Journal of Food Hygiene, Vol. 10, No. 38, Summer 2020

"Research article" DOI: 10.30495/JFH.2020.1882470.1239

Effect of *Oliveria Decumbens* essential oils on microbial characteristics of hamburger

Ghorbani, Z.[1], Zamindar, N. [2*], Jelvan, M.[1], Golabadi, M.[3]

1. MSc. Graduate in Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2 Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3 Associate Professor, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
*Corresponding Author: n.zamindar@khuisf.ac.ir
(Received: 2019/11/3 Accepted: 2020/8/15)

Abstract

The use of herbal essential oils can inhibit bacterial growth and proliferation. In this investigation, the chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Oliveria decumbens* on culture media and hamburger have been studied. GC/MS analysis identified 12 components in the essential oils of *Oliveria decumbens*. The antimicrobial activity of the essential oils was investigated against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* using disc diffusion and well plate method. The experiment was a factorial form of a completely randomized design with 3 levels in essential oil concentration (0, 0.32, and 1.25 µl/g) in 4 periods (1, 20, 40, and 60 days) with 3 replications on *S. aureus*, *E. coli*, mold, yeast and total count in hamburger. The most important identified compounds in the essential oils of *Oliveria decumbens* were phenolic and aldehyde compounds. Minimum inhibition concentrations of *Oliveria decumbens* essential oils against *S. aureus* and *E. coli* were 0.32 µl/ml and 0.625 µl/ml, respectively. Besides, the number of microorganisms decreased with increasing concentrations of essential oils of *Oliveria decumbens*. There was no significant difference between the control and concentrations of 0.32 µl/g in *E. coli* count but in all types of microorganisms, the highest decrease was observed in the concentration of 1.25 µl/g (p<0.05). The high amount of aldehydes and phenols in *Oliveria decumbens* essential oils may be a reason for antimicrobial effects of the plant essential oils that can be considered as a natural source of preservative in food.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Antimicrobial activity, *Oliveria decumbens*, *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Hamburger

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2020.1882470.1239

اثر اسانس لعل‌کوهستان بر ویژگی‌های میکروبی همبرگر

زهرا قربانی[۱]، نفیسه زمین‌دار[۲*]، مهشید جلوان[۱]، مریم گل‌آبادی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
۳. دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: n.zamindar@khuisf.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۸/۸/۱۲ پذیرش نهایی: ۹۹/۵/۲۵)

چکیده

استفاده از اسانس‌های گیاهی در بازدارندگی رشد و تکثیر باکتری‌ها به‌ویژه در دهه اخیر افزایش‌یافته است. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی ترکیب شیمیایی و تأثیر ضد میکروبی اسانس لعل‌کوهستان در محیط کشت میکروبی و همبرگر بود. فعالیت ضدمیکروبی اسانس لعل‌کوهستان در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* به‌وسیله روش دیسک دیفیوژن و چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ سطح در غلظت اسانس (۰، ۰/۳۲ و ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم) در ٤ دوره زمانی (۱، ۲۰ ، ٤۰ و ٦۰ روز) با ۳ تکرار برشمارش کلی، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* ، شمارش *اشریشیا کولای*، شمارش کپک و مخمر در همبرگر انجام شد. ۱۲ ترکیب شاخص در اسانس لعل‌کوهستان شناسایی شد. مهم‌ترین ترکیبات شامل ترکیبات فنولی و آلدئیدی بودند. اسانس لعل‌کوهستان بیشترین خاصیت ضدمیکروبی را بر *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۳۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و سپس *اشریشیا کولای* با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/٦۲۵ میکرولیتر بر گرم داشت. همچنین، با افزایش غلظت اسانس گیاه لعل‌کوهستان، تعداد انواع میکروارگانیسم‌ها کاهش یافت و تنها در شمارش باکتری *اشریشیا کولای* تفاوت معنی‌داری بین غلظت شاهد و غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر بر گرم وجود نداشت، ولی در تمامی انواع میکروارگانیسم‌ها بیشترین کاهش در غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر برگرم مشاهده شد (p<۰/۰۵). مقدار بالای آلدئید و فنول موجود در اسانس لعل‌کوهستان از دلایل احتمالی تأثیر ضدمیکروبی گیاه می‌باشد و اسانس گیاه می‌تواند به‌عنوان یک منبع طبیعی نگهدارنده در غذا مورداستفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، لعل‌کوهستان، *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، همبرگر

مقدمه

همبرگر یکی از مهم‌ترین محصولات تولیدشده از گوشت قرمز است که طرفداران زیادی دارد (INSO, 2304/2016; Torbati *et al*., 2011). گوشت حیوانات منبع خوبی برای رشد میکروب‌های بیماری‌زا بوده و با توجه به این‌که این فرآورده تا زمان مصرف فرآورده‌ای خام است، کنترل کیفیت میکروبی این فرآورده گوشتی ضروری است (Fernandez Gines *et al*., 2005). کاربرد مواد ضدباکتری با منشأ شیمیایی اگرچه در حفظ کیفیت، افزایش ماندگاری و خسارت‌های اقتصادی محصول مفید هستند ولی ارزش سلامت آن را کاهش می‌دهد (Movahhed, 2011).

در این راستا، استفاده از اسانس‌ها به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی روشی مؤثر برای کنترل حضور باکتری‌های بیماری‌زا و نیز افزایش ماندگاری غذاهای فرآوری شده به‌نظر می‌رسد (Baydarh *et al*., 2004; Amin *et al*., 2018). در سال‌های اخیر به تأثیر اسانس‌های گیاهی روی پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های عامل فساد غذایی توجه ویژه‌ای شده است (Sadeghi *et al*., 2015; Burt, 2004). ازجمله گیاهان بومی ایران می‌توان به گیاه لعل‌کوهستان با جنس *اولیوریا* (*Oliveria*) متعلق به خانواده *آمبلیفرا* (*Umbelliferae*) اشاره کرد (Amin *et al*., 2005; Amin *et al*., 2018). اندام هوایی این گیاه دارای مقدار قابل‌توجهی اسانس می‌باشد که حاوی مونوترپن‌های اکسیژن‌دار است. از مهم‌ترین ترکیبات آن می‌توان به تیمول و کارواکرول اشاره کرد. گزارش‌شده است که اسانس این گیاه خواص ضد میکروبی خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها دارد (Amin *et al*., 2018).

در پژوهشی که بر روی ترکیبات اسانس و فعالیت ضدمیکروبی لعل‌کوهستان انجام گردید، گزارش شد که اسانس لعل‌کوهستان، فعالیت ضد میکروبی وسیعی در مقابل همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده نشان می‌دهد و این اثر با اثر آنتی‌بیوتیک‌های تجاری قابل‌مقایسه می‌باشد. همچنین این پژوهش نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گیاه لعل‌کوهستان بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به یک اندازه بوده و این مقدار از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای قارچ و مخمر در آن تحقیق کمتر بود (Amin *et al*, 2005). در تحقیقی دیگر فعالیت ضدمیکروبی بالای اسانس لعل‌کوهستان بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای*، *آسپرژیلوس‌نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* و تأثیر ضدمیکروبی کمتر آن بر روی *سودوموناس آئروژیناس* مشاهده گردی د (Haji mehdipoor *et al*., 2010). با توجه به مطالعات قبلی، هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس لعل‌کوهستان بر ویژگی‌های میکروبی همبرگر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- اسانس‌گیری از گیاه لعل‌کوهستان

ساقه و اندام‌های هوایی گیاه لعل‌کوهستان (در مرحله کامل گلدهی) پس از جمع‌آوری از منطقه سی‌سخت استان یاسوج در سایه خشک و بعد از خرد کردن در داخل یخچال نگهداری گردید. سپس به روش تقطیر با آب (به نسبت ۱۰۰ گرم گیاه لعل‌کوهستان خشک‌شده به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به مدت ٤ ساعت با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری به عمل آمد. پس از جداسازی اسانس از سطح آب، آب‌گیری توسط

سولفات سدیم (Merck, Germany)به عمل آمد و در شیشه‌ی استریل تیره و غیرقابل نفوذ در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (Haji mehdipoor *et al.*, 2010).

- آنالیز اسانس گیاه لعل‌کوهستان

اجزای اسانس گیاه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (HewlletPachard- HP-6890, USA) مشخص گردید، به این صورت که یک میکرولیتر از اسانس به دستگاه تزریق و درصد نسبی اجزای اسانس با استفاده از مواد استاندارد و مقایسه زمان بازداری برحسب دقیقه شناسایی گردید (Adams, 2007).

- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس به روش چاهک و دیسک

جهت تهیه رقت‌ها ابتدا ۵ میکرولیتراسانس تهیه شده از گیاه لعل کوهستان به یک میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰ درصد حجمی (Merck, Germany) اضافه شد و به کمک شیکر کاملا مخلوط شد تا غلظت ۵ میکرولیتر بر میلی لیتر به دست آید. سپس یک میلی‌لیتر از محلول به‌دست آمده به لوله آزمایش دوم حاوی ۱ میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰درصد حجمی اضافه و به همین ترتیب ادامه داده شد و غلظت‌های ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵٦ میکرولیتر بر میلی‌لیتر حاصل شد. همچنین ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری ۰/۵ مک‌فارلند به کمک سوآپ سرپنبه‌ای استریل بر روی پلیت‌های آماده مولرهینتون آگار (Merck, Germany) کشت سطحی شد و به مدت ۱ دقیقه باقی ماند.

جهت انجام روش چاهک با یک پیپت پاستور استریل خنک شده، تعداد ٦ چاهک بر روی پلیت مولرهینتون آگار ایجاد شد. به کمک یک سمپلر سترون میزان ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت به هر یک از چاهک‌ها جداگانه انتقال داده شد و جهت انجام روش دیسک، بعد از استریل دیسک‌ها میزان ۲۰ میکرولیتر از هر غلظت به هر یک از دیسک‌ها جداگانه انتقال داده شد. در هر دو روش جهت کنترل منفی از دی‌متیل‌سولفوکساید ۱۰ درصد حجمی و جهت کنترل مثبت از دیسک *تتراسایکلین* برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و از دیسک *آموکسی‌سیلین* برای باکتری *اشریشیا کولای* استفاده شد. در هر ۲ روش چاهک و دیسک پس از قرارگیری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس تعیین و قطر هاله عدم رشد باکتری برحسب میلی‌متر محاسبه گردید (Hajimehdipoor *et al*, 2010; Motamedi *et al*, 2010).

- نحوه تهیه همبرگر

گوشت قرمز منجمد برزیلی از شرکت اخوان تهیه شد. مواد اولیه طبق فرمولاسیون (گوشت قرمز ٦۰٪، پیاز ۲۱٪، آرد سوخاری ٦٪، روغن ۷٪، تخم‌مرغ ۱/۵٪، گلوتن ۱/۵٪، نمک ۱/۲٪، سیر منجمد ۱٪، ادویه پودری ۰/۸٪) با یکدیگر مخلوط شدند. خمیر آماده‌شده به سه بخش تقسیم و داخل همزن مقدار مناسب اسانس لعل‌کوهستان سترون (۱/۲۵، ۰/۳۲ و ۰ میکرولیتر برگرم) به هر قسمت همبرگر اضافه گردید. هر بخش خمیر به ۱۲ قسمت تقسیم شد و داخل کیسه‌های استریل بسته‌بندی و در داخل تونل انجماد قرار گرفت و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شد (INSO, 2304/2016).

-آزمون‌های دوره‌ای همبرگر

-آماده‌سازی همبرگر جهت کشت میکروبی

یک ساعت قبل از انجام آزمایش، بسته‌های مورد آزمون در شرایط محیط آزمایشگاه قرار گرفت. سپس آماده‌سازی همبرگر جهت کشت میکروبی در زیر هود (Parsazma-H.P 150, Iran) استریل شده با لامپ UV انجام گرفت. برای این منظور ابتدا سطح بسته‌های مورد آزمون با الکل (Merck, Germany) تمیز و به‌وسیله چاقوی استریل درب بسته‌ها بازگردید. سپس با استفاده از چاقوی استریل از قسمت‌های مختلف همبرگر نمونه‌برداری (۱۰ گرم) شد و در ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل ریخته (رقت 10^{-1}) و پس از مخلوط کردن آن با شیکر (Wiggens, Germany)، ۱۰ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} به ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل هم‌دما با محیط آزمایشگاه اضافه کرده (رقت 10^{-2}) و به همین ترتیب تا رقت 10^{-6} از نمونه همبرگر آماده‌سازی شد (ISIRI, 356/2001).

- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها

با استفاده از پیپت سترون از سوسپانسیون اولیه رقت‌های اعشاری تا 10^{-5} تهیه و مقدار ۱ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} به‌طور جداگانه به پلیت سترون انتقال یافت. محیط پلیت‌کانت‌آگار (Quelab, Canada) به‌صورت پورپلیت به آن افزوده شد و پس از ۷۲±۳ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰±۱ درجه سلسیوس شمارش گردید (ISO, 4833-1/2013).

- شمارش *اشریشیا کولای*

جهت شناسایی *اشریشیا کولای* ۱۰ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} به محیط لوریل سولفات مضاعف (Merck, Germany)، حاوی لوله دورهام افزوده شد و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤±۲ ساعت در داخل انکوباتور (Wisecube, Korea)، در صورت وجود گاز و کدورت، چند قطره از آن به محیط کشت EC-broth (Merck, Germany) حاوی لوله دورهام منتقل گردید و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤±۲ ساعت در داخل انکوباتور (Wisecube, Korea) در صورت وجود گاز و کدورت، چند قطره از آن به محیط آب‌پپتونه (Merck, Germany) منتقل و در دمای ٤٤ درجه سلسیوس به مدت ٤۸±۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. مشاهده حلقه قرمز با ریختن معرف اندول (Baharafshan, Iran) در آب پپتونه دلیل بر وجود اندول بود. هر یک از لوله‌های حاوی آب‌پپتونه که در آن اندول تولید گردید ازنظر وجود *اشریشیا کولای* مثبت در نظر گرفته شد. بعد از مشخص کردن لوله‌های مثبت در روش نه لوله‌ای بر اساس جدول MPN، تعداد باکتری *اشریشیا کولای* تخمین زده شد (ISIRI, 2946/2005).

- شمارش کپک‌ها و مخمرها

با استفاده از یک پیپت سترون مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-2} از سوسپانسیون اولیه به یک پلیت دارای محیط کشت دی‌کلران‌رزبنگال‌کلرامفنیکل‌آگار (Merck, Germany) منتقل گردید. به کمک پخش‌کننده سترون مایعات تلقیحی بر روی محیط‌های کشت پخش شد تا همه مایعات به‌طور کامل جذب گردد. پلیت‌های کشت

داده‌شـــده به‌صـــورت هوازی در انکوباتور یخچال‌دار (Wisecube, Korea) در دمای ۲۵ درجه سـلسـیوس به مدت پنج روز گرمخانه‌گذاری و شـمارش شدند (ISO, 21527-1/2008).

- شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*

با اسـتفاده از پیپت سـترون ۱ میلی‌لیتر از رقت 10^{-2} از سـوسـپانسـیون اولیه بر روی سطح یک پلیت حاوی محیط کشت آماده بردپارکر (Merck, Germany) کشت داده شـد. نمونه به کمک میله شیشه‌ای سترون در سطح محیط کشت پخش شد و پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در دمای محیط (جهت جذب مایع کشـــت داده‌شـــده)، به مدت ۲٤±۲ ســـاعت در دمای ۳۷ درجه ســـلســـیوس گرمخانه‌گذاری شـد. سـپس کلنی احتمالی با اسـتفاده از حلقه کشـت سـترون به محیط کشـت آبگوشت عصاره مغز و قلب (Merck, Germany) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سـلسیوس به مدت ۲٤±۲ ساعت گرمخانه‌گذاری (Wisecube, Korea) شـــد. در شـــرایط ســـترون ۰/۱ میلی‌لیتر از سـوسـپانسیون فوق با ۰/۳ میلی‌لیتر پلاسمای خرگوش (Merck, Germany) مخلوط و در دمـای ۳۷ درجه سـلسیوس به مدت ٤ تا ٦ ساعت گرمخانه‌گذاری (Wisecube, Korea) گردیـد. آزمـایش کواگولـاز در صـورت تشـکیل لخته، مثبت گزارش شد (ISO, 6888-1/2003).

- آزمون ارزیابی حسی

همبرگر تولیدشـــده با غلظت‌های مختلف اســـانس (۰/۱۵، ۰/۲۵، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ مـیـکرولیتر بر گرم) در روغن مایع سـرخ شـد. سپس هریک از این غلظت‌ها به همراه شـــاهد به‌وســـیله ۲۱ ارزیاب حســـی با آزمون مقایســـات ســـه‌تایی ارزیابی شـد تا بیشـترین غلظتی از اسـانس که نسـبت به نمونه شاهد تغییر طعم معنی‌داری نداشـت انتخاب شود. سپس غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکرولیتر بر گرم اســـانس با ۱۰ ارزیاب حســـی مورد آزمون مقـایســـات چنـدتـایی قرار گرفتنـد تا ارجحیت مصرف کننده از نظر طعم مشخص گردد. در این آزمون، امتیـاز ۳ برای ویژگی ضـــعیف،امتیـاز ۲ برای ویژگی متوســـط و امتیـاز ۱ برای ویژگی خیلی خوب در نظر گرفته شـد و مطلوب‌ترین طعم اسانس موردبررسی قرار گرفت (Kramer and Twigg, 1966).

- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بـه‌منظور بررســـی اثر ضـــدمیکروبی اســـانس لعل‌کوهسـتان بر ویژگی‌های میکروبی همبرگر، آزمایشی به صـورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصـادفی با ۳ تکرار و دو فاکتور غلظت اسـانس در ۳ سـطح (۱/۲۵، ۰/۳۲ و ۰ میکرولیتر برگرم) و فاکتور زمان در ٤ سـطح (روزهای ۱، ۲۰، ٤۰ و ٦۰) برای شمارش کلی، شمارش *اشـریشـیا کولای*، شـمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* و شـمارش کپک و مخمرانجام شـد. با استفاده از آزمایش فـاکتوریل امکان ارزیابی اثر متقابل غلظت و زمان فراهم شـــده و شـــمـارش میکروبی در زمانهای مختلف قابل مقایسه خواهند بود، در صورتی که در طرحهای مجزای کاملا تصـادفی زمان قابل مقایسـه نیسـت. پس از انجام تجزیه واریانس، مقایسـات میانگین صفات ارزیابی شده (شـــمارش‌های میکروبی) در متغیرهای مســـتقل زمان و غلظـت اســـانس و اثر متقابل آنها بااســـتفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.0 انجام شـــد. برای رســـم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

یافته‌ها

- نتایج به‌دست‌آمده از اسانس‌گیری گیاه لعل‌کوهستان

اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه لعل‌کوهستان به رنگ زرد و دارای بوی نافذ شبیه به بوی اسانس آویشن بود. بازده اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه ۳ درصد به‌دست آمد. اجزای اسانس شناسایی شد و بیشترین اجزای اسانس شامل ترکیباتی با ماهیت آلدئیدی و سپس فنولی بود (جدول ۱). ترکیبات کارواکرول و میریستیسین نیز از اسانس لعل‌کوهستان استخراج شد.

جدول (۱)- ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس گیاه لعل‌کوهستان

KI	درصد	ترکیبات	زمان بازداری
۹۳۰	۰/۵۹۱	3-Thujene	۱۵/۵۲٤٦
۹۳۹	۰/۷۸۷	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	۱۵/۸٤۳۳
۹۵۸	۰/۰۲۸	2,2-dimethyl-3-methylene-bicyclo [2.2.1]heptane	۱٦/۵۱۳۲
۱۰۲۷	۰/۸۹۷	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl	۱۸/۹۱۱۷
۱۰۵۰	۱/٦۳۹	4(10)-Thujene	۱۹/۷۰۵۷
۱۰۷۸	۸۰/۸۸	1,3-Cyclohexadiene-1-carboxaldehyde, 5,5-dimethyl-	۲۰/٦۳٤۹
۱۰۹٦	۰/٤۵۵	Cyclohexene,1-methyl-4-(1-methylethylidene)-	۲۱/۲٦۱۵
۱۱۰٦	۰/۰٤۷	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-	۲۱/۵٦٤
۱۳۱۸	۵/۹۳۱	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	۲۸/۰٤۱
۱۳۲۹	٤/۵۲۷	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-	۲۸/۳۳۸۱
۱۳۳۷	۰/۰۱۸۸	Carvacrol	۲۸/۵۵٤۲
۱۵٤٤	۰/۰۵۲	Myristicine	۳٤/۰۳۷۲
–	۱/۱٤۲	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	۵۳/۷٤۹

- حداقل غلظت بازدارندگی اسانس لعل‌کوهستان

بر اساس هر دو روش (دیسک و چاهک)، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (۰/۳۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) بیشتر از مقدار آن برای *اشریشیا کولای* (۰/٦۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به‌دست آمد. نتایج به‌دست آمده مربوط به حداقل غلظت بازدارنده در هر دو روش دیسک و چاهک برای هر میکروب مشابه بود (جدول ۲).

- قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها

چاهکی که با دی‌متیل سولفوکساید تلقیح شده بود، هیچ هاله عدم رشد تشکیل نداد. قطر هاله عدم رشد ناشی از دیسک *تتراسایکلین* در محیط کشت حاوی *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۲/۵ میلی‌متر) بیشتر از قطر هاله عدم رشد ناشی از دیسک *آموکسی‌سیلین* در محیط کشت حاوی *اشریشیا کولای* (۱۵/۵) میلی‌متر) بود. مقایسه قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در روش چاهک و دیسک نشان داد که نسبت قطر هاله عدم رشد در روش چاهک نسبت به روش دیسک بیشتر بود (جدول ۲).

جدول (۲)- قطر هاله (میلی‌متر) عدم رشد باکتری‌های مورد آزمایش در حضور غلظت‌های مختلف اسانس لعل کوهستان (n= 2)

سویه باکتری	روش	حداقل غلظت بازدارندگی (µl/ml)	غلظت اسانس لعل‌کوهستان (µl/ml)				
			۲/۵	۱/۲۵	۰/۶۲۵	۰/۳۲	۰/۱۵
اشریشیا کولای ATCC8739	چاهک	۰/۶۲۵	۱۰/۶ ±۱	۱۰ ±۱/۵	۸ ±۱/۵	۰ ± ۰	۰ ± ۰
	دیسک	۰/۶۲۵	۱۰/۳ ±۱/۵	۹/۷ ±۲	۸ ±۱/۶	۰ ± ۰	۰ ± ۰
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC6538	چاهک	۰/۳۲	۲۰/۷ ±۱/۷	۱۰/۹ ±۱/۸	۱۰/۵ ±۲	۹ ±۱	۰ ± ۰
	دیسک	۰/۳۲	۲۰/۲ ±۱/۴	۱۰/۲ ±۲	۱۰ ±۱/۷	۸ ±۱/۵	۰ ± ۰

- آزمون‌های میکروبی

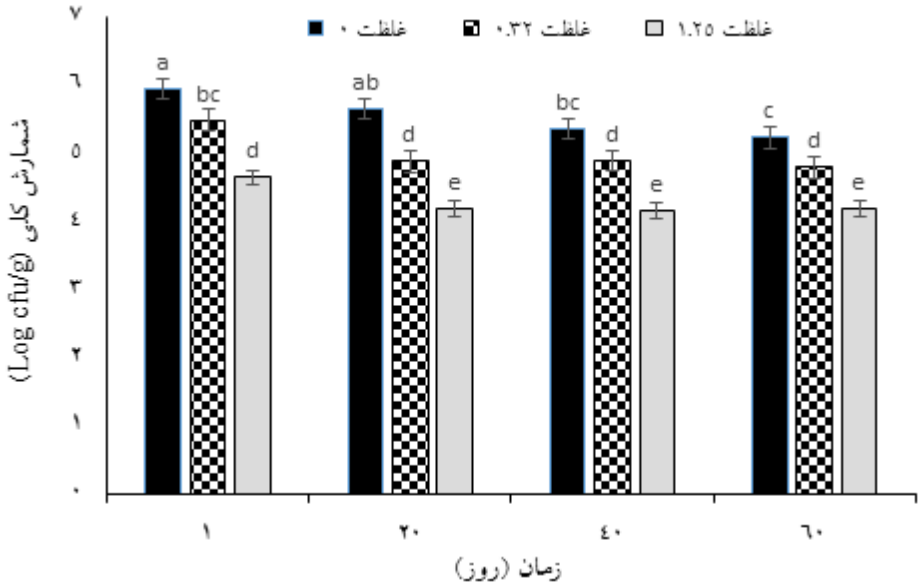
-اثر غلظت لعل‌کوهستان و زمان بر شمارش کلی

غلظت‌های مختلف اسانس لعل‌کوهستان و زمان ماندگاری همبرگر (p<۰/۰۱) و اثر متقابل زمان و غلظت اسانس لعل‌کوهستان (p<۰/۰۵) بر روی شمارش کلی اثر معنی‌داری داشتند. همان‌گونه که در جدول (۳) مشاهده می‌شود تعداد باکتری شمارش‌شده با افزایش غلظت اسانس لعل‌کوهستان کاهش معنی‌داری پیدا نمود (p<۰/۰۱). با توجه به نمودار (۱)، با افزایش غلظت اسانس لعل‌کوهستان تعداد باکتری شمارش‌شده کاهش یافت و این تأثیر با افزایش غلظت اسانس افزایش پیدا نمود. در نمونه شاهد با افزایش زمان در روز چهل کاهش بیشتر تعداد باکتری اتفاق افتاد (p<۰/۰۵) و با افزایش زمان ماندگاری در روزهای بعدی کاهش معنی‌داری رخ نداد ولی در غلظت‌های ۰/۳۲ و ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم در روز بیست کاهش بیشتر تعداد باکتری ملاحظه گردید و در روزهای بعدی کاهش معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول (۳)- مقایسه میانگین شمارش (log cfu/g) میکروب‌های مختلف درغلظت‌های مختلف اسانس

غلظت (µl/g)	شمارش کلی	کپک و مخمر	*اشریشیا کولای*	*استافیلوکوکوس آرئوس*
۰	۵/۵۶ ± ۰/۳۶[a]	۲/۸۲ ± ۰/۰۹[a]	۲/۳۳ ± ۰/۰۲[a]	۲/۰۲ ± ۰/۰۸[a]
۰/۳۲	۵/۰۲ ± ۰/۳۰[b]	۲/۷۳ ± ۰/۱۵[b]	۲/۳۳ ± ۰/۰۲[a]	۱/۶۴ ± ۰/۰۵[b]
۱/۲۵	۴/۳۰ ± ۰/۲۷[c]	۱/۷۰ ± ۰/۰۰[c]	۱/۶۳ ± ۰/۱۲[b]	۰/۷۰ ± ۰/۰۰[c]

در هر ستون اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند، اختلاف معنی‌داری از نظر صفات مورد بررسی از لحاظ آزمون دانکن با یکدیگر ندارند (p<۰/۰۵).



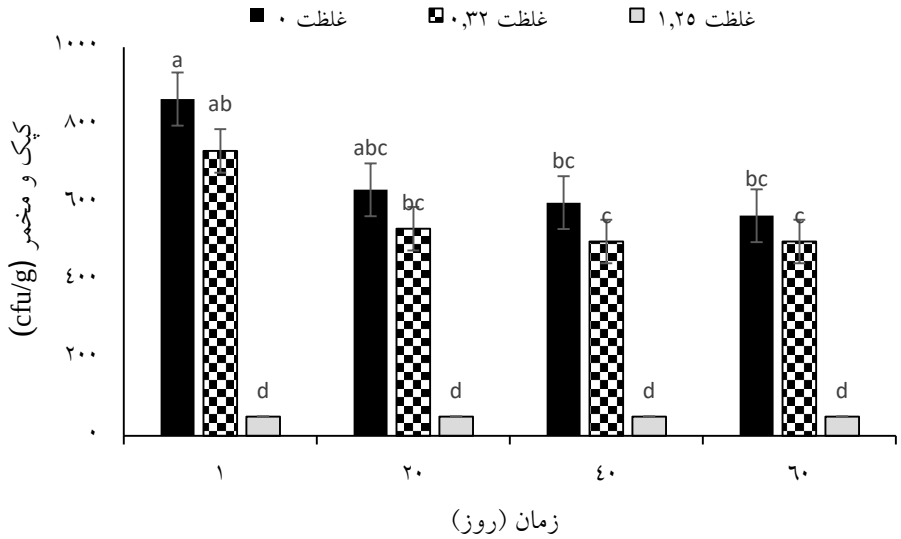
نمودار (۱)- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و غلظت (میکرولیتر بر گرم) اسانس برشمارش کلی

a, b, c, d, e: میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار در شمارش کلی ($p<۰/۰۵$) در همبرگر ندارند.

- اثر غلظت لعل‌کوهستان و زمان‌بر شمارش کپک و مخمر

غلظت اسانس لعل‌کوهستان ($p<۰/۰۱$)، زمان ماندگاری و اثر متقابل زمان و غلظت اسانس لعل‌کوهستان ($p<۰/۰۵$) بر روی شمارش کپک و مخمر اثر معنی‌داری داشت. همان‌گونه که در جدول (۳) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس لعل‌کوهستان تعداد کپک و مخمر کاهش معنی‌داری پیدا نمود ($p<۰/۰۱$). در این بررسی با توجه به نمودار (۲)، میزان کپک و مخمر با به کار بردن اسانس لعل‌کوهستان در همه نمونه‌ها و در تمام دوران نگهداری کاهش پیدا کرد.

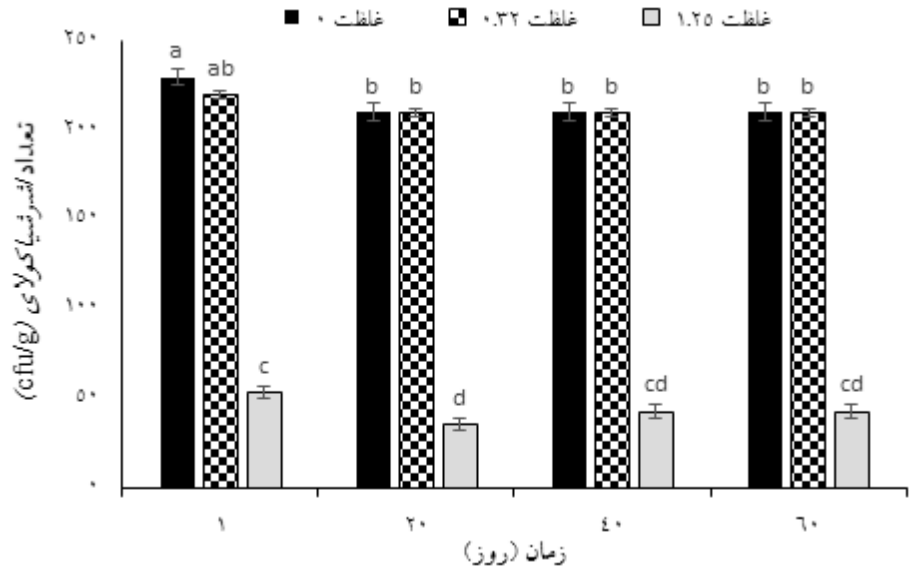
به‌خصوص غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان کاهش معنی‌داری در تعداد کپک و مخمر نسبت به نمونه شاهد در روزهای مختلف نگهداری داشت. با پیشرفت زمان در روز چهل در نمونه شاهد و نمونه با غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر برگرم کاهش معنی‌داری نسبت به‌روز اول وجود داشت ($p<۰/۰۵$) و با افزایش زمان ماندگاری در روزهای بعدی کاهش بیشتری مشاهده نشد اما نمونه با غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر برگرم در طی دوران نگهداری به دلیل عدم وجود کلنی در پلیت کاهش معنی‌داری نداشت.



نمودار (۲)- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و غلظت (میکرولیتر بر گرم) اسانس بر شمارش کپک و مخمر در همبرگر
a, b, c, d, e: میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار در کپک و مخمر (p<۰/۰۵) در همبرگر ندارند.

- اثر غلظت لعل‌کوهستان و زمان بر شمارش *اشریشیا کولای*

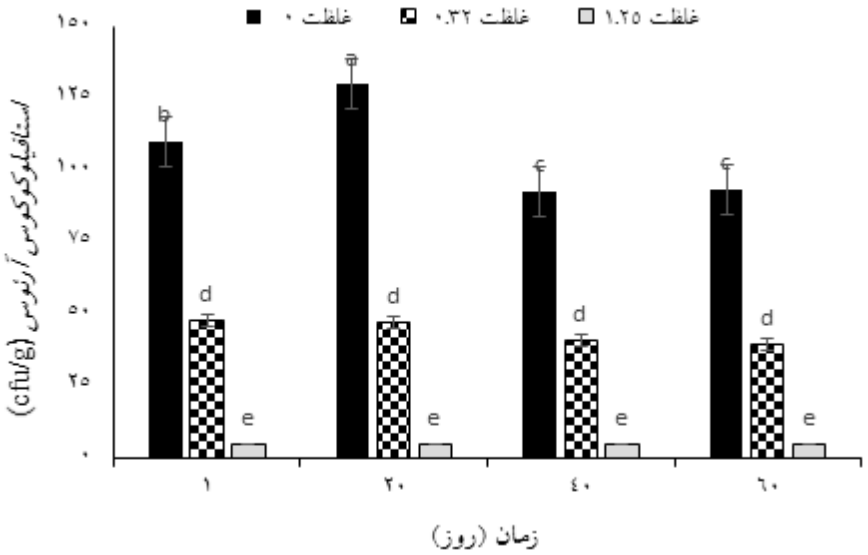
تجزیه واریانس شمارش *اشریشیا کولای* در همبرگر نشان داد که غلظت اسانس لعل‌کوهستان و زمان ماندگاری بر صفت شمارش *اشریشیا کولای* اثر معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۱)، به‌گونه‌ای که تمام نمونه‌ها کاهش *اشریشیا کولای* را نسبت به‌روز اول نشان دادند. همچنین اثر متقابل زمان و غلظت اسانس لعل‌کوهستان برشمارش *اشریشیا کولای* معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). با توجه به نمودار (۳)، تعداد *اشریشیا کولای* در نمونه شاهد و نمونه با غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر برگرم دارای تفاوت معنی‌داری نبود ولی غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم کاهش معنی‌دار تعداد باکتری *اشریشیا کولای* را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد (p<۰/۰۵). با توجه به نمودار (۳)، نمونه‌ها کاهش باکتری *اشریشیا کولای* تا روز بیست را نشان دادند و بعدازآن با افزایش زمان ماندگاری تعداد باکتری تغییر معنی‌داری نداشت. مقایسه میانگین شمارش *اشریشیا کولای* در غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر بر گرم در روزهای مختلف اختلاف معنی‌دار نداشت.



نمودار (۳)- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و غلظت (میکرولیتر بر گرم) اسانس برشمارش *اشریشیا کولای* در همبرگر
a, b, c, d, e: میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار در *اشرشیا کولای* ($p<۰/۰۵$) در همبرگر ندارند.

- اثر غلظت لعل‌کوهستان و زمان‌بر شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*

تأثیر غلظت اسانس لعل‌کوهستان و زمان ماندگاری ($p<۰/۰۱$) و همچنین تأثیر متقابل زمان ماندگاری و غلظت‌های مختلف اسانس برشمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) داشت. همان‌گونه که در جدول (۳) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت اسانس لعل‌کوهستان، *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش معنی‌داری پیدا نمود ($p<۰/۰۱$). با توجه به نمودار (٤)، تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای مختلف، با افزایش غلظت اسانس کاهش معنی‌داری یافت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که در غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم در تمامی زمان‌ها تعداد باکتری در پلیت کمتر از ۱۰ مشاهده شد. نمونه‌های شاهد در روز بیست با افزایش معنی‌دار تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* همراه بود. سپس در روز چهل تعداد باکتری کاهش یافت و تا پایان زمان ماندگاری در روز شصت ثابت بود($p<۰/۰۵$).



نمودار (٤)- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و غلظت (میکرولیتر بر گرم) اسانس برشمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* در همبرگر
a, b, c, d, e: میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، اختلاف معنی‌دار در *استافیلوکوکوس اورئوس* ($p<۰/۰۵$) در همبرگر ندارند.

- ارزیابی حسی

غلظت‌های مختلف اسانس لعل‌کوهستان در همبرگر بعد از سرخ کردن مورد ارزیابی طعم قرار گرفت و امتیازدهی شد. هدف انتخاب بیشترین غلظتی از اسانس موردنظر بود که نسبت به همبرگر شاهد، تغییر طعم معنی‌داری نداشته باشد. در این ارزیابی غلظت ۰/۲۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان در همبرگر در مقایسه با نمونه شاهد تفاوت معنی‌داری در طعم نداشت ولی غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان در همبرگر در آزمون سه‌تایی، اختلاف معنی‌داری با همبرگر شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۵$). طبق نتایج به‌دست‌آمده همبرگر باغلظت ۰/۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان از مطلوبیت بیشتری برخوردار بود (جدول ٤).

جدول(٤)- امتیازدهی آزمون ارزیابی حسی مقایسات چندتایی

تعداد ارزیاب حسی	غلظت اسانس (میکرولیتر بر گرم اسانس)		
	۰/۲۵	۰/۵	۱
۱۰ نفر	۱۷± ۱/۱۲	۱٤ ± ۰/۹۷	۲٦ ± ۱/۳۳

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، اجزای اسانس لعل‌کوهستان شناسایی شد و بیشترین اجزای اسانس شامل ترکیباتی با ماهیت آلدئیدی و سپس فنولی بود. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده هرچقدر مقدار مواد فنولی در اسانس بالاتر باشد، خواص ضدمیکروبی آن بیشتر خواهد بود (Burt,

2004) کـه بـا کـاهش تعـداد *اشـــریشـــیا کولـای*، *اســـتـافیلوکوکوس اورئوس*، شـــمارش کلی و کپک و مخمرهماهنگ بود. ترکیبات کارواکرول و میریستیسین کـه خود نوعی ترکیـب فنولی اســـت نیز از اســـانس لعل‌کوهستان استخراج شد. کارواکرول علاوه بر ممانعت از رشـد سـلول‌های باکتری‌ها، قادر به ممانعت از تولید توکسـین توسط باکتری نیز می‌باشد. احتمالاً مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند سـایر ترکیبات فنولی شامل موارد زیـــر می‌باشـــد: اخـتلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هـم زدن نیـــروی حرکـــت پروتـــونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی (Burt, 2004; Tajkarim *et al*, 2010). از طـرفی تیمول و کـارواکرول بـا فشـــار هیدرواسـتاتیک بالا دارای اثر سـینرژیسـتی هستند. فشار بالا سـبب آسـیب رسـیدن به غشـا سـلولی شـده و به عملکرد اسانس کمک می‌کند (Shahnia and Khaksar, 2013).

در مطالعه حاضـــر، بر اســـاس هر دو روش تعیین حـداقـل غلظت بازدارنده (دیســـک و چاهک)، حداقل غلظت بازدارنده باکتری *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۳۲ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و حـداقل غلظت بازدارنده مربوط به *اشـریشیا کولای* ۰/۶۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌دست آمـد. در مطالعه مشـــابه که به بررســـی اثر تعدادی از اسـانس‌های گیاهی بر باکتری *اسـتافیلوکوکوس اورئوس* در محیط آبگوشـــت قلب و مغز پرداخته شـــده، حداقل غلظت بازدارندگی اسـانس دارچین حدود ۵۰ میکرولیتر بر گرم به‌دسـت‌آمده بود (Oussalah *et al*., 2007). در مطـالعـه حاضـــر نتایج به‌دســـت‌آمده مربوط به حداقل غلظت بازدارنده در هر دو روش چاهک و دیســـک بر هم منطبق بود که با نتایج به‌دست‌آمده در سایر تحقیقات مطابقت داشت (Haji mehdipoor *et al*, 2010).

در این پژوهش، مقـایســـه قطر هـالـه عدم رشـــد باکتری‌ها در روش چاهک و دیسک نشان داد که نسبت قطر هاله عدم رشـــد در روش چاهک نســـبت به روش دیســـک بیشـــتر بود (جـدول ۲). بنـابراین بـاکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد بزرگ‌تر از باکتری *اشریشیا کولای*، نسبت به اسانس لعل‌کوهستان حساس‌تر بوده و اثر اسانس لعل‌کوهستان بر باکتری‌های گرم منفی در مقایسـه با میکروارگانیسـم‌های گرم مثبت کمتر بود. نتایج پژوهش حاضـر با نتایج سـایر محققان مطابقت داشـت (Sadeghi *et al*., 2015; Hoseini *et al*., 2015).

طبق اسـتـانـدارد ایران حـداکثر میزان مجـاز برای شـــمـارش کلی بـاکتری‌ها 10^6 در هر گرم می‌باشـــد (ISIRI, 2304/2007) کـه در این پژوهش، برای تمـام نمونه‌ها در تمام روزهای نگهداری میزان شـــمارش کلی کمتر از این میزان گزارش شـــد. بـا توجـه بـه نتـایج به‌دســـت‌آمده، با افزایش غلظت اســـانس لعل‌کوهســـتان تعداد باکتری شـــمارش‌شـــده کاهش یافت که مطابق با نتایج سایر محققان بود (Hoseini *et al*., 2015). بنابراین اسـانس لعل‌کوهستان بر روی شمارش کلی باکتری تأثیر داشته و این تأثیر با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت. در نمونـه شـــاهـد با افزایش زمان در روز چهل کاهش بیشـــتر تعـداد بـاکتری اتفـاق افتـاد و بـا افزایش زمان ماندگاری در روزهای بعدی کاهش معنی‌داری رخ نداد. ولی در غلظـت‌هـای ۰/۳۲ و ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم در روز بیست کاهش بیشتر تعداد باکتری ملاحظه شد و در روزهای بعدی کاهش معنی‌داری مشـخص نشد. به نظر

می‌رسد کاهش میکروبی طی زمان نگهداری در انجماد به‌دلیل تأثیر اسانس لعل‌کوهستان در جلوگیری از رشد میکروبی از طریق اختلال در غشا سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی (Tajkarim *et al*., 2010) و همچنین کاهش رطوبت همبرگر باشد و بعدازآن در طول زمان نگهداری تعداد شمارش کلی میکروبی ثابت گزارش شد.

طبق استاندارد ایران حداکثر میزان مجاز مجموع کپک و مخمر 10^3 در هر گرم می‌باشد (ISIRI, 2304/2007) که در این پژوهش، در همه نمونه‌ها در تمام دوران نگهداری نمونه تعداد کپک و مخمر کمتر از این تعداد مشاهده شد و با به کاربردن اسانس لعل‌کوهستان این میزان کاهش بیشتری یافت. به‌خصوص غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان کاهش معنی‌داری در میزان کپک و مخمر نسبت به نمونه شاهد در روزهای مختلف نگهداری داشت. بنابراین با توجه به داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که اسانس لعل‌کوهستان در جلوگیری از رشد کپک و مخمر نقش به سزایی دارد. با پیشرفت زمان در روز چهل در نمونه شاهد و نمونه با غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر برگرم کاهش معنی‌داری نسبت به‌روز اول وجود داشت و با افزایش زمان ماندگاری در روزهای بعدی کاهش بیشتری مشاهده نشد اما نمونه با غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم در طی دوران نگهداری به دلیل عدم وجود کلنی در پلیت کاهش معنی‌داری نداشت.

طبق استاندارد ایران حداکثر میزان مجاز *اشریشیا کولای* ۵۰۰ در هر گرم نمونه می‌باشد (ISIRI, 2946/2005) که در این بررسی در همه نمونه‌ها در تمام روزهای نگهداری بسیار کمتر از این میزان گزارش شد. در این پژوهش مشاهده شد که تعداد *اشریشیا کولای* در نمونه شاهد و نمونه با غلظت ۰/۳۲ میکرولیتر بر گرم دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشد ولی غلظت ۱/۲۵ میکرولیتر بر گرم کاهش معنی‌دار تعداد باکتری *اشریشیا کولای* را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. در حقیقت با افزایش غلظت اسانس، کارواکرول و تیمول موجود در اسانس لعل‌کوهستان افزایش‌یافته و این ترکیبات قادر بودند که غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی را متلاشی کرده و سبب خارج شدن لیپوپلی‌ساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی شوند (Shahnia and Khaksar, 2013). نمونه‌ها کاهش باکتری *اشریشیا کولای* تا روز بیست را نشان دادند و بعدازآن با افزایش زمان ماندگاری تعداد باکتری تغییر معنی‌داری نداشت. مکانیسم اثر ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به خاصیت آب‌گریزی آن‌ها برمی‌گردد که موجب نفوذ این مواد به فسفولیپیدهای غشای باکتری و میتوکندری‌ها شده و سبب اختلال در ساختمان آن‌ها و افزایش نفوذپذیری می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی شده که درنهایت مرگ باکتری را در بر خواهد داشت (Burt, Sadeghi *et al*., 2015; 2004). هرچقدر مقدار مواد فنولی در اسانس بالاتر باشد، خواص ضدمیکروبی آن بیشتر می‌شود (Burt, 2004).

طبق استاندارد ایران حداکثر میزان مجاز شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* 10^3 در هر گرم می‌باشد (ISIRI, 2304/2007) که در این بررسی در همه نمونه‌ها در تمام روزهای نگهداری بسیار کمتر از این میزان گزارش شد. اغلب مطالعات انجام‌شده در خصوص

اثـر اسـانس‌ها بر ارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژن‌های غـــذازاد نشان می‌دهند که اثر اســـانس‌های گیاهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت قـدری بیشـتر از تأثیر آن‌ها بـــر روی باکتری‌های گرم منفی اسـت. به‌عبارت‌دیگر گـرم مثبـت‌هـا نسبت به اثر آنتی‌باکتریـال اسـانس‌هـا حسـاس‌تر هستنـد. علـت حساسیت کمتر گرم منفی‌هـا شـاید بـه علـت وجـود غشـاء خارجی در باکتری‌های گرم منفی باشـد کـه سـبب محـدود شدن انتشار اجـزاء هیـدروفوبیک اســانس بـــه لایـــه لیپـــو پلی‌ساکارید می‌شـــود (Burt, 2004). بـا توجـه بـه نتـایج، تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در روزهای مختلف، با افزایش غلظت اســانس کاهش معنی‌داری یافت، به‌طوری‌که در غلظـت ۱/۲۵ میکرولیتر برگرم در تمـامی زمان‌ها تعداد باکتری در پلیت کمتر از ۱۰ گزارش شـد. تمام نمونه‌ها در روز بیســـت بـا افزایش معنی‌دار تعـداد بـاکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* همراه بود. سپس در روز چهل تعـداد باکتری کاهش یافت و تا پایان زمان ماندگاری در روز شصت ثابت بود که البته این روند برای نمونه شاهد نسـبت به سـایر نمونه‌ها معنی‌دار بود. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش مطـابق بـا یافته‌های ســـایر محققین بود (Amin *et al.*, 2018). روند افزایشـــی اولیه ناشـــی از حضـور آب، چربی، پروتئین و محتوای املاحی است که بـه‌طور بـدیهی در مواد غـذایی فراوری‌شـــده همچون همبرگر یـافـت شـــده و مقـاومـت میکروبی را افزایش می‌دهند. دلیل دیگری که می‌توان دراین‌ارتباط ذکر نمود، مقاوم بودن این باکتری در برابر انجماد است (Yousefli *et al.*, 2011).

در اسـتفاده از اسـانس‌های گیاهی به‌عنوان مواد ضد بـاکتریـایی در مواد غـذایی، اثرات ارگانولپتیک آن‌ها نیز باید موردتوجه قرار گیرد. غلظت‌های مختلف اســـانس لعـل‌کوهســـتـان در همبرگر بعد از ســـرخ کردن مورد ارزیابی طعم قرار گرفت و امتیازدهی شد. هدف انتخاب بیشـترین غلظتی از اسـانس موردنظر بود که نسـبت به همبرگر شـاهد، تغییر طعم معنی‌داری نداشـته باشـد. در این ارزیـابی غلظـت ۰/۲۵ میکرولیتر بر گرم اســـانس لعل‌کوهستان در همبرگر در مقایسه با نمونه شاهد دارای تفاوت معنی‌داری در طعم نبود ولی غلظت‌های ۱ و ۰/۵ میکرولیتر بر گرم اســانس لعل‌کوهســتان در همبرگر در آزمون سـه‌تایی، اختلاف معنی‌داری داشـتند ($p<۰/۰۵$). اســـانس‌هـا و مواد مؤثره آن‌ها اگرچه به‌عنوان GRAS پذیرفته‌شـــده‌اند اما اســـتفاده از آنها به علت طعمی که ایجـاد می‌کننـد محـدود اســـت و در برخی موارد قابل‌پذیرش نمی‌باشد (Shahnia and Khaksar, 2013). بر طبق نتایج به‌دســت‌آمده همبرگر با ۰/۵ میکرولیتر بر گرم اسانس لعل‌کوهستان از مطلوبیت بیشتری برخوردار بود، بنـابراین اســـتفاده از این گیاه در همبرگر نه‌تنها بر طعم اثر بد نداشـته بلکه باعث بهبود طعم نیز شـده بود، البتـه ازآنجـایی‌کـه در این پژوهش هـدف بررســـی اثر لعل‌کوهســـتان بود، در فرمولاســـیون همبرگر از حداقل ترکیبات طعم‌دهنده اسـتفاده شـد و درصـورتی‌که قرار باشـد از ۱ میکرولیتر بر گرم لعل‌کوهسـتان استفاده شود می‌توان بـا افزایش ادویـه، طعم غالب لعل‌کوهســـتان را پوشـاند. بررسی مطالعات سایر محققین نیز نشان داد که فیلـه‌های گوشـــت گوســـاله که با ۸ میکرولیتر بر گرم اسانس پونه کوهی تیمار شده بودند پس از نگهداری در دمـای ۵ درجه ســـلســـیوس و پختن، طعم قابل قبولی داشت (Shahnia and Khaksar, 2013).

همان‌طور که ذکر شد کاربرد مواد ضدباکتری با منشأ شیمیایی اگرچه در حفظ کیفیت، افزایش ماندگاری و کاهش خسارت‌های اقتصادی محصول مفید هستند ولی ارزش سلامت آن را کاهش می‌دهد (Movahhed, 2011). در این راستا، استفاده از اسانس‌ها ازجمله اسانس لعل‌کوهستان به‌عنوان ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی روشی مؤثر برای کنترل حضور باکتری‌های بیماری‌زا و نیز افزایش ماندگاری غذاهای فرآوری شده به نظر می‌رسد (Baydarh *et al*., 2004). یافته‌های پژوهش حاضر مبنی بر این بود که افزودن اسانس لعل‌کوهستان به همبرگر خواص ضدمیکروبی قابل توجهی داشته است. همچنین اسانس لعل‌کوهستان سبب کاهش میزان شمارش کلی و همچنین میزان رشد باکتری‌های *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و کپک و مخمر نسبت به محدوده تعیین‌شده توسط اداره استاندارد شد. با توجه به نتایج ارزیابی حسی انجام‌گرفته پیشنهاد می‌شود این اسانس در سطح ۰/۵ میکرولیتر بر گرم به‌عنوان یک افزودنی طبیعی با خاصیت ضدمیکروبی در مواد غذایی برای بهبود طعم به محصول همبرگر اضافه شود. توصیه می‌گردد که درباره استفاده از غلظت‌های متفاوت اسانس لعل‌کوهستان بر روی همبرگر با ترکیب ادویه‌های متفاوت تحقیقات بیشتری انجام شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Adams, R.P. (2007). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectrometry. 4th Edition, Allured Publishing Corporation, USA. pp. 100-804.
- Amin, M., Nikoopour, H. and Fazeli, M.R. (2018). A Survey of antibacterial effects of oliveria decumbens and nepeta binaludensis essential oils on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in doogh. Journal of Medicinal Plants, 69(18): 134-149.
- Amin, G., Salehi Sourmaghi, M.H., Zahedi, M., Khanavi, M. and Samadi, N. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of oliveria decumbens. Fitoterapia, 76(7): 704-707.
- Baydar, A., Sagdiç, O. and Zkan, G. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from origanum, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in turkey. Food Control, 15(3): 69-172.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology, 94(3): 223-253.
- Fernandez Gines, J., Fernandez Lopez, J., Sayas Barbera, E. and Perez Alvarez, J.A. (2005). Meat products as functional food. Journal of Food Science, 70(2): 37-43.
- Haji mehdipoor, H., Samadi, N., Mozaffarian, V., Rahimifard, N., Shoeibi, S. and Pirali Hamedani, M. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of oliveria decumbens volatile oil from west of Iran. Journal of Medicinal Plants, 9(6): 39-44.

- Hoseini, S.E., Shabani, S. and Delfan Azari, F. (2015). Antimicrobial properties of clove essential oil on raw hamburger during storage in freezer. Food Hygiene, 5(1): 67-76. [in Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2007). Raw frozen Hamburger-Specifications. 2nd revision, ISIRI No. 2304. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2005). Microbiology of food and animal feeding stuffs -Detection and enumeration of presumptive Escherichia coli -Most probable number technique. 2nd revision, ISIRI No. 2946. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2001). Standard methods for reparation of food samples and enumera of microobganisms in food. 1nd revision, ISIRI No. 356. [In Persian]
- International Organization for Standardization (ISO), (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase- positive Staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. 1nd revision, ISO No. 6888-1.
- International Organization for Standardization (ISO), (2008). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds- part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. 1nd revision, ISO No. 21527-1.
- International Organization for Standardization (ISO), (2013). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30°c by the pour plate technique. 1nd revision, ISO No. 4833-1.
- Kramer, A.D. and Twigg, B.A. (1966). Fundamentals of Quality Control for the Food Industry. 2th Edition, Avi Publishing Company, Michigan. pp. 1-541.
- Movahhed, S. (2011). Meat Science. 1th Edition, Marze Danesh, Tehran. pp. 1-177. [in Persian]
- Motamedi, H., Darabpour, E., Gholipour, M. and Seyyed Nejad, S.M. (2010). Antibacterial effect of ethanolic and methanolic extracts of plantago ovata and oliveria decumbens endemic in Iran against some pathogenic bacteria. International Journal of Pharmacology, 6(2): 117-122.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacotrix, M. (2007). Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control, 18(5): 412 – 414.
- Sadeghi, E., Dargahi, A., Mohammadi, A., Asadi, F. and Sahraee, S. (2015). Antimicrobial effect of essential oils: a systematic review. Food Hygiene, 5(2): 1-30. [in Persian]
- Shahnia, M. and Khaksar, R. (2013). Antimicrobial effects and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) methods of essential oils against pathogenic bacteria. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 7(5): 949-955. [in Persian]
- Tajkarim, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9): 1199-1218.
- The International NGO Safety Organisation (INSO), (2016). Raw frozen hamburger – Specifications and test methods. 4nd revision, INSO 2304.
- Torbati, M.A., Javadi, A., Saderi Oskui, H. and Tavakoli, F. (2011). Study of microwave and frying process on hamburger microbial properties. Food Hygiene, 3(1): 47-86. [in Persian]

- Yousefli, M., Hosseini, Z., Haddad Khodaparast, M.H., Azarnivand, H. and Pezeshki, P. (2011). Antimicrobial effect of *Salvia leriifolia* leaf extract powder against the growth of Staphylococcus aureus in hamburger. Journal of Food Science and Technology, 29(8): 126-136. [in Persian]