تاثیراسانس نعناع بر میزان بقاء *اشریشیاکولای O157:H7* در پنیر سنتی لیقوان در طول دوره رسیدن

محمد بافنده زنده[1]، ودود رضویلر[1*]، حمید میرزایی[2]، خسرو محمدی[2]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *V.razavi@ut.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

چکیده

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه نعناع بر میزان بقاء *اشریشیاکولای O157:H7* در پنیر سنتی لیقوان می‌باشد. اسانس نعناع با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد و آنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. جهت تعیین حداکثر مقدار استفاده از اسانس ارزیابی حسی انجام گرفت. نمونه‌های پنیر با کمک تولید کنندگان محلی مستقر در روستای لیقوان در سه تکرار، حاوی غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm از اسانس نعناع و با دزهای 10^3 و 10^5 CFU/mL از باکتری *اشریشیاکولای O157:H7* تهیه شد و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دوره رسیدن، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از اسانس نعناع با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ppm در مقایسه با گروه کنترل در نودمین روز نگهداری، میانگین لگاریتم تعداد *اشریشیا کولای O157:H7* را به طور معنی داری کاهش داده است ($P<0/05$). لذا در مجموع می توان گفت که اسانس نعناع، می تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در پنیر سنتی لیقوان استفاده شود ولی حتما باید در غلظت‌هایی استفاده شود که فاقد اثرات سوء بر عطر و طعم ماده غذایی باشند.

کلید واژه ها: اسانس نعناع، *اشریشیا کولای O157:H7* و پنیر سنتی لیقوان.

مقدمه

امروزه بیماری‌های با منشأ مواد غذایی در تمام دنیا حتی در کشورهای پیشرفته ای مثل آمریکا خسارات جبران ناپذیری در زمینه های مختلف اقتصادی، اجتماعی و سلامت به بار می‌آورند. غذاهای فاسد شده، علاوه بر آسیب به سلامت مصرف کننده، به تولید کننده نیز از لحاظ اقتصادی ضرر می‌رساند. طبق گزارش مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها ، در آمریکا عفونت‌های غذایی مثل *سالمونلا، اشریشیا کولای O157، کمپیلوباکتر، لیستریا، شیگلا، ویبریو و یرسینیا* موجب بیماری حدود ۱۵درصد از مردم شده است که جمعیتی بالغ بر ۴۸ میلیون نفر را شامل می‌شود (Crim et al., 2014). *اشریشیاکولای O157:H7* به عنوان یکی از نگرانی‌های عمومی، در سطح جهان مطرح است و در برخی مواد غذایی از جمله گوشت و فرآورده‌های گوشتی، شیر، سبزیجات، سالاد و آب میوه‌ها یافت می‌شود (Sheeladevi and Ramanathan, 2012). بیماری‌های ناشی از این باکتری به صورت انفرادی و اپیدمی در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (Selim, 2011). سندروم همولیتیک اورمیک و کولیت خونریزی دهنده از طریق تولید توکسین شبه *شیگلا*(مخصوصا توکسین STX) توسط این سویه ایجاد می‌شود. سندروم همولیتیک اورمیک باعث کم خونی همولیتیک، ترومبوسیتوپنی و نارسایی حاد کلیه می‌گردد و کولیت هموراژیک موجب اسهال خونی، کرامپ‌های شکمی شدید، تهوع، استفراغ و به ندرت تب می‌شود (Jay et al., 2005).

پنیر لیقوان به عنوان یک پنیر سفید رسیده در آب نمک بوده و یکی از پرمصرفترین پنیرهای سنتی ایران می‌باشد که در روستای لیقوان واقع در جنوب شرقی تبریز در شمال غرب ایران تولید می‌گردد. درتولید این

پنیر از شیر خام گوسفند و معمولاً همراه با حدود ۳۰-۲۰ درصد شیر بز و بدون مایه کشت استفاده می‌شود. اکثر تولید کنندگان پنیرهای سنتی معتقد هستند که استفاده از شیر خام باعث ایجاد عطر و طعم مطبوع در پنیر می‌شود که این امر در واقع به دلیل فعالیت آنزیم-های پروتئولیتیک و لیپولیتیک موجود در شیر و تولید شده توسط میکروفلور شیر خام می‌باشد (میرزائی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰). مواقعی که کیفیت بهداشتی شیرخام مناسب نباشد، خطر انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را در پی دارد، ضمناً بسیاری از مراحل تولید این پنیر بصورت دستی و با استفاده از تجهیزات سنتی انجام می‌پذیرد، لذا تمام این موارد خطر بروز آلودگی این محصول با میکروب‌های مولد فساد، بخصوص بیماریزا از قبیل *سالمونلا*، *لیستریا مونوسایتوجنز*، *اشریشیا کولای* تولید کننده وروسایتوتوکسین و *استافیلوکوکوس آرئوس* از طریق حیوان، محیط و بخصوص کارگران ناقل افزایش می-دهند و مجموعه این عوامل بهداشت و مدت زمان ماندگاری این محصول را کاهش می‌دهند (پورعلی بهزادو میرزایی، ۱۳۹۰؛ Mirzaei et al., 2008).

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی هستند. کاربردهای فراوان آن‌ها به منظور کنترل رشد باکتری‌های بیماری زا با منشاء غذایی و یا باکتری‌های عامل فساد، موجب به کارگیری آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های غذایی شده است (صادقی و همکاران، ۱۳۸۹). گیاه نعناع دارای ۴۰۰۰ گونه است که در ۲۰۰ جنس جای داده شده است. پراکندگی آن به صورتی است که در غالب نواحی کره زمین یافت می‌شود اما بیشترین انتشار آن در منطقه مدیترانه است (زرگری، ۱۳۷۹). در بین جنس-های مختلف این گیاه، *منتا* (*Mentha*) از جنس‌های مهم تیره نعناع است. گونه *منتا اسپیکاتا* از لحاظ ترکیب اسانس تفاوت هایی با دیگر گونه های نعناع دارد که اصلی ترین این تفاوت ها عدم وجود منتول و تشکیل شدن ترکیبی به نام کارون (Carvon) که درصد بالایی از اسانس را شامل می‌شود (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Foda et al., 2009). هدف مطالعه حاضر تعیین اثر ضدمیکروبی غلظت های مختلف اسانس گیاه نعناع بر میزان بقاء *اشریشیاکولای O157:H7* در پنیر سنتی لیقوان در طول دوره رسیدن بود.

روش کار

تهیه گیاهان و اسانس‌ها

گیاه نعناع به صورت تر از سبزی فروشی‌های محلی موجود در شهر تبریز تهیه شد و ابتدا از نظر مورفولوژیک نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی، توسط گیاه شناس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تأیید گردید. اسانس روغنی گیاه نعناع، بعد از خشک شدن نمونه گیاهی در سایه، به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر جداسازی شد. در هر بار اسانس‌گیری، چهل گرم از گیاه به صورت مجزا و نیم‌کوب شده در بالون یک لیتری دستگاه کلونجر ریخته شد و مقداری آب که ۴ تا ۶ برابر وزن گیاه بود، برای نرم شدن بافت‌های گیاه به آن اضافه گردید. اسانس موجود در آن بعد از تقطیر به مدت ۳ ساعت جمع‌آوری گردید، سپس این مخلوط با سولفات سدیم بدون آب، آب گیری و تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شد. ترکیب شیمیائی اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS شناسائی شد. جهت تعیین مقدار یا غلظت اسانس نعناع برای افزودن به نمونه‌های شیر برای تولید پنیر، ابتدا پنیر لیقوان آماده مصرف از فروشنده‌های محلی تهیه و به ۵ قسمت مساوی تقسیم و به ترتیب به آنها مقدار صفر،۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و۳۰۰ ppm از اسانس نعناع اضافه و کاملا همگن شد. سپس ارزیابی حسی توسط یک پانل ۱۵ نفره از دانشجویان و کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام

پذیرفت. اعضاء پانل معیار خود از ارزیابی حسی پنیر لیقوان حاوی اسانس را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰). براساس نتایج حاصله از این مرحله غلظت اسانس نعناع با بالاترین نمره دریافتی (۲۰۰ppm) و نصف آن (۱۰۰ppm) جهت استفاده در تولید نمونه‌های مورد نیاز در این مطالعه انتخاب شد.

باکتری مورد مطالعه

در این مطالعه باکتری *اشریشیا کولای O157:H7* (ATCC 35218) از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. برای انجام مطالعه از تعداد 10^3 و10^5 CFU/mL استفاده شد، به این منظور باکتری در دو نوبت متوالی به فواصل ۲۰ و ۲۴ ساعت در محیط کشت آبگوشت مغذی کشت و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. به منظور دستیابی به مقادیر مورد نظر جهت تلقیح از استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. از کشت ۲۰ ساعته به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تعداد باکتری در هر میلی لیتر محاسبه گردید.

جست و جوی *اشریشیا کولای O157:H7* در شیرهای خام مصرفی

برای اطمینان از عدم وجود *اشریشیا کولای* در شیرهای خام مصرفی،۱۰ میلی لیتر از نمونه شیر به ۹۰ میلی لیتر محیط آبگوشت *اشریشیا کولای* (*E.coli* broth) حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر نووبیوسین تلقیح گردید ومدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شده و سپس به ازای هر ارلن ۲ پلیت حاوی محیط سوربیتول مکانکی آگار (Sorbitol-MacConkey Agar)حاوی ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفیکسیم و ۲/۵ میلی گرم در لیتر تلوریت پتاسیم در نظر گرفته شد و با آنس استریل یک حلقه از محتویات ارلن روی پلیت به صورت خطی کشت و پلیت‌های حاصله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید و بعد از ۲۴ ساعت پلیت‌ها از نظر وجود پرگنه‌های بیرنگ و پایه رنگ محیط (سوربیتول منفی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس در هر پلیت تا ۵ عدد از پرگنه های سوربیتول منفی انتخاب و هر کدام بصورت جداگانه در محیط نوترینت آگار بصورت خطی کشت و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید، تا پرگنه های مجزا حاصل گردد. در ادامه به منظور ارزیابی تخمیر لاکتوز و تولید اندول پرگنه‌های حاصله به ترتیب بر روی محیط ویولت رد بایل آگارو در محیط تریپتون/تریپتوفان کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری گردید (Downes and Itō,2001).

تولید پنیر سنتی لیقوان

برای تولید پنیر از شیر تازه و خام میش از منطقه لیقوان استفاده شد. شیر از نظر وجود بقایای آنتی بیوتیکی با آزمایش بتا استار تست شد. هم چنین جست و جوی *اشرشیاکولای O157:H7* در شیر با استفاده از کشت سطحی صورت پذیرفت. برای تولید پنیر ابتدا ضمن مشاهده مراحل تولید در کارگاه‌های تولید پنیر در منطقه لیقوان و صحبت با تولید کنندگان خبره و با استفاده از راهنمایی و کمک تولید گنندگان محلی روستای لیقوان، پنیر کاملا به روش سنتی تولید شد. به این ترتیب که ابتدا دمای شیر خام در حدود ۲۳ درجه سانتیگراد تنظیم شد و باکتری در دوزهای مورد نظر به شیر فاقد باکتری *اشرشیاکولای O157:H7* تلقیح شد. سپس رنت به میزان ۰/۰۰۱ درصد و همزمان اسانس نعناع در غلظت های صفر، ۱۰۰ و

۲۰۰ppm به نمونه‌ی شیر اضافه و بلافاصله به‌صورت کامل با همزن دستی به هم زده می‌شد تا در حد ممکن اسانس در لخته حاصله که معمولا در کمتر از ۳۰ دقیق شروع به تشکیل می‌شود یکنواخت باشد. در طول مدت حدود دو ساعت تشکیل لخته کامل می‌شد. لخته‌ها در پارچه‌های ۸۰×۸۰cm به مدت ۱/۵-۱ ساعت نگهداری شد. سپس لبه‌های نازک لخته برش داده شده و به وسط پارچه انتقال داده شد و دوباره پارچه‌ها به مدت ۱/۵-۱ ساعت بسته شدند. سپس وزنه‌هایی به وزن ۱۲-۶ کیلوگرم بر روی پارچه‌ها به مدت ۱/۵-۱ ساعت قرار داده شد. لخته‌ها در ابعاد حداقل ۱۰×۱۰cm برش داده شد. قطعات پنیر در آب نمک ۲۴-۱۸ درصد به مدت ۶-۴ ساعت قرار داده شد. سپس ۶ بار بر روی قطعات پنیر دانه‌های نمک خشک در طول ۶-۳ روز پاشیده شد. در نهایت پنیرها در بسته‌های ۵۰۰ گرمی قرار داده شده و با آب نمک ۱۱درصد پر شدند و در روز های صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ مورد آزمایش قرار گرفته و سه بار تکرار آزمایش صورت گرفت.

شمارش میکروبی و تأیید *اشرشیاکولای O157:H7*

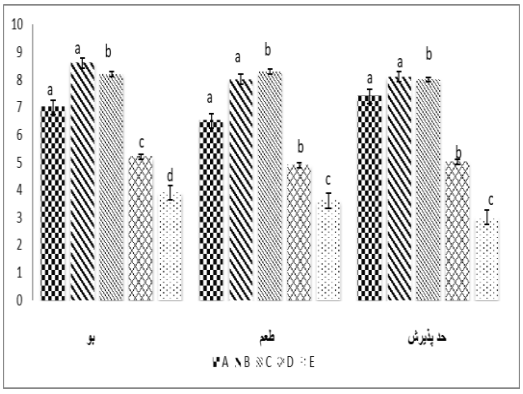
به منظور شمارش *اشریشیا کولای O157:H7* از روش کشت سطحی و با انتقال ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های تهیه شده به پلیت‌های دوگانه حاوی محیط کشت سفکسیم تلوریت- سوربیتول مک کانکی آگار (CT-SMAC) واجد ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفکسیم و ۲/۵ میلی گرم در لیتر پتاسیم تلوریت کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی های سوربیتول منفی (بی رنگ) شمارش گردید. تعداد ۱۰-۵ کلنی برای تأیید با تست های بیوشیمیایی سیمون سیترات آگار، MR-VP broth، SIM agar، TSI agar انتخاب شد (Downes and Itō,2001).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا با استفاده از آزمون آماری کولموگروف – اسمیرنوف از نرمال بودن توزیع داده‌ها اطمینان حاصل شد. سپس برای بررسی تاثیر تیمارها در هر کدام از مقاطع زمانی مورد نظر از طرح کاملا تصادفی و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح α =۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی اولیه حسی توسط تست پانل نشان داد که اسانس نعناع با غلظت ۲۰۰ppm از لحاظ طعم دارای بیشترین قابلیت تحمل برای ارزیاب ها می باشند. لذا از غلظت های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ppm در نمونه های پنیر سنتی لیقوان استفاده شد (نمودار۱).



نمودار۱-میانگین (± انحراف معیار) نمره‌های داده شده به ویژگی‌های حسی نمونه‌های پنیر با غلظت‌های مختلف اسانس نعناع A: نمونه کنترل، B: نمونه حاوی ۵۰ppm، C: نمونه حاوی۱۰۰ppm، D: نمونه حاوی۲۰۰ppm، E: نمونه حاوی۳۰۰ppm

a، b، c و d: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر کدام از ویژگی‌های حسی معنی‌دار می‌باشد ($P\leq0/05$).

مطابق جدول یک، نتایج حاصل از آنالیز اسانس نعناع نشان می دهد که کارون، لیمونن و β بوربونن به ترتیب

با ۷۱/۴۱، ۱۳/۲ و ۱/۷۳ درصد بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس را به خود اختصاص داده اند.

جدول ۱- نتایج آنالیز اسانس نعناع مورد مطالعه با استفاده از GC/ MS

درصد	اندیس بازداری	نام ترکیب (نعناع)
۱۳/۲	۶۱۰	Limonene
۱/۷۳	۹۹۶	β- bourbonene
۱/۳۹	۷۳۶	Cis-Dihydrocarveol
۰/۲۳	۵۶۶	ɤterpinene
۰/۸۶	۷۱۵	Terpene -4-ol
۱/۴۹	۱۰۵۶	Trans-Caryophyllene
۱/۰۸	۷۰۹	Menthone
۷۱/۴۱	۷۸۹	Carvone
۰/۹۶	۷۱۱	Menthol
۰/۴۹	۹۰۱	Dihydrocarvylaccetate
۰/۳۱	۷۷۰	Trans-caroveol
۰/۱۹	۱۰۶۲	Alpha-amorphene
۰/۴۳	۷۵۱	Dihydrocarvone
۰/۲۳	۱۰۵۱	Gamma-amorphene
۰/۲۱	۷۳۳	dihydrocarveol
۹۴/۲۱		Total

نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر متقابل طول دوره رسیدن و غلظت‌های اسانس بر روی تعداد باکتری *اشریشیاکولای O157:H7* معنی دار می‌باشد ($P<0.05$). در جدول شماره دو اثر ضد میکروبی اسانس نعناع با غلظت های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ppm بر کاهش میانگین لگاریتم تعداد باکتری *اشریشیا کولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^3 CFU/mL در نمونه‌های پنیر سنتی لیقوان طی فرآیند رسیدن تا روز ۹۰ را نشان داده شده است. میانگین لگاریتم تعداد *اشریشیا-کولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^3 CFU/mL در پنیرهای سنتی لیقوان توسط غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ppm اسانس نعناع در مقایسه با نمونه‌های فاقد اسانس در نودمین روز نگهداری به طور معناداری کاهش یافته است ($P<0/05$). همچنین اثر غلظت ۲۰۰ppm اسانس نعناع در مقایسه با اثر غلظت ۱۰۰ppm نعناع در کاهش لگاریتم تعداد *اشریشیا-کولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^3 CFU/mL در پنیرهای سنتی لیقوان معنی دار می باشد ($P<0/05$).

جدول شماره سه اثر ضد میکروبی اسانس نعناع با غلظت های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ppm بر کاهش میانگین لگاریتم تعداد باکتری *اشریشیاکولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^5 CFU/mL در نمونه‌های پنیر سنتی لیقوان طی فرآیند رسیدن تا روز ۹۰ را نشان می دهد. میانگین لگاریتم تعداد *اشریشیاکولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^5 CFU/mL در پنیرهای سنتی لیقوان توسط غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ppm اسانس نعناع در مقایسه با نمونه‌های فاقد اسانس در نودمین روز نگهداری به طور معناداری کاهش یافته است ($P<0/05$).

جدول۲- مقایسه میانگین(Mean±SD) لگاریتم تعداد *اشریشیا کولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^3 CFU/mL در پنیرهای سنتی لیقوان حاوی مقادیر مختلف اسانس نعناع در زمان‌های مختلف دوره رسیدن

غلظت اسانس	تعداد تکرار	دوره رسیدن (روز)			
		صفر	۳۰	۶۰	۹۰
صفر	۳	۵/۶۷±۰/۰۳^a	۵/۲۵±۰/۰۵^a	۴/۴۴±۰/۲۰^a	۲/۸۸±۰/۰۱^a
۱۰۰	۳	۵/۵۴±۰/۰۶^a	۵/۱۷±۰/۰۵^a	۴/۳۳±۰/۰۷^a	۲/۰۴±۰/۰۴^b
۲۰۰	۳	۵/۵۲±۰/۰۴^a	۵/۱۰±۰/۰۷^b	۴/۲۲±۰/۱۳^a	۱/۵۱±۰/۰۷^c

a, b, c: در هر ستون میانگین هایی که فاقد حروف مشترک می باشند، تفاوت معنی داری با هم دارند ($P<0/05$).

جدول۳- مقایسه میانگین(Mean±SD) لگاریتم تعداد *اشریشیا کولای O157:H7* با دز تلقیحی 10^5 CFU/mL در پنیرهای سنتی لیقوان حاوی مقادیر مختلف اسانس نعناع در زمان های مختلف دوره رسیدن

غلظت اسانس	تعداد تکرار	دوره رسیدن (روز)			
		صفر	۳۰	۶۰	۹۰
صفر	۳	۶/۶۹±۰/۰۱ ^{a}	۶/۳۷±۰/۳۰ ^{a}	۵/۲۳±۰/۳۰ ^{a}	۴/۴۶±۰/۴۱ ^{a}
۱۰۰	۳	۶/۷۴±۰/۰۴ ^{a}	۶/۲۰±۰/۰۵ ^{a}	۴/۷۴±۰/۱۲ ^{b}	۰ ^{b}
۲۰۰	۳	۶/۷۰±۰/۰۳ ^{a}	۶/۱۰±۰/۰۲ ^{a}	۴/۳۷±۰/۳۵ ^{b}	۰ ^{b}

a, b : در هر ستون میانگین هایی که فاقد حروف مشترک می باشند، تفاوت معنی داری با هم دارند($P<0/05$).

بحث

مطابق جدول یک، نتایج حاصل از آنالیز اسانس نعناع نشان می دهد که کارون، لیمونن و β بوربونن به ترتیب با ۷۱/۴۱، ۱۳/۲ و ۱/۷۳ درصد بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس را به خود اختصاص داده اند. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع به بیش از ۲۰ نوع می رسد که مهمترین آن‌ها منتول (Menthol) می‌باشد. بیشترین مقدار منتول در اسانس استخراج شده از برگ‌های جوان وجود دارد. اسانس گل‌ها مقدار کمی منتول دارد و مهمترین ترکیب آن را منتوفوران (Menthofuran) تشکیل می‌دهد. از مواد دیگر اسانس نعناع می توان از منتون (Menthone)، پیپریتون(Pepperitone)، پولگون(Pulegone) (بیشتر در برگ های جوان) ، لیمونن، پینن (Pinene)، سابینن (Sabinene)، کارون، سینئول(Cineol) و منتیل استات (Menthyl acetate) نام برد. البته در گونه های مختلف ترکیب اجزاء اسانس متفاوت است و روش خشک کردن نیز بر درصد اجزاء اسانس موثر است (امید بیگی، ۱۳۹۲ ؛ Asekkun et al., 2007).

با توجه به نگرانی مصرف‌کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی و مضرات آن‌ها، در سال‌های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی توجه ویژه‌ای پیدا نموده‌اند. لذا بررسی‌های مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن‌های مختلف غذایی در محیط کشت و غذا انجام گرفته است (عباسی‌فر، ۱۳۸۶). نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه نعناع، تعداد باکتری-های *اشریشیا کولای O157:H7* را در گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های شاهد به طور معنی داری کاهش داده است($P<0/05$). تاثیر عصاره گیاهان بر *اشریشیا کولای* را به افزایش ویژگی آب گریزی ترکیبات سطحی سلول‌های باکتری نسبت می دهند زیرا به این ترتیب از اتصال باکتری به سلول‌های میزبان جلوگیری می‌شود (Turi et al., 1997).

مطابق جداول دو و سه، اسانس نعناع در دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm در نودمین روز دوره رسیدن باعث کاهش میانگین لگاریتم تعداد *اشریشیاکولای O157:H7* در پنیر سنتی لیقوان می شود. اثرات ضد میکروبی نعناع روی برخی از عوامل عفونی باکتریایی، ویروسی و قارچی مورد بررسی محققان قرار گرفته است. نیریز نقدهی و همکاران(۱۳۸۸)، خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و پونه کوهی را بر روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای O157:H7* در شرایط آزمایشگاهی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی کردند و نشان دادند که اسانس نعناع، به صورت کامل می‌تواند رشد این دو عامل بیماریزا را مهار کند (نیریز نقدهی و همکاران، ۱۳۸۸). پادمینی و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره نعناع به روش آگار ژل دیفیوژن، اثر چشمگیر نعناع را بر ضد باکتری‌های *سالمونلا تایفی* و *پسودوموناس آئروژینوزا* گزارش کردند (Padmini et al., 2010). از مجموع مطالعاتی که در

ارتباط با اثرهای ضد باکتری نعناع صورت گرفته است، می توان استنباط نمود که ترکیب‌هایی چون کارون، لیمونن و پولگون، در این گیاه دارای اثر مشخص ضد باکتریایی هستند (Agrawal et al., 2002Naigre et al., 1996 ;). فلامین و همکاران (1999) نیز، اثر ضد باکتریایی لیمونن، منتول، پولگون و منتون بر باکتری-هایی چون *سالمونلا* و *لیستریا* را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که پولگون دارای بیشترین اثر روی *سالمونلاست* (Flamin et al., 1999). به طور کلی اثرات ضد باکتریایی عصاره و اسانس نعناع بر میکروارگانیسم‌های مختلف به غلظت نعناع، ترکیب ماده غذایی، درجه حرارت نگهداری ماده غذایی و سرشت و طبیعت ارگانیسم بستگی دارد (Imai et al., 2001). متابولیت‌های فنلی موجود در گیاهانی چون نعناع توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال‌های آزاد چربی-ها و دیگر بیومولکول‌های غشاء سلولی و تخریب آن شوند و به این صورت خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد-التهابی خود را اعمال می‌کنند (Strycharz, and Shetty,2002). با توجه اینکه ترکیباتی مثل کارون، لیمونن، منتون و منتول مطابق جدول یک در آنالیز اسانس نعناع مورد مطالعه وجود دارد، لذا اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع می تواند در ارتباط با این ترکیبات باشد.

در مطالعه ای فودا و همکاران (۲۰۰۹)، تأثیر نعناع را به صورت عصاره آبی، عصاره الکلی و اسانس بر علیه دوازده جنس از باکتری‌ها از جمله *اشریشیا کولای*، کپک ها و مخمرها در پنیر سفید مورد بررسی قرار دادند، که عصاره آبی نعناع بر روی هیچ یک از جنس های مورد مطالعه، اثر مهاری نشان نداد. به وسیله عصاره الکلی نعناع اثر ملایمی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت مثل *باسیلوس سرئوس* و *استافیلو کوکوس آرئوس* مشاهده شد، در حالیکه اسانس نعناع قوی ترین مهار کننده ضد میکروبی بود و موجب کاهش معنی داری در شمارش جمعیت باکتریایی، باکتری‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک در مقایسه با گروه کنترل شد، که از نظر اثر ضدمیکروبی اسانس نعناع با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Foda et al., 2009).

تاثیر ضد میکروبی نعناع، ترخون، زیره، پونه و آویشن بر باکتری *اشریشیاکولای* در پنیر سفید ایرانی را کریم و بنیادیان (۱۳۸۳) مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه نشانگر بالاترین اثر ضد میکروبی تلقیح شده در پنیر در روغن فرار گیاه آویشن بود، روغن های فرار گیاهان نعناع، زیره و پونه اثر تقریباً یکسانی بر باکتری تلقیح شده نشان دادند و کمترین اثر را روغن فرار گیاه ترخون نسبت به سایرین از خود نشان داد (کریم و بنیادیان،۱۳۸۳). در بررسی دیگری سلیم (۲۰۱۱) تأثیر اسانس گیاه نعناع با غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد علیه *اشریشیا کولای O157:H7* مورد مطالعه قرار داد که باکتری مورد نظر با غلظت (10^3CFU/g) در پنیر سفید نرم (فتا) تلقیح شده و در دمای هفت درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری گردید که اسانس نعناع با غلظت‌های فوق الذکر تاثیری بر روی *اشریشیا کولای O157:H7* نشان نداد (Selim, 2011). بنیادیان و کریم(۱۳۸۴)، تاثیر اسانس‌های فرار برخی گیاهان (پونه، نعناع، ترخان، زیره و آویشن) را بر روی باکتری-های *اشریشیاکولای* و *استافیلوکوکوس آرئوس*، در محیط کشت مایع مطالعه کردند. نتایج این مطالعه نشانگر این بود که بیشترین تاثیر را روغن فرار آویشن بر روی این دو باکتری داراست و کمترین اثر در ارتباط با گیاه ترخان مشاهده شد و اسانس‌های فرار گیاهان نعناع، پونه و زیره تاثیر متوسطی بر روی باکتری‌های مورد مطالعه از خود نشان دادند (بنیادیان و کریم، ۱۳۸۴).

همانطوری که در جداول دو و سه مشاهده می‌شود میزان کاهش تعداد باکتری *اشریشیا کولای O157:H7* در ابتدای دوره رسیدن کم بوده و هرچه به انتهای دوره رسیدن نزدیک می‌شود افزایش می‌یابد و این درحالی است که با عنایت به فرار بودن اسانس‌ها انتظار می‌رود که مقدار اسانس در طول دوره رسیدن کاهش یابد. به نظر می‌رسد افزایش شیب کاهش باکتری *اشریشیا کولای O157:H7* در انتهای دوره رسیدن مربوط به اثر ترکیبی و هم‌افزایی عوامل مختلف مثل افزایش pH (میرزائی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰؛ Mirzaei et al., 2008) ، افزایش غلظت نمک (میرزائی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰) ، تجمع و انباشته شدن متابولیت‌ها و باکریوسین‌های ضد میکروبی مختلف تولید شده توسط فلور میکروبی طبیعی موجود در طول دوره رسیدن پنیر (Mirzaei, 2011) و حضور اسانس نعناع باشد. مثلا با افزایش غلظت نمک خاصیت آب گریزی غشای خارجی باکتری افزایش و حلالیت پروتئین‌های آن کاهش می‌یابد که این امر نفوذ اسانس نعناع به داخل غشای باکتری را افزایش می‌دهد (Rivas et al., 2010؛ Ultee and Smid, 2001).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که اسانس گیاه نعناع دارای اثر مهاری و کشندگی بر باکتری *اشریشیا کولای O157:H7* در پنیر سنتی لیقوان می باشند که با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ppm، بدون اثرات نامطلوب روی ویژگی های حسی می تواند به‌عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در پنیرهای سنتی لیقوان مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

۱. امید بیگی، رضا. (۱۳۹۲). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، صفحه ۱۸۷-۱۷۰.

۲. بنیادیان، مجتبی و کریم،گیتی. (۱۳۸۴). تاثیر روغنهای فرار گیاهی بر روی جمعیت قارچی پنیر سفید صنعتی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، دوره۲، شماره ۳، صفحه۸-۱.

۳. پورعلی بهزاد، محمد و میرزایی، حمید.(۱۳۹۰). مطالعه میزان آلودگی پنیرهای سنتی عرضه شده در بازار تبریز به کلیفرم ها و اشریشیا کولای بیماریزا. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره۱، شماره۳، پیاپی۳، صفحه ۸۰-۷۱.

۴. زرگری، علی. (۱۳۷۹). گیاهان دارویی. جلدسوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحه ۱۵۴-۱.

۵. صادقی، احسان.، آخوندزاده بستی.، افشین، میثاقی، علی.، زهرایی صالحی، تقی و بهلولی اسکویی، سمیه. (۱۳۸۹). ارزیابی آثار اسانس زیره سبز وپروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر رشد استافیلوکوک اورئوس در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم،دوره۹، شماره ۳۴، صفحه ۱۴۱-۱۳۱.

۶. عباسی فر، آرش.، آخوندزاده بستی، افشین.، کریم، گیتی.، میثاقی، علی.، بکایی، سعید.، گندمی، حسن.، جبلی جوان، اشکان.، حامدی، حسن و ساری، عباسعلی. (۱۳۸۶). ارزیابی اثر آویشن شیرازی بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر فتا. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۲۵ ، صفحه ۱۱۵-۱۰۵.

۷. کریم، گیتی و بنیادیان، مجتبی.(۱۳۸۳). مطالعه تاثیر ضد میکروبی روغن های فرار برخی گیاهان بر باکتری E.coli در پنیر سفید ایرانی. مجله علوم و صنایع غذایی، شماره ۱، صفحه ۲۸-۲۱.

۸. محمدی، خسرو.، کریم، گیتی.، حنیفیان، شهرام.، تاری نژاد، علی رضا و قاسم نژاد، رضا. (۱۳۹۰). مطالعه تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر باکتری7 *Escherichia coli* O157:H در پنیر سفید آب نمکی طی فرآیند تولید و نگهداری. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره۲، صفحه ۷۸-۶۹.

۹. مشتاقی،حمداله و بنیادیان، مجتبی. (۱۳۸۷). اثرات ضد لیستریایی عصاره روغنی نعناع (Mentha spicata L) در یک مدل غذایی . فصلنامهٔ علمی_ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شمارهٔ ۳، صفحه ۳۳۲-۳۲۶.

۱۰. میرزائی، حمید و علیقلی نژاد، علی. (۱۳۹۰). مطالعه تغییرات ویژگیهای شیمیائی پنیر لیقوان در طول مراحل تولید و دوره رسیدن. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز،۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۲، صفحه ۱۱۶۸-۱۱۶۱.

۱۱. نیریز نقدهی، مسلم.، رضوی روحانی، سید مهدی.، کریم،گیتی.، رضویلر، ودود.، زینالی، امیر و دلشاد، رضا. (۱۳۸۸). مطالعه اثرات توأم مونولورین و اسانس‌های پونه(Mentha pulegium L.) و نعناع (Mentha spicata L.) روی باسیلوس سرئوس و اشریشیاکولا O157:H7در شرایط آزمایشگاهی. مجله آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی، دوره ۳، ۴(۱۲)، صفحه ۶۶۶ -۶۵۷.

12. Agrawal, k.k., Khanjua, S.P.S., Ateeque, A., Santha Kumar, T.R., Gupta, V.K. and Kumar, S. 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of Mentha spicata and Athum sowa. Flavour and Fragrance J. 17: 59-63.

13. Asekkun, O.T., Grierson, D.S. and Afolaya, A.J. 2007. Effect of drying methods on the quality and quality of the essential oil of Mentha longifolia L. subsp. Capensis. Food Chem. 10: 995-998.

14. Crim, S.M., Iwamoto, M., Huang, J.Y., Griffin, P.M. and Gilliss, D. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10U.S. Sites, 2006-2013. Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC). 63(15): 328-332.

15. Downes, F.P. and Itō, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition, American Public Health Association, Washington, DC, pp. 331-341.

16. Flamin, G., Cioni, P.L., Pleio, R., Morlli, I. and Panizzi, L. 1999. Antimicrobial activity of essential oil of Calamintha nepta and its constituent pulegon against bacteria and fungi. Phytotherapy Res. 13: 349-351.

17. Foda, M.I., El-Sayed, M.A., El-Moghazy, M.M., Hassan, A.A. and Rasmy, N.M. 2009. Antimicrobial activity of dried spearmint and its extracts for use as white cheese preservatives. Alex. J Food Sci & Technol. 6: 39-48.

18. Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T. and Sasatsu, M. 2001. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth on pathogenic bacteria. Microbios J. 106: 31-39.

19. Jay, J.M., Loessner M.J. and Golden, D.A. 2005 .Modern Food Microbiology .7th edition, Springer, USA, pp. 637-657.

20. Mirzaei, H. 2011. Microbiological changes in lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. African J Microbiol Res. 5: 1609-1614.

21. Mirzaei, H., Ghiasi, A. and Karim, G. 2008. The microbiological and chemical quality of traditional Lighvan cheese (white cheese in brine) produced in Tabriz, Iran. J animal vet advan.7: 1594-1599.

22. Naigre, R., Kalck, P., Paques, C., Roux, I. nad Michel, G. 1996. Comparison of the antimicrobial properties of monoterpens and their carbonylated products. J Plant Med. 62: 275-277.

23. Padmini, E., Valarmathi, A. and Usha, R.M. 2010. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of Mentha spicata and Camellia sinensis. Asian J Exp Biol Sci. 1: 772-81.

24. Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C., O'Brien, M., Navarro-Villa, A, Fanning, S. and Duffy, G. 2010. Inhibition of verocytotoxigenic Escherichia coli in model

broth and rumen systems by carvacrol and thymol. Int J Food Microbiol. 139: 70–78.

25. Selim, S. 2011. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and Escherichia Coli O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. Braz J Microbiol. 42: 187-196.

26. . Sheeladevi, A. and Ramanathan, N. 2012. Antibacterial activity of plant essential oils against food borne bacteria. Int J Pharma & Biol Arch. 3: 1106-1109.

27. Strycharz, S. and Shetty, K. 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of Mentha pulegium in response to polymeric dye R-478 and Agrobacterium rhizogenes. Process Biochem. 37: 805-812.

28. Turi, M., Koljalgs, S. and Milelsaar, M. 1997. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of E. coli strains of different origin. APMIS, 105:956-962.

29. Ultee, A. and Smid, E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. Int J Food Microbiol. 3:373–378.

Effect of essential oil of *Mentha spicata* on the survival of the *Escherichia coli O157:H7* during ripening of traditional Lighvan cheese

Bafandeh Zendeh M[1], Razavilar V[1*], Mirzaei H[2], Mohammadi Kh[2]

1. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

***Corresponding author:** *V.razavi@ut.ac.ir*

Received: 27 August 2019 Accepted: 26 November 2019

Abstract

Vegetable essential oils and their components have anti-bacterial known effects. The aim of this study was to evaluate different concentrations of essential oils of *Mentha spicata* on the survival rate of *Escherichia coli O157: H7* in traditional Lighvan cheese during ripening. Essential oils were extracted using the Kelevenger apparatus, and they were analyzed by GC/MS. To determine the necessary oil concentration in terms of the organoleptic, sensory evaluation was conducted by a test panel. Cheese samples prepared with the help of local manufacturers based in the village of Lighvan in triplicates, including zero and 100 and 200 ppm from essential oils of *Mentha spicata* and doses of 10^3 and 10^5 CFU/mL from the *E. coli O157: H7* bacterium**.** The numbers of the *E. coli O157: H7* bacteria were analyzed during the days 0, 30, 60, and 90 of the ripening period**.** *Mentha spicata* essential oils had considerable antimicrobial effects against *E. coli O157: H7*. Using the vital oils caused a decrease in the numbers of *E. coli O157: H7* bacteria in the 90th days of ripening ($P<0.05$). Using from *Mentha spicata* at a concentration of 200 ppm can reduce the survival of *E. coli O157: H7* in Lighvan cheese. Therefore, it can be argued that the studied essential oil can be used as a natural preservative traditional Lighvan cheese but should be used in concentrations such that do not have any adverse effects on the flavor of food.

Keywords: *Mentha spicata* essential oil, *E. coli O157: H7*, Traditional Lighvan cheese.