

مطالعه تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر باکتری *Escherichia coli O157:H7* در پنیر سفید آب نمکی طی فرآیند تولید و نگهداری

خسرو محمدی^{*1}، گیتی کریم²، شهرام حنیفیان³، علیرضا تارینژاد⁴، رضا قاسم‌نژاد⁵

- 1- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.
- 2- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- 3- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.
- 4- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت معلم، آذرشهر، تبریز، ایران.
- 5- اداره بهداشت و درمان نهجا، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mohammadi@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: 90/1/24 پذیرش نهایی: 90/5/29)

چکیده

اسانس گیاه آویشن شیرازی کشت شده در ایران به طور گسترده‌ای به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی کاربرد دارد. همچنین این اسانس برای بعضی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی اثر ضد میکروبی دارد. هدف از این تحقیق ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر رشد و بقای باکتری اشریشیاکولای *O157:H7* در طی مرحله تولید و نگهداری پنیر سفید آب‌نمکی بود. اسانس این گیاه به روش تقطیر با بخار تهیه و آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی انجام شد. در ابتدا جهت تعیین حداکثر مقدار استفاده از اسانس، آزمایشات حسی انجام گرفت. در پایان زمان نگهداری پنیرها، نتیجه آزمایشات حسی نشان داد که مقادیر بیشتر از 200ppm بر طعم و بوی پنیرها اثر سوء دارد. بنابراین فقط غلظت‌های 0 و 100، 150، 200ppm آزمایش شدند. اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف این اسانس با تأثیر بر رشد باکتری در محیط کشت انتخابی در آزمایشگاه ارزیابی شد. اثر ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی در غلظت 200 ppm در مقایسه با غلظت‌های کمتر و گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.05$). تفاوت معنی‌داری بین pH گروه‌های کنترل و تیمار شده وجود نداشت. در صورتی که استفاده از اسانس آویشن شیرازی به منظور ارتقای کیفیت بهداشتی پنیر توصیه می‌گردد، لازم است از غلظت‌هایی از اسانس استفاده شود که طعم، بوی تند و نامطلوب در پنیر ایجاد نکند.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکولای *O157:H7*، اسانس، آویشن شیرازی، پنیر سفید آب‌نمکی

مقدمه

نگه‌دارنده‌های شیمیایی در محصولات خود نموده‌اند. به اسانس‌های گیاهی روغن‌های اتری یا فرار نیز گفته می‌شود که معمولاً به روش تقطیر با بخار داغ (steam distillation) تهیه می‌شوند. استفاده از مواد

در سال‌های اخیر، تولید کنندگان مواد غذایی توجه زیادی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی از جمله اسانس‌های گیاهی (Essential oils = Eos) به جای

اشریشیاکولای سروتیپ *O157:H7* یکی از عوامل اصلی ایجادکننده مسمومیت غذایی و بیماری‌هایی نظیر اسهال خفیف، کولیت خونریزی‌دهنده (hemorrhagic colitis)، ترومبوتیک رومبوسایتوپنیک پورپورا (thrombotic thrombocytopenic purpura)، سندرم همولیتیک اورمیک (hemolytic uremic syndrome) و مرگ در انسان است (Jamshidi et al., 2008, Shekarforoush et al., 2007 and Solomakos et al., 2008). گاوسانان به‌ویژه گوساله یکی از مخازن اصلی این باکتری است. همچنین حیواناتی مانند گوسفند، بز، آهو، خوک، گربه، سگ، جوجه و غاز به‌عنوان مخزن شناخته شده‌اند. تاکنون هیچ‌گونه بیماری‌زایی ناشی از این باکتری در حیوانات یادشده گزارش نشده است. اما امکان انتقال باکتری از حیوانات به انسان، از راه مستقیم، تماس با آب، خاک و فضولات نشخوار کنندگان و مصرف مواد غذایی مانند شیر خام و پاستوریزه آلوده، ماست، پنیر، همبرگر، سوسیس، گوشت خردشده، ساندویچ‌های گوشتی، سبزیجات، آب میوه‌ها (به‌ویژه آب سیب) وجود دارد (Kenneth et al., 2004; Fratamico et al., 2006). برای کاربردی کردن مصرف اسانس‌های گیاهی به‌عنوان نگه‌دارنده در مواد غذایی، بررسی اثرات ضد میکروبی آنها به‌تنهایی و توأم با عوامل مؤثر دیگر (مانند درجه حرارت نگهداری، pH و غیره) در رشد پاتوژن‌های منتقله از مواد غذایی و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی در مدل‌های آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی ضروری است (Lemay et al., 2002). هدف از این مطالعه تعیین اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی (در غلظت‌های صفر، 100، 150 و

نگه‌دارنده طبیعی به‌جای مواد شیمیایی در تهیه و فرآوری مواد غذایی در حال تحقیق است (Moosavy et al., 2008). اهمیت اسانس‌های گیاهی در این است که علاوه بر ایجاد عطر و طعم در مواد غذایی، ماده مؤثر اصلی آنها دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشد که مصرف کنندگان نسبت به مواد شیمیایی ترجیح می‌دهند. ترکیبات فنولی مسئول خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی هستند. بنابراین هر چه مقدار مواد فنولی در اسانس‌ها بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آنها نیز بالاتر خواهد بود. این مواد شامل کارواکرول (Carvacrol)، اوژنول (Eugenol) و تیمول (Thymol) می‌باشد (Burt, 2004).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) یکی از گیاهان خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد که از نظر جغرافیایی تنها در کشورهای ایران، پاکستان و افغانستان می‌روید. این گیاه بوته‌ای، دارای ساقه‌های متعدد، نازک، سخت و بسیار منشعب، به ارتفاع 40 تا 80 سانتی‌متر، گردینه‌پوش، سبز متمایل به سفید و معطر است. تحقیقات زیادی در مورد ترکیبات و خصوصیات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های بیماری‌زا یا عامل فساد مواد غذایی صورت گرفته است (Basti et al., 2007; Ebrahimzadeh et al., 2003; Fazeli et al., 2007; Moosavy et al., 2008 and Sharififar et al., 2007).

تیمول شاخص‌ترین ترکیبات فنولی آویشن می‌باشند که در بخش‌های مختلف این گیاه از جمله برگ، گل و ریشه به میزان متفاوت وجود دارد. این گیاه علاوه بر این، حاوی تانن، فلاونوئید، ساپونین و مواد تلخ می‌باشد (Burt, 2004).

یک میلی‌لیتر از این کشت رقیق شده به ده لیتر شیر اضافه گردید و کاملاً مخلوط شد تا دوز تلقیح در شیر به 10^4 cfu/ml برسد. همزمان با عمل فوق نمونه‌برداری از شیر صورت گرفت و شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی انجام شد.

تولید پنیر سفید ایرانی

برای تولید پنیر از شیر تازه و پاستوریزه گاو استفاده شد. با آزمایش کوپن (Copan milk test = CMT) شیر از نظر عدم وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی مورد ارزیابی قرار گرفت. شیر مورد استفاده حاوی 2/5 درصد چربی، 8/9 درصد ماده خشک بدون چربی و $pH=6/7$ بود که این ویژگی‌ها مطابق با استاندارد ملی ایران برای تولید پنیر بود (ISIRI, No. 5772). پس از آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری اشیریشیاکولای *O157:H7* به تعداد 10^4 cfu/ml در شیر پنیر تلقیح شد (ساعت صفر). استارتر مورد استفاده باکتری‌های لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (شرکت سازنده - CHR HANSEN) بود که به نسبت 0/5 درصد (وزن به حجم)، تحت شرایط استریل در دمای 35 درجه سلسیوس به آن افزوده شد. پس از گذشت نیم ساعت مقدار 0/02 درصد (وزن به حجم) کلرید کلسیم افزوده شد. در همین زمان اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های صفر، 100، 150 و 200 ppm به شیر پنیر اضافه شد. پس از رسیدن pH شیر به 5/6، رنت حل شده در آب مقطر استریل به مقدار 0/001 درصد (وزن به حجم) افزوده و مخلوط گردید. پس از نگهداری نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای

200 ppm) بر باکتری اشیریشیاکولای *O157:H7* در پنیر سفید آب نمکی و توجه به خواص حساسی پنیر پس از طی 60 روز نگهداری پنیر بود.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه، اسانس و آنالیز آن

گیاه آویشن شیرازی از استان فارس تهیه و توسط گیاه‌شناس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تأیید نام علمی گردید. سپس گیاهان جمع‌آوری شده در سایه خشک شد. اندام‌های هوایی گیاه خشک شده توسط دستگاه کلونجر (Clevenger) به روش تقطیر با آب به مدت 3 ساعت اسانس‌گیری گردید. اسانس توسط سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری و در ظرف دربسته تیره رنگ دور از نور و در یخچال نگهداری شد. آنالیز اسانس توسط دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد.

میکروارگانیزم مورد مطالعه و آماده‌سازی آن جهت تلقیح

باکتری اشیریشیاکولای *O157:H7* (ATCC 25922) اهدایی از گروه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. یک پرگنه از این باکتری دو بار متوالی در محیط آبگوشت قلب و مغز (brain heart infusion broth) در دمای 35 درجه سلسیوس و به مدت 20-18 ساعت فعال‌سازی شد تا جذب نوری در طول موج 600 نانومتر به 0/8 تا 0/9 برسد. در این حالت جمعیت باکتری حدود 10^9 cfu/ml می‌باشد (Rozand et al., 2005). این کشت رقیق شد تا غلظت 10^8 cfu/ml تهیه شد.

آنتی-سرم اختصاصی اشیریشیاکولای *O157:H7* استفاده گردید (Meng et al., 2001).

آزمایشات فیزیکی - شیمیایی نمونه‌های پنیر

به‌همراه نمونه‌برداری برای شمارش میکروبی، آزمایشات فیزیکی - شیمیایی نمونه‌های پنیر شامل اندازه‌گیری pH، نمک و ماده خشک کل انجام شد. اندازه‌گیری pH توسط pH متر دیجیتال مجهز به پروب اندازه‌گیری دما (Testo, Germany) انجام گرفت (Sadler et al., 2003). اندازه‌گیری ماده خشک کل به روش خشک کردن در آون (Oven drying method) در دمای 102 ± 2 درجه سلسیوس برای مدت 16 ساعت (Bradley, 2003) و اندازه‌گیری نمک به روش موهر (Mohr method) انجام شد (Carpenter et al., 2003).

ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی‌های حسی ناشی از افزودن اسانس آویشن شیرازی به پنیر سفید ایرانی از تست پذیرش حسی استفاده گردید. برای این منظور پنیر سفید فاقد باکتری اشیریشیاکولای *O157:H7* تهیه شده با غلظت‌های مختلف اسانس به هفت قسمت تقسیم گردید. ارزیابی حسی به‌وسیله یک پانل هفت نفره که عمدتاً از کارکنان و اعضای گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز بودند، صورت پذیرفت. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی پنیر سفید حاوی اسانس را با استفاده از یک مقیاس حسی 9 نمره‌ای (9-point hedonic scale) مشخص نمودند. در این

35 درجه سلسیوس، لخته حاصله به‌صورت قطعات 1 الی 2 سانتی‌متر مکعبی برش و پس از آگیری، به‌مدت شش ساعت تحت فشار وزنه یک کیلوگرمی آگیری شد (ساعت 7). سپس لخته فشرده به قطعات 7 سانتی‌متر مکعبی بریده شد و به‌مدت 8 ساعت در آب نمک 20 درصد پاستوریزه قرار گرفت (ساعت 15). پس از آن نمونه‌های پنیر تا پایان روز شصت (پایان دوره نگهداری) در آب نمک 6 درصد پاستوریزه قرار داده شد. نمونه‌های پنیر ابتدا به‌مدت 15 روز در دمای 14 درجه سلسیوس و سپس به‌مدت 45 روز در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شد (ISIRI, No. 5772).

شمارش میکروبی و تأیید اشیریشیاکولای *O157:H7*

به‌منظور شمارش باکتری اشیریشیاکولای *O157:H7* از روش کشت سطحی و با انتقال 0/1 میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه‌شده به پلیت‌های دوگانه حاوی محیط کشت سفیکسیم تلوریت - سوربیتول مکانگی آگار (CT-SMAC) واجد 0/05 میلی‌گرم در لیتر سفیکسیم و 2/5 میلی‌گرم در لیتر پتاسیم تلوریت کشت داده شد و پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای 35 درجه سلسیوس، کلنی‌های سوربیتول منفی (بی‌رنگ) شمارش شدند. تعداد 5-10 کلنی برای تأیید با تست‌های بیوشیمیایی سیمون سیترا آگار، SIM agar, MR-VP broth و TSI agar انتخاب شدند. خصوصیات اشیریشیاکولای *O157:H7* در این تست‌ها، گلوکز، اندول و متیل‌رد مثبت اما سیترا، CO_2 ، SH_2 و VP منفی می‌باشد. در نهایت برای تعیین سروتیپ از تست آگلوتیناسیون با

جدول شماره 1: نتایج آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

نام ترکیب	اندیس بازداری	درصد
α -Thujene	932	0/55
α -Pinene	938	3/82
Octanol	995	0/25
Octanone	999	0/28
β -Pinene	1008	0/48
β -Myrcene	1011	1/67
δ -Caren	1017	1/6
Para-cymene	1024	8/58
Dihydrocarveol	1043	1/15
γ -terpinene	1065	7/19
Linalool	1101	1/2
4-Terpineol	1182	0/8
α -Terpineol	1190	0/89
Cumicaldehyde	1197	0/86
Thymol methyl ether	1223	0/7
Carvacrol methyl ether	1231	2/1
Thymol	1289	21/32
Carvacrol	1297	37/1
β -Caryophyllene	1420	2/79
Aromadendrene	1441	0/97
Spathulenol	1571	0/53
Caryophyllene oxide	1582	0/34
جمع	-	95/17

مقیاس نمره 9 خیلی عالی، نمره 8 عالی، نمره 7 خوب، نمره 6 نسبتاً خوب، نمره 5 نه خوب نه بد، نمره 4 نسبتاً بد، نمره 3 بد، نمره 2 خیلی بد و نمره 1 فوق‌العاده بد لحاظ گردید.

آنالیز آماری

جهت بررسی تغییرات میانگین لگاریتم تعداد باکتری و پارامترهای فیزیکی - شیمیایی نمونه‌های پنیر تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی طی تولید و نگهداری پنیر سفید ایرانی، از آزمون اسپلیت پلات بر پایه طرح کامل تصادفی (CRD) و آزمون آنالیز واریانس و بررسی اختلافات شاخص توسط آزمون دانکن انجام شد.

یافته‌ها

نتیجه آنالیز اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول 1 نشان داده شده است.

در غلظت 200ppm بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری در مقایسه با بقیه گروه‌ها معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). به عبارتی با افزایش غلظت اسانس، تعداد باکتری کاهش می‌یابد (شکل 1)، به طوری که در غلظت 200 ppm لگاریتم تعداد باکتری در نمونه‌های پنیر در مقایسه با نمونه‌های فاقد اسانس و غلظت‌های 100 و 150 ppm کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$).

مدت زمان نگهداری بر لگاریتم تعداد اشریشیاکولای O157:H7 تأثیر آماری معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). بیشترین رشد در زمان آنگیری و قالب‌گیری

جدول شماره 2 اثر ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری اشریشیاکولای O157:H7 در نمونه‌های پنیر طی فرایند تولید و نگهداری تا روز 60 را نشان می‌دهد. کاهش لگاریتم تعداد باکتری طی فرایند آنگیری و قالب‌گیری (ساعت 7) در غلظت‌های 150 و 200 ppm معنی‌دار بود ($P < 0.05$). بعد از مراحل نمک‌زنی، رسیدن و نگهداری پنیر تا روز 60، اثر اسانس

200 ppm) در دوره‌های زمانی مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان ندادند.

ارزیابی حسی

نتایج حاصل از ارزیابی حسی در شکل 2 نشان داده شده است. امتیاز خصوصیات حسی نمونه‌های پنیر در غلظت‌های 100 و 150 بالای حد پذیرش بود ($P < 0.05$). درحالی‌که با افزایش غلظت اسانس به 200ppm، امتیاز خصوصیات حسی به زیر حد پذیرش کاهش یافت ($P < 0.05$).

نمونه‌های پنیر بود. درحالی‌که طی نمک‌زنی، رسیدن و نگهداری کاهش لگاریتم باکتری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی

پنیرهای تولیدشده در این آزمایش از نظر ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی در محدوده استاندارد ایران برای تولید پنیر بودند ($pH=4/5 \pm 0/02$). ماده خشک کل $45 \pm 0/07$ درصد و مقدار نمک $3/4 \pm 0/04$ درصد بود. pH شیر پنیر طی مراحل رسیدن و نگهداری به 4/5 کاهش یافت. تغییرات pH طی تولید پنیرها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس (صفر، 100، 150 و

جدول 2: اثر اسانس آویشن شیرازی (در غلظت‌های صفر، 100، 150 و 200 ppm) بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری اشیریشیاکولای O157:H7 در نمونه‌های پنیر در طی فرایند تولید و نگهداری تا روز 60

غلظت اسانس (ppm)				زمان
200	150	100	0	
a0/05±4/16	a0/04±4/12	a0/08±4/11	a0/06±4/11	ساعت صفر (الف)
a0/05±7/07	a0/09±7/24	b0/03±7/63	b0/02±7/72	ساعت 7 (ب)
a0/08±6/80	ab0/03±6/92	bc0/03±7/07	c0/05±7/15	ساعت 15 (ج)
a0/09±5/81	b0/07±6/17	bc0/07±6/42	c0/06±6/51	روز 15 (د)
a0/04±3/98	b0/04±4/33	c0/02±4/62	d0/04±4/87	روز 30 (ه)
a0/03±2/88	b0/02±3/41	b0/02±3/50	c0/04±3/64	روز 45 (و)
a0/03±2/11	b0/09±2/60	b0/09±2/69	b0/08±2/76	روز 60 (ز)

نتایج حاصل سه تکرار برای هر غلظت اسانس می‌باشد

a, b, c, d در هر ردیف میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه می‌باشند، در سطح احتمال 5% آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با هم دارند ($P < 0.05$).

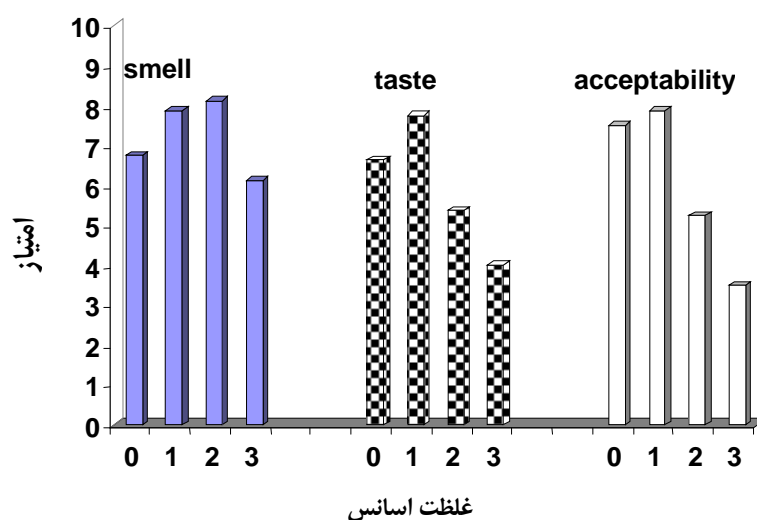
(الف) ساعت صفر: زمان تلقیح باکتری در شیر پنیر

(ب) ساعت 7: پس از آگیری و قالب‌گیری پنیر

(ج) ساعت 15: پس از نگهداری نمونه‌های پنیر در آب نمک 20 درصد

(د) روز 15: پس از دوره رساندن پنیر در انبار سبز (14 درجه سلسیوس)

(ه) روزهای 30، 45 و 60: دوره نگهداری نمونه‌های پنیر در 4 درجه سلسیوس



شکل 1: ارزیابی حسی پنیرهای تیمار شده با اسانس آویشن شیرازی در غلظت‌های مختلف. ستون صفر: کنترل، ستون 1: غلظت 100ppm، ستون 2: غلظت 150ppm، ستون 3: غلظت 200ppm امتیاز 5 بیانگر حد پذیرش می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در بسیاری از موارد جهت پیشگیری از رشد و تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا، عامل فساد و نیز برای افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی از آنتی‌بیوتیک‌ها و نگه‌دارنده‌های شیمیایی و صنایع استفاده می‌شود. این امر باعث ایجاد مسایل و مشکلات عدیده‌ای در سلامت و بهداشت انسان می‌گردد. در سال‌های اخیر استفاده از مواد نگه‌دارنده طبیعی به جای مواد شیمیایی در تهیه یا فرآوری مواد غذایی مختلف مورد پژوهش قرار گرفته است. اهمیت گیاهان در این است که همراه با ماده مؤثر اصلی، متشکل از مواد دیگری با اثرات درمانی می‌باشند. همچنین اسانس‌های گیاهی باعث بهبود طعم و مزه می‌شوند که مصرف کنندگان آن را نسبت به مواد شیمیایی ترجیح می‌دهند (Sharififar et al., 2007).

تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد اثر سینرژیستی اجزای مختلف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی مختلف جهت افزایش قدرت ضد میکروبی آنها انجام شده است. به طوری که تأثیر ضد میکروبی توأم دو جز کارواکرول و تیمول موجود در اسانس آویشن شیرازی بیشتر از تأثیر هر یک از آنها، به صورت تنها گزارش شده است (Basti et al., 2009).

Moosavy و همکاران (2008) اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و نایسین را بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس در یک مدل غذایی مطالعه کرده‌اند. در این مطالعه، این دو ترکیب در دمای 25 درجه سلسیوس بر رشد سالمونلا تایفی موریوم تأثیری نداشته است. اما تعداد سالمونلا تایفی موریوم در غلظت

شیرازی نشان داد که استفاده از این غلظت‌ها تا میزان 150 ppm مورد قبول می‌باشد و افزایش غلظت اسانس به 200 ppm بر خواص حسی محصول اثر نامطلوب دارد.

تاکنون پژوهش‌های زیادی بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی مختلف و اثر ممانعت از رشد این اسانس‌ها بر روی *اشیریشیا کولای O157:H7* صورت گرفته است که اکثریت این بررسی‌ها در محیط‌های کشت آزمایشگاهی بوده است و پژوهش‌های محدودی در مدل‌های غذایی نظیر محصولات لبنی و غیره انجام شده است. اکثر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد، حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت کمتر است که ممکن است به خاطر وجود غشای خارجی در ساختمان دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد (Oussalah et al., 2007).

اگرچه اسانس‌های روغنی به عنوان ترکیبات بی‌ضرر (GRAS= Generally recognized as safe) مورد توجه قرار گرفته‌اند، اما استفاده از آنها اغلب به دلیل وجود ساپونین و مواد تلخ از لحاظ حسی محدود می‌باشد. به همین دلیل تعیین حداقل غلظت لازم جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا بدون مطالعه تأثیر بر کیفیت حسی ماده غذایی امکان‌پذیر نیست.

30 میکرولیتر درصد میلی‌لیتر و دمای 8 درجه سلسیوس در مدت زمان دو روز، از 3 واحد لگاریتمی به کمتر از 2 واحد لگاریتمی کاهش یافته است.

Solomakos و همکاران (2008) تأثیر اسانس نعناع و نایسین را بر *اشیریشیا کولای O157:H7* در گوشت قیمة شده گاو در دمای 4 و 10 درجه سلسیوس مطالعه کرده‌اند. در این مطالعه، اسانس نعناع در غلظت 0/6 درصد در دمای 10 درجه سلسیوس بهتر از دمای 4 درجه سلسیوس عمل کرده است. ترکیب این اسانس با نایسین به مقدار 500 واحد در هر گرم، به مراتب اثر قوی‌تری داشته است.

Palmer و همکاران (2001) اسانس گیاه میخک، دارچین و آویشن را در غلظت‌های 0/1، 0/5 و 1 درصد بر لیستریا مونوسایتوژنز و سالمونلا انتریتیدیس در پنیر نرم کم‌چرب و پرچرب مطالعه کرده‌اند. طبق این تحقیق ترکیب پنیر فاکتور مهمی در تعیین اثر مهاری اسانس‌های گیاهی می‌باشد. در پنیر کم‌چرب همه اسانس‌ها در غلظت یک درصد اثر بازدارنده داشتند و لیستریا مونوسایتوژنز را به مقدار یک واحد لگاریتمی کاهش دادند. در مقایسه در پنیر پرچرب تنها اسانس گیاه میخک اثر داشت.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اثر اسانس آویشن شیرازی بر روی شمارش باکتری مورد مطالعه از الگوی وابسته به دوز تبعیت می‌نماید. بررسی‌های حسی پنیرهای تولید شده با غلظت‌های صفر، 100، 150 و 200 ppm اسانس آویشن

منابع

- Basti, A.A., Misaghi, A. and Khaschabi, D. (2007). Growth response and modeling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. Food Science and Technology, 40: 973-81.
- Basti, A.A., Mashak, Z., Moradi, B., Abasifar, A. and Gandomi, H. (2009). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacturing process of Iranian white brined cheese as affected by *Zataria multiflora* Boiss. essential oil. Journal of Medicinal Plants, 29: 114-122.
- Bradley, R.L. (2003). Moisture and total solids analysis. In: Nielsen, S.S. (Editor), Food analysis. 3rd Edition, New York, Springer Science and Business Media Publishers, pp: 87-89.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International Food Microbiology, 94: 223-253.
- Carpenter, C.E. and Hendricks, D.G. (2003). Mineral analysis. In: Nielsen, S. S., (Editor), Food analysis. 3rd Edition, New York, Springer Science and Business Media Publishers, pp. 195.
- Ebrahimzadeh, H., Yamini, Y., Sefidkon, F., Chalooosi, M. and Pourmortazavi, S. M. (2003). Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extracts of *Zataria multiflora* Boiss. Journal of Food Chemistry, 83: 357-361.
- Fazeli, M.R., Gholamreza, A. and Attari, M.M.A. (2007). Antimicrobial activities of Iranian Sumac and Avishan-e Shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. Food Control, 18: 646-649.
- Fratamico, P.M. and Smith, J.L. (2006). *Escherichia coli* infections. In: Riemann, HP and Cliver, D.O. Foodborne Infections and Intoxications. Third Edition, Elsevier, pp. 224.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2002). Guideline for the production of Iranian white cheese with a semi-industrial. Standard No. 5772.
- Jamshidi, A., Bassami, M.R. and Rasooli, M. (2008). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain reaction in Mashhad, northeastern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 9: 72-76.
- Kenneth, J., Ryan, M.D. and Cray, M.D. (2004). Sherries Medical Microbiology. 4th Edition, Mc Graw Hill, 354-357.
- Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Garipey, C., Rodrigue, N. and Saucier, L. (2002). Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. International Journal of Food Microbiology, 78: 217- 226.
- Meng, J., Feng, P. and Doyle, M.P. (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. In: Downes, FP and Itō, K (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Edition, Washington, D.C., American Public Health Association, pp. 331-341.
- Moosavy, M.H., Akhondzadeh, Basti, A., Misaghi, A., Salehi, T.Z. and Abbasifar, R. (2008). 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. Journal of Food Research, 41: 1050-1057.
- Oussalah, M., Caillet, S. and Laroix, M. (2006). Mechanism of action of Spanish Oregano, Chinese Cinnamon, and Savory essential oils against cell membrane and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 69: 1046-1055.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Laroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Control, 18: 414-420.
- Palmer, A.S., Steward, J. and Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. Food Microbiology, 18: 463-470.
- Rozand, C., Ray-Gueniot, S., Ragot, C., Bavai, C., Mazuy, C. and Montet, M.P. (2002). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. Letters in Applied Microbiology, 35: 7-11.
- Sadler, G.D. and Murphy, P.A. (2003). pH and titratable acidity. In: Nielsen, S.S. (Editor.), Food analysis. 3rd Edition, New York, Springer Science and Business Media Publishers, pp. 207-225.
- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Journal of Food Control, 18: 800-805.

- Y Shekarforoush, S.S., Nazer, A.H.K., Firouzi, R. and Rostami, M. (2007). Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli O157:H7* in barbecued chicken used in Iran. *Journal Food Control*, 18: 1428-1433.
- Y Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P. and Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli O157:H7* in minced beef during refrigerated storage. *Jornal of Meat Science*, 80: 159-166.

Antimicrobial effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture and ripening of white brined cheese

Mohammadi, Kh.^{1*}, Karim, G.², Hanifian, Sh.³, Tarinejad, A.⁴, Gasemnezhad, R.⁵

1-Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

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

3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

4- Department of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Tarbiat Moallem University, Azarshahr, Tabriz, Iran.

5- Health office, Islamic Republic of Iran Air Force, Tabriz, Iran.

Corresponding author email: Mohammadi@iaut.ac.ir

(Received: 2011/4/13 Accepted: 2011/8/20)

Abstract

Thyme (*Zataria multiflora* Boiss) cultivated in Iran is extensively used as flavoring agent in dairy products. Also it has antimicrobial effects on the pathogenic bacteria which cause some food borne diseases. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of this plant's essential oil on *Escherichia coli* O157:H7 in white brined cheese, considering the organoleptic properties of cheese. The essential oil of *Z. multiflora* Boiss. was obtained by hydrodistillation and analyzed by GC/MS. Preliminary sensory tests were carried out to establish the upper level of the essential oil incorporation. At the end of storage time, evaluation of the sensory characteristics of the supplemented cheeses suggested that, *Z. multiflora* Boiss. essential oil's concentrations more than 200 ppm in cheese milk had adverse effects on the taste and odor of cheeses. Therefore, further examinations were carried out with 0, 100, 150 and 200 ppm concentrations. The inhibitory effects of different concentrations of the *Z. multiflora* Boiss. essential oil on *E. coli* O157:H7 were determined by enumeration of the microorganism on selective media and comparing the bacterial counts in different groups. The inhibitory effect of *Z. multiflora* Boiss. essential oil at concentration of 200 ppm was higher compared to its lower concentrations and also compared to the control groups. No significant difference ($P > 0.05$) was observed between the pH values of control groups and treated samples. Incorporation of *Z. multiflora* Boiss. essential oil at concentration of 200 ppm into cheese milk had significant antibacterial activity ($P < 0.05$). However, when these kinds of essential oil has to be recommended for cheese safety, issue of strong taste and smell should be addressed.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, *Zataria multiflora* Boiss., Essential oil, White brined cheese