ml ۳۲۰ و سه سویه *انتروکوکوس فیسیوم* به‌ترتیب ۲٥٦۰، ۱۲۸۰ و µg/ml ۱۲۸۰ و نیز برای باکتری‌های گرم منفی سه سویه *اشریشیا کولای* و سه سویه *سالمونلا اینتریتیدیس* ۲٥٦۰µg/ml گزارش شده است (Ivanovic *et al.*, 2012). در سال ۲۰۱٦ حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس رزماری بر علیه *کلستریدیوم پرفرینجنس* ۱۰µg/ml گزارش شده است (Radaellia *et al.*, 2016). در مطالعه‌ای دیگر حداقل غلظت مهاری اسانس رزماری بر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای* و *باسیلوس سوبتیلیس* به‌ترتیب ۳/۷٥، ۷/٥ و µg/ml ۱/۸۸ و حداقل غلظت کشندگی آن برای هر سه باکتری ۷/٥ µg/ml گزارش شده است (Okoh *et al.*, 2010).

ویژگی ضدمیکروبی اسانس رزماری در مطالعات متعدد در محیط‌های کشت به اثبات رسیده است، اما در مواد غذایی مختلف با عنایت به تأثیر متقابل با عوامل درون‌گرا مثل ترکیب شیمیائی، میزان آب فعال، آنتی‌اکسیدان‌ها، نگهدارنده‌ها، pH، نمک و دیگر افزودنی‌ها و نیز عوامل برونگرا مثل دمای شرایط تولید، رسیدن و انبارمانی و نوع بسته‌بندی نیاز به مطالعات بیشتر و اختصاصی برای هر نوع ماده غذائی می‌باشد.

همان‌طوری که در جدول (۲) مشاهده می‌شود در طول دوره رسیدن میزان هیستامین در نمونه‌های حاوی ۱۲٥ و ppm ۲٥۰ از اسانس رزماری کمتر از نمونه‌های شاهد بوده و در انتهای دوره رسیدن میزان هیستامین در نمونه‌های شاهد، حاوی ۱۲٥ و ppm ۲٥۰ اسانس رزماری به‌ترتیب برابر ۱۹۰، ۱۷۰ و ppm ٥۱/۰٤ بود. در مطالعه‌ای که به‌منظور مقایسه میزان هیستامین و تیرامین در پنیر پاستوریزه لیقوان با پنیر یواف آذربایجان‌شرقی در طول ٦۰ روزه دوره رسیدن انجام گرفته گزارش شده است که میزان هیستامین در پنیر پاستوریزه لیقوان در طول دوره رسیدن از ۲۲/۳ به ppm ٦۰/۸ و در مورد پنیر یواف به‌طور معنی‌دار کمتر از آن یعنی از ۷/۱ به ppm ۳۰/۳ افزایش یافت (Mohtadinia and Hagigian, 2014). که در مقاسیه با مقادیر حاصل از مطالعه حاضر به‌خصوص در نمونه فاقد اسانس بسیار پایین‌تر است و علت آن را می‌توان به پاستوریزاسیون شیر و از بین رفتن قسمت عمده‌ای از باکتری‌های مولد آمین های بیوژن موجود در شیر خام و نیز طول دوره رسیدن کوتاه ٦۰ روزه مطالعه ذکر شده در مقایسه با طول دوره ۱٥۰رسیدن روزه مطالعه حاضر ربط داد. بر اساس داده‌های نشان داده شده در جدول (۲) میزان هیستامین در نمونه‌های حاوی ppm ۱۲٥ از اسانس رزماری در مطالعه حاضر در روز های ۳۰ و ۹۰ دوره رسیدن به‌ترتیب ۳۹/٦۳ و mg/kg ۸۱/۱۱ بوده که اگر روند افزایش آن در این فاصله زمانی حدوداً ثابت فرض

شود مقدار آن در روز ٦٠ دوره رسیدن حدود ٦٠ ppm خواهد بود که برابر با میزان هیستامین در پنیر پاستوریزه لیقوان در روز ٦٠ دوره رسیدن می‌باشد در این صورت می‌توان گفت که میزان تأثیر اضافه کردن ١٢٥ ppm از اسانس رزماری به شیر برابر با میزان تأثیر پاستوریزه کردن شیر خام در کاهش میزان هیستامن در پنیر حاصله خواهد بود و میزان تأثیر ٢٥٠ ppm اسانس رزماری به مراتب بیشتر از تأثیر پاستوریزاسیون شیر خام پیش‌بینی می‌شود. در مطالعه دیگری که تأثیر افزودن غلظت‌های ٠/٠٥، ٠/١، ٠/٢ و ٠/٤ درصد (حجم/حجم) اسانس آویشن شیرازی در شیر بر روی میزان آمین‌های بیوژن و بار میکروبی باکتری‌های دارای خاصیت دکربوکسیله کردن در پنیر گودای مربوطه در طول ٩٠ روز دوره رسیدن انجام گرفته، تأثیر مهاری اسانس آویشن شبرازی بر روی باکتری‌ها و کاهش میزان هیسامین مورد تأیید قرار گرفته است. این نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای ٠/٠٥ درصد اسانس در روز ٩٠ دوره رسیدن به‌طور معنی‌دار میزان هیستامین را کاهش می‌دهد. اثرات مشابه ناشی از اسانس رزماری در تحقیق حاضر روی میزان هیستامین در پنیر سنتی لیقون و آویشن شیرازی در پنیر گودا می‌تواند ناشی از وجود ترکیبات شیمیائی مشابه دارای خاصیت ضد میکروبی در این دو گیاه که هر دو از تیره نعنائیان هستند، باشد (Eshaghi Goji *et al.*, 2014).

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر در مجموع می‌تواند گفت که افزودن غلظت‌های ١٢٥ و ٢٥٠ ppm از اسانس رزماری به شیر جهت تولید پنیر لیقوان که به‌عنوان یک پنیر سفید سنتی نگهداری شده در آب نمک می‌باشد می‌تواند باعث کاهش تعداد لاکتو باسیل‌ها به‌عنوان گروهی از باکتری‌های دکربوکسیله کننده و نیز باعث کاهش هیستامین در طول دوره رسیدن شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Adel Ibrahim, E.M. and Amer, A.A.M. (2010). Comparison of Biogenic Amines Levels in Different Processed Cheese Vatieties with Regulatory Specifications. World Journal of Dairy and Food Sciences, 5(2): 127-133.
- Ali Akbarlu, J.J., Alizadeh. M., Razavi-Rohani, S.M. and Agh, N. (2011). Biogenic amines in Iranian white brine cheese: modelling and optimisation of processing factors. International Journal of Dairy Technology, 64(3): 417-424. [In Persian]
- Amin afshar, M.H., Mahasti, P. and Emamjomeh, Z. (2016). Identification of forming compands, minimum inhibitory concentration of Rosemarinus officinalis EO cultivated in Shiraz. Journal of Medicinal Plants, 4(60): 112-122. [In Persian]
- Andiç, S., Gençcelep, H., Tunçtürk, Y. and Köse, S. (2010). The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of Motal cheese. Journal of Dairy Science, 93: 849-859.
- Ayres, J.C., Mundt, J.O. and Sandine, W.E. (1980). Microbiology of Foods. W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA, pp. 543.

- Bagamboula, C., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. Food Microbiology, 21:33–42.
- Bakkali F, Averbeck S, (2008). Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review. Food and Chemical Toxicology, 46:446–475.
- Beigi, O. (2000). Approches in producing and processing of medicinal plants. (2nd edition), Tarrahane basher publication, Vol 1, pp.246-255. [in Persian]
- Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. and Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11(1): 73-84.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. International Journal of Food Microbiology, 94:223-253.
- Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I. and Skaltsa, H. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosmarinus officinalis from Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 43(4): 487-490.
- Eshaghi Gorji, M., Noori, N., Nabizadeh, R., Khaniki, G., Rastkari, N. and Alimohammadi, M. (2014). The evaluation of Zataria Boiss Essential oil profile in Gouda cheese. Letters in Applies Microbiology, 59: 621–630.
- European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 10, 2393.
- Fernandez, M., Linares, D.M., del Rıo, B., Ladero, V., Alvarez, M.A. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. Journal of Dairy Research, 74:276 – 282.
- Ferreira, A. and Viljoen, B. (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. Journal of International Food Microbiology, 86:131-140.
- Forouhandeh, H., Zununi Vahed, S., Hejazi, M.S., Naheal, M.R and Akbari Dibavar., M. (2010). Isolation and Phenotypic Characterization of Lactobacillus Species from Various Dairy Products. Current Research in Bacteriology, 3 (2): 84-88.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Alipoor Astaneh, S.H., Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chemistry, 102: 898-904. [In Persian]
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Science Technology, 5: 42-48.
- Ivanovic, J., Misic, D., Zizovic, I. and Ristic, M. (2012). In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. Food Control, 25: 110-116.
- Jafarzadeh Khaledi, K., Aghazadeh Meshgi, M., Sharifan, A. and Larijani, K. (2011). Investigation of effect of the Rosemary essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* in commercial instant soup, Iranian Comparative Pathobiologhy Journal, 7(2): 255-264. [In Persian]
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., Zu, Y.G. and Liu XL. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental Toxicology Pharmacology, 32(1):63-8.
- Joosten, H.M.L.J. (1988). The biogenic amines contents of Dutch cheese and their toxicological significance. Netherlands Milk and Dairy Journal, 42: 25-42.
- Lemonica, I. P., Demasceno, D. C. and Di-Stasi, L. C. (1996). Study of the embryonic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). Brazilian Journal Medical Biological Research, 29(2): 223-227.
- Mahmoudi, R. (2014). Effects of ascalonicum essential oil on histamine formation in feta cheese. Academia Journal of Food Research, 2(1): 1-6. [In Persian]

- Malakootian, M. and Hemmati, B. (2013). Survey of chemical composition and antibacterial activity of Rosemarinus officinalis EO on Ecoli and determining its kinetic. Journal of Toloo-e-behdasht, 12(1): 1-13. [In Persian]
- Mangena, T.O. and Muyima, N.Y.O. (1999). Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of Artemisia afra, Pteronia incana and Rosmarinus on selected bacteria and yeast strains. Letters In Applied Microbiology, 28(4): 291–296.
- Marcela, P.B., Luciana, F.C., Daiane, C.S. and Jonas, C. (2016). L-(+)-Lactic acid production by Lactobacillus rhamnosus B103 from dairy industry waste. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 640-646.
- Mirzaei, h. (2011) Microbiological changes in lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. African Journal of Microbiology Research. 5:1609-1614.
- Mohtadinia, J., Khadem Haghighian, H. (2014). Determination of Histamine and Tyramine in Lyqvan Cheese and Tabriz Ultra Filtered in Different Ripening Periods by High Performance Liquid Chromatography. Alborz University Medical Journal, 3(2): 96-102. [In Persian]
- Moret, S. and Conte L.S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. Journal of Chromatography, 729:363–369.
- Nei, D., Nakamura, N., Ishihara, K., Kimura, M., Satomi, M. (2017). A rapid screening of histamine concentration in fish fillet by direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS). Food Control, 75: 181-186.
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.P., Afolayan A.J., (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry, 120:308–312.
- Pandit, V.A. and Shelef, L.A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Food Microbiology, 11: 57–63.
- Petrovic, J., Babi_c, J., Jaksic, S., Kartalovic, B., Ljubojevic, D., & Cirkovic, M. (2015). Fish product-borne histamine intoxication outbreak and survey of imported fish and fish products in Serbia. Journal of Food Protection, 79:90-94.
- Pircher A., Bauer F., Paulsen P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. European Food Research and Technology**,** 226 (1): 225-231.
- Radaellia, M., Da Silvaa, B.P., Weidlicha, L., Hoehneb, L., Flachc, A., Mendonc¸ L.A., Da Costac, A., Ethurb, E.M. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against Clostridium perfringens. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 424–430.
- Razavi Rouhani, S.M., Hasan Zadeh Azar, H. and Aliakbarlu, Javad. (2013). Determination of histamine of Koupe cheese, in west azarbaijan, Journal of Food Hygiene, 3(1):1-9. [In Persian]
- Razavi, N., Molavi Choobini, Z., Salehian-Dehkordi, M., Saleh Riyahi, S., Salehian-Dehkordi, M. and Molavi Choobini, S. (2016). Overview of the antibacterial properties of essential oils and extracts of medicinal plants in Iran. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 17: 41-52. [In Persian]
- Roig-Sagues, A.X., Molina, A.P. and Hernandez-Herrero, M. (2002). Histamine and tyramine forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. European Food Research and Technology, 215:96–100.
- Semeniuc, C.A, Pop, C.R., and Rotar, A.M. 2017. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Journal of Food and Drug Analysis, 2 5:403 -408.
- Shalaby, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safty and human health. International food research, 29: 675-690.

- Shanli, T. and Shenel, E. (2015). Formation of biogenic amines in cheese processing and impact on active components in food, 27: 223-230.
- Sienkiewicz, M., Lysakowska M., Pastuszka M., Bienias W., Kowalczyk E. (2013). The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. Molecules, 18: 9334-9351.
- Sirocchi, V., Giovanni, C., Cecchini, C., Magdalena Coman, M., Cresci, A., Maggi, F., Papa, F., Ricciutelli, M., Vittori, S. and Sagratini, G. (2013). Biogenic amines as freshness index of meat wrapped in a new active packaging system formulated with essential oils of Rosmarinus officinalis. International Journal of Food Science and Noutrition, 64(8): 921-928.
- Smith-palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology. 18: 463-470.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W. and Taylor, S.L. (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. Journal of Food Protection, 54, 460–470.
- Tahmasebi, S., Majd, A., Mehrafarin, A. and Jonoubi, P. (2014). Qualitative and quantitative assessment of the EO of Origanum Vulgare and Origanum majorna in Iran. Journal of Medicinal Plants, 2(50): 163-171. [In Persian]
- Tassou, C., koutsoumanis, K., Nychas, G.J.E. (2000). Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33: 273- 280.
- Toda, M., Yamamoto, M., Uneyama, C., & Morikawa, K. (2009). Histamine food poisonings in Japan and other countries. Bulletin of National Institute of Health Sciences, 127, 31-38.
- Taylor, S.L. (1985). Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods, Report VPH/FOS/85.1. WHO press, pp: 1-48.
- Tornambe, G., Cornu, A., Verdier, I., Pardel, P., Kodjoyan, N. and Figueredo, G. (2007). Addition of Pasture plant essential oil in milk, influence on chemical and sensory properties of milk and cheese. Journal of Dairy Science, 91: 58-69.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. (1994). Milk and milk products, Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman and Hall, UK, pp. 78-83, 340-360.
- Wang, W., Wu, N., Zu, Y.G. and Fu, Y.J. (2008). Antioxidative activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to its main components. Food Chemistry, 108(3): 1019-1022.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. and Boussaid, M. (2010). Essential oils comparison in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology, 48: 3144-52.
- Zargari, A. (1990). Medicinal plants. (1st edition), university of Tehran publication, Vol 4, pp.71-72. [In Persian]

Effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on lactobacillus count and amount of histamine during the ripening period in traditional Lighvan cheese

Shishegar, R.[1], Mirzaei, H.[2*], Mohammadi, K.[3], Karim, G.[4], Razavilar, V.[5]

1. Ph.D. Graduate in Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Assistance Professor, Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
4. Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
5. Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

[*]Corresponding Author: hmirzaei@iaut.ac.ir
(Received: 2018/6/27 Accepted: 2018/8/4)

Abstract

Histamine poisoning is one of the main concerns in traditional cheeses which is mainly produced by decarboxylating bacterial strains during cheese ripening period. The aim of this study was to determine the effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil (EO) on lactobacillus count and histamine amount in Lighvan cheese using HPLC method. Moreover, the chemical composition of EO was assessed using GC/MS. Cheese samples containing 0, 125 and 250 ppm of Rosemary EO were prepared. Afterward, lactobacillus count and histamine content of the samples were measured on days 0, 30, 90 and 150 of the ripening period. Alfa pinene (11.1%), Camphor (10.2%) and Limonene (5.9%) were detected as three main components of the rosemary EO. During the ripening period lactobacillus count in all EO-treated groups (125 and 250 ppm) was found significantly ($p<0.05$) lower than the control group. Moreover, histamine contents in the control group, and 125 and 200 ppm containing rosemary EO cheese samples were determined as 190, 170 and 51.04 mg/kg, respectively. It could be concluded that the addition of 125 and 250 ppm of rosemary EO could act as a natural preservative in traditional Lighvan cheese.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Rosemary essence, Histamine, Lactobacilli, Traditional cheese, Ripening period