اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA) بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت و پنیر سفید ایرانی

علی احسانی[1]، مجتبی رئیسی[2*]، علیجان تبرایی[3]، فرهاد نیک نژاد[4]، حسین نقیلی[1]، مجید امین زارع[1]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران.
۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران.
۴. مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گلستان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *Raeisi.mojtaba@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۶

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به‌صورت تنها و توأم با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط کشت و در پنیر سفید ایرانی بود. در مرحله اول مطالعه، حداقل غلظت ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر روی باکتری‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. نمونه‌های پنیر تهیه شده از شیر پاستوریزه در یک گروه شاهد و سه گروه تیمار به‌صورت تجربی با *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* آلوده شدند. نمونه‌های تیمارها دارای مقادیر ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی و مقادیر ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول توام با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بودند. در مرحله بعد باکتری‌های مورد نظر در روزهای مختلف شمارش شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد در صورت استفاده از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول توام با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، تعداد باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* موجود در محیط کشت و همچنین در مدل پنیر سفید ایرانی به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یابد. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول برای افزایش مدت زمان ماندگاری پنیر سفید ایرانی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم*، پنیر سفید ایرانی.

مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت، تهیه غذای کافی و سالم یکی از موضوعات قابل توجه و بسیار مهم به‌شمار می‌رود. از طرف دیگر، نیاز به افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی موجب توسعه و بهبود روش‌های مؤثر در حفاظت و نگهداری مواد غذایی شده است. اگرچه امروزه شرایط بهداشتی مربوط به تولید و نگهداری مواد غذایی بهبود یافته است، اما هنوز روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی نتوانسته بیماری‌های با منشاء مواد غذایی را به‌طور کامل محدود نماید (Kabara, 1981). کنترل میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی یکی از مسائل مورد توجه میکروب شناسان مواد غذایی می‌باشد و این کنترل برای جلوگیری یا کاهش فساد مواد غذایی و همچنین کاهش و حذف عوامل بیماری‌زا ضروری می‌باشد. فرآورده‌های لبنی به‌دلیل غنی بودن از مواد غذایی مانند لاکتوز، چربی، پروتئین-های کازئین و پروتئین‌های آب پنیر، از فساد پذیری بالایی برخوردار می‌باشند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۶). پنیر سفید ایرانی جزو پنیرهای نرم می‌باشد که در آب نمک نگهداری شده و دوره رسیدن را طی می-کند. این پنیرها دارای طعم نمکی، کمی اسیدی و دارای خصوصیات مطبوع ارگانولپتیکی هستند و بیش‌تر در ایران و برخی از کشورهای آسیایی تولید می‌شوند

(کریم، ۱۳۸۰). بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA)[1] و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن (BHT)[2] از دسته آنتی-اکسیدان‌های ساختگی هستند که به‌دلیل وجود گروه-های فنلی دارای اثر ضد میکروبی نیز می‌باشند. فعالیت ضد میکروبی آنتی‌اکسیدان‌ها وابسته به حضور یک گروه هیدروکسیل بر روی آن و قابلیت حل شدن در چربی می‌باشد. غلظت مؤثر آنتی‌اکسیدان‌های فنلی دارای اثر ضد میکروبی، ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد و اثر ضد میکروبی آنتی‌اکسیدان‌های فنلی به‌واسطه اثر بر روی عمل و ساختمان غشاء سلولی، تشکیل ژنوم، پروتئین و چربی و فعالیت میتوکندری می‌باشد. این ترکیبات دارای وزن مولکولی پائین بوده و ترکیب فنلی آن‌ها حاوی ۱ تا ۳ گروه هیدروکسیل می‌باشد (Ayaz et al., 1980). لازم به-ذکر است که فعالیت بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با افزایش درجه حرارت، انجماد، مواد اسیدی کننده و مواد شلاته کننده مانند اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA)[3] به‌دلیل اینکه میزان دسترسی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به غشاء سیتوپلاسمی افزایش می‌یابد، بیشتر می‌شود (Al khayat et al., 1987). اتیلن دی آمین تترا استیک اسید شلاته کننده مواد غذایی محسوب می‌شود که تأثیر نگهدارنده‌هایی مانند بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول را قوت می‌بخشد و به‌عنوان بازدارنده اکسیداسیون عمل می‌کند. همچنین حساسیت باکتری‌های گرم منفی به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نایسین و ریفامپین را افزایش می‌دهد (Mclay, 2002). عوامل میکروبی زیادی در مواد غذایی یافت می‌شوند که *سالمونلا تیفی موریوم*[4] و *لیستریا مونوسیتوژنز*[5] از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند. *سالمونلا* قادر به رشد در تمام مواد غذایی است و البته گوشت قرمز، ماهی، تخم مرغ و به‌ویژه فرآورده‌های حاصل از شیر را بیش‌تر آلوده می‌کند (Jay, 2000; Razavi Rohani and Griffiths, 1994). *لیستریا مونوسیتوژنز* بطور وسیعی در طبیعت انتشار دارد و بر روی گیاهان، خاک، مدفوع حیوانات، فاضلاب و آب یافت می‌شود. این ارگانیسم معمولاً در شیر خام، پنیر نرم، گوشت تازه و منجمد و فرآورده‌های دریایی قادر به رشد و ایجاد بیماری می‌باشد. از مهم‌ترین این بیماری-ها مننژیت، سپتی سمی و سقط جنین و همچنین گاستروآنتریت را می‌توان نام برد (Baron et al., 1994). پیش از این مطالعاتی در زمینه استفاده از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول علیه برخی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت صورت پذیرفته است (Davidson and Branen, 1993; Erickson and Tompkin, 1997). اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر برخی از باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* و گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* قبلا مورد مطالعه قرار گرفته است (Brannen et al., 1994). مطالعه حاضر با هدف مطالعه اثر ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به‌صورت تنها و توام با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر روی باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* در محیط کشت و همچنین در مدل پنیر سفید ایرانی انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۹ در بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در دو مرحله مورد انجام قرار گرفت. در مرحله اول، اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر روی باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* در محیط کشت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله دوم، پس از تهیه پنیر سفید ایرانی، اثر ضد

1. Butylated Hydroxy Anisole
2. Butylated Hydroxy Toluene
3. Ethylen Diamine Tetra Acetic acid
4. *Salmonella typhimurium*
5. *Listeria monocytogens*

میکروبی موارد فوق بر روی *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* بررسی شد. بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید استفاده شده، ساخت شرکت سیگما بود و محلول پایه آن‌ها به‌وسیله حل کردن بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در الکل اتیلیک و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در آب مقطر تهیه گردید. مایه پنیر مورد استفاده با منشاء میکروبی و ساخت کشور ژاپن بوده و برای تولید پنیر، از ۳ لیتر شیر و میزان ۱۵ میلی‌لیتر مایه پنیر پس از حل شدن در آب مقطراستفاده شد. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده، *سالمونلا تیفی موریوم* (ATCC1730) و *لیستریا منوسایتوژنز* (ATCC 19118) بود که به‌منظور شناسایی و کشت آن‌ها از محیط‌های کشت (مرک، آلمان) *سالمونلا شیگلا آگار*[1] برای *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا کروم آگار*[2] برای *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده شد. در مرحله اول مطالعه، اثر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌صورت آزمایشگاهی روی باکتری‌های مورد نظر، بررسی شد. بدین منظور پس از تهیه دو سری ۶ تایی لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز[3]، میزان ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰،۸۰۰، ۱۶۰۰و ۳۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به آن‌ها اضافه شد و پس از آن به هر سری ۶ تایی از لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز، ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های فوق به‌صورت مجزا تلقیح گردید. پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد ماده ضد میکروبی تعیین گردید. برای بررسی اثر توام بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر روی باکتری‌های مورد اشاره، همانند روش ذکر شده در بالا، میزان ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر یک از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌طور مساوی، در سری لوله‌های حاوی محیط مایع قلب مغز اضافه گردید و پس از اضافه نمودن باکتری‌های فوق و گرم‌خانه گذاری ۲۴ ساعته، میزان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد تعیین گردید. لازم به ذکر است که در یک لوله که به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد، فقط باکتری‌های مورد نظر تلقیح گردید و از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در آن استفاده نشد. در مرحله دوم مطالعه اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای تهیه پنیر سفید ایرانی، پس از پاستوریزاسیون شیر میزان ۱/۵ گرم کلرور کلسیم پس از حل شدن در سرم فیزیولوژی به شیر اضافه گردید و سپس برای بررسی اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، ۷ بشر برای هر باکتری در نظر گرفته شد که در مرحله اول میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر از شیر پاستوریزه در هر یک از بشرها ریخته شد، بدین صورت که بشر شماره یک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در آن هیچ ماده ضد میکروبی اضافه نگردید و در بشرهای شماره دو تا چهار به‌ترتیب میزان ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و در بشرهای شماره ۵ تا ۷ به‌ترتیب میزان ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌صورت توام اضافه گردید. در مرحله بعد در همه ۷ بشر در نظر گرفته شده برای هر کدام از باکتری‌ها، میزان ۱ میلی لیتر از رقت 10^{7} باکتری‌ها به‌صورت مجزا تلقیح گردید و در مرحله بعد مایه پنیر به میزان ۰/۳ درصد به هر بشر اضافه شد. پس از انعقاد شیر و تولید لخته، محتویات هر کدام از بشرها آب‌گیری شد و لخته‌های تشکیل شده تحت

1. Salmonella Shigella Agar
2. Listeria Chrome Agar
3. BHI Broth

فشار قرار گرفتند. در نهایت پس از شماره گذاری، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در روزهای ۰، ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ نمونه برداری و شمارش کلنی باکتری‌های مورد نظر با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که هر یک از آزمایشات انجام شده در این مطالعه در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

در این مطالعه در مرحله‌ی اول اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در محیط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر روی باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* به‌ترتیب، ۳۲۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. همچنین حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسایتوژنز* به‌ترتیب ۱۶۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. در مرحله‌ی دوم اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید بر روی باکتری‌های مورد مطالعه در پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی در جداول ۱ تا ۴ درج شده است. بر اساس نتایج، بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به‌صورت تنها اثر کمی در مهار رشد سالمونلا دارد ولی همراه با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید اثر ضد میکروبی آن به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظت بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید اثر ضد میکروبی آن‌ها به‌طور معنی داری افزایش می‌یابد ($P<0.05$).

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد میکروبی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در محیط کشت و پنیر سفید ایرانی بود. این ماده آنتی‌اکسیدان فنلی می‌باشد که دلیل استفاده از آن در مواد غذایی به تاخیر انداختن اکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع می‌باشد. بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول این عمل را با دادن اتم هیدروژن به رادیکال آزاد و به تعویق انداختن واکنش‌های زنجیره‌ای لیپیدها انجام می‌دهد (Al khayat et al., 1987). در مطالعه حاضر مشخص گردید که بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول اثر ضد میکروبی نسبتاً مناسبی بر روی باکتری گرم مثبت مورد آزمایش دارد به‌طوری‌که حداقل غلظت ممانعت از رشد آن برای *لیستریا مونوسیتوژنز* ۸۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به‌دست آمد. این در حالی است که اثر آن بر روی باکتری گرم منفی مورد مطالعه محدود بوده و این نتیجه با سایر مطالعات هم‌خوانی دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۸۰ صورت گرفت، حداقل غلظت ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر باکتری‌های گرم مثبت در حدود ۲۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده درحالی‌که برای باکتری-های گرم منفی در حدود ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عنوان شده است (Kabara, 1980). در مطالعه دیگری که در سال ۱۹۹۷ انجام گرفت مشخص گردید بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و بوتیلیتید هیدروکسی تولوئن در مقدار بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری میزان کلی فرم مدفوعی موجود در گوشت گاو سرد شده را کاهش می‌دهد، درحالی‌که میزان باکتری‌های فلور عامل فساد توسط آن کاهش نمی‌یابد. بر اساس نتایج این مطالعه، هر چه میکروارگانیسم‌های عامل فساد بیشتر از سویه-های گرم منفی باشند حساسیت کمتری به آنتی-اکسیدان‌های فنلی نشان می‌دهند که این اثر بر اساس سویه و تعداد باکتری‌ها متفاوت می‌باشد (Erickson and Tompkin, 1997). همانطور که ذکر گردید حداقل غلظت ممانعت از رشد بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم ۳۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. علت اثر کم‌تر آن بر روی باکتری‌های گرم منفی وجود لایه لیپو پلی

ساکاریدی در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی عنوان شده است. این لایه باعث می‌شود بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی نتواند اثر مناسبی بر روی باکتری‌های گرم منفی ایجاد نماید. برخی گزارشات *استافیلوکوکوس اورئوس* را به‌عنوان حساس‌ترین باکتری به بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول معرفی نموده‌اند و عنوان شده که برای ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی غلظت بیش‌تری از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول نیاز می‌باشد (Brannen et al., 2000).

جدول ۱- جمعیت *سالمونلا تیفی موریوم* (Log_{10} CFU/g) در طی ۹ روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط وجود BHA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA	۰	۱	۳	۵	۷	۹
کنترل	۷/۵۷±۰/۱۵^{CD}	۹/۸±۰/۱۰^{BCD}	۱۰/۳۷±۰/۲۵^{BCD}	۱۰/۷۷±۰/۰۶^{BCD}	۱۱/۱۷±۰/۱۲^{BCD}	۱۲/۲۷±۰/۱۵^{BCD}
۲۵۰۰	۷/۱۳±۰/۱۵	۸/۶۷±۰/۱۲^{CD}	۹/۴۳±۰/۱۵^{ACD}	۹/۸±۰/۱۰^{ACD}	۹/۹±۰/۲۰^{ACD}	۱۱/۱±۰/۱۰^{ACD}
۵۰۰۰	۷/۰۳±۰/۰۶^{A}	۸/۵۷±۰/۱۵^{AD}	۸/۴۳±۰/۱۲^{ABD}	۷/۷۷±۰/۱۲^{ABD}	۷/۶۷±۰/۱۲^{ABD}	۸/۶±۰/۱۰^{ABD}
۱۰۰۰۰	۶/۷۳±۰/۰۶^{A}	۸/۰۳±۰/۰۶^{ABC}	۷/۳۷±۰/۱۵^{ABC}	۷/۰۷±۰/۲۱^{ABC}	۶/۸±۰/۱۰^{ABC}	۷/۶۳±۰/۱۲^{ABC}

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۲- جمعیت *سالمونلا تیفی موریوم* (Log_{10} CFU/g) در طی ۹ روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط همراهی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA در دمای ۴ درجه سانتی گراد

	مدت زمان نگهداری پنیر (روز)					
BHA+EDTA	۰	۱	۳	۵	۷	۹
کنترل	۷/۵۷±۰/۱۵^{BCD}	۹/۸±۰/۱۰^{BCD}	۱۰/۳۷±۰/۲۵^{BCD}	۱۰/۷۷±۰/۰۶^{BCD}	۱۱/۱۷±۰/۱۲^{BCD}	۱۲/۲۷±۰/۱۵^{BCD}
۲۵۰۰	۶/۹۷±۰/۰۶^{AD}	۷/۲±۰/۱۰^{AD}	۷/۲۷±۰/۱۲^{AD}	۷/۱۰±۰/۱۷^{ACD}	۶/۹±۰/۱۷^{AD}	۶/۶۷±۰/۲۱^{ACD}
۵۰۰۰	۶/۹۳±۰/۱۲^{A}	۷/۰۷±۰/۱۵^{AD}	۶/۸۷±۰/۱۵^{AD}	۶/۷±۰/۱۰^{ABD}	۶/۳۳±۰/۰۶^{A}	۶/۰۳±۰/۱۲^{AB}
۱۰۰۰۰	۶/۵۷±۰/۲۱^{AB}	۶/۱۳±۰/۱۲^{ABC}	۶/۰۳±۰/۱۰^{ABC}	۶±۰/۱۵^{ABC}	۵/۸±۰/۱۷^{AB}	۵/۶۳±۰/۲۱^{AB}

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر BHA و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵)

جدول۳- رفتار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* (Log_{10} CFU/g) در طی ۹ روز نگهداری پنیر سفید ایرانی در شرایط وجود BHA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA	۰	۱	۳	۵	۷	۹
کنترل	۷/۲۳±۰/۱۵^{D}	۷/۹±۰/۱۲^{BCD}	۸/۷±۰/۲۰^{BCD}	۹/۱۳±۰/۱۲^{BCD}	۱۰/۱۷±۰/۲۱^{BCD}	۱۰/۷۷±۰/۱۵^{BCD}
۲۵۰۰	۷/۱±۰/۱۰	۷±۰/۱۰^{AD}	۶/۹±۰/۴۰^{AD}	۶/۸±۰/۱۰^{AD}	۶/۸۵±۰/۱۲^{ACD}	۶/۵۷±۰/۰۶^{ACD}
۵۰۰۰	۷/۰۳±۰/۱۵	۶/۸۳±۰/۰۶^{AD}	۶/۶۳±۰/۱۲^{AD}	۶/۲±۰/۲۰^{A}	۶±۰/۲۰^{AB}	۵/۹±۰/۱۵^{AB}
۱۰۰۰۰	۶/۷۵±۰/۲۱^{A}	۶/۳۵±۰/۰۶^{ABC}	۵/۹۳±۰/۰۶^{ABC}	۵/۹±۰/۱۷^{AB}	۵/۶۵±۰/۰۶^{AB}	۵/۴۷±۰/۱۵^{AB}

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۴- رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* (Log_{10} CFU/g) در طی ۹ روز نگهداری پنیر سفید در شرایط همراهی BHA و EDTA در دمای یخچال

	مدت زمان نگهداری پنیر(روز)					
BHA+EDTA	۰	۱	۳	۵	۷	۹
کنترل	۷/۲۳±۰/۱۵^{BCD}	۷/۹±۰/۱۲^{BCD}	۸/۷±۰/۲^{BCD}	۹/۱۳±۰/۱۲^{BCD}	۱۰/۱۷±۰/۲۱^{BCD}	۱۰/۷۷±۰/۱۵^{BCD}
۲۵۰۰	۶/۶۷±۰/۱۰^{ACD}	۶/۱۷±۰/۱۰^{AD}	۶±۰/۴۰^{AD}	۵/۸±۰/۱۰^{ACD}	۵/۷±۰/۱۲^{AD}	۶/۶۵±۰/۰۶^{ACD}
۵۰۰۰	۶/۲۵±۰/۱۵^{AB}	۵/۸۵±۰/۰۶^{A}	۵/۷±۰/۱۲^{A}	۵/۳±۰/۲۰^{AB}	۵/۲۵±۰/۲۰^{AD}	۵/۱±۰/۱۵^{ABD}
۱۰۰۰۰	۵/۹۵±۰/۲۱^{AB}	۵/۷۵±۰/۰۶^{AB}	۵/۳۳±۰/۰۶^{AB}	۵/۱±۰/۱۷^{AB}	۴/۶۵±۰/۰۶^{AB}	۴/۲±۰/۱۵^{ABC}

حرف A نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف B نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۲۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف C نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر BHA و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵).
حرف D نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار با گروه دارای۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و EDTA می‌باشد (P<۰/۰۵)

در بررسی دیگری در سال ۱۹۹۳ مشخص شد که برخی از باکتری‌های گرم منفی مانند *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *سودوموناس فلورسنس* ممکن است حساسیت بیشتری را به بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول نشان دهند (Davidson and Branen, 1993). در مطالعه حاضر زمانی‌که از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌صورت توام با بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول استفاده گردید، اثر ضد میکروبی آن بر روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. علت اثر بیشتر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در زمان استفاده توام با اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، اثر شلاته کنندگی آن می‌باشد که باعث می‌شود که با کاتیون‌های ارتباط دهنده که بین لایه لیپوپلی ساکاریدی و پپتیدوگلیکان وجود دارند ترکیب شده و این اتصالات محکم را از بین برده و منجر به سست شدن لایه لیپوپلی‌ساکاریدی که در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی وجود دارد شود. این امر در نهایت با افزایش نفوذپذیری آن، دسترسی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول را به غشاء سیتوپلاسمی آسان می‌سازد. لازم به ذکر است که حداقل غلظت ممانعت از رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* نیز در زمان همراه نمودن اتیلن دی آمین تترا استیک اسید با بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول کاهش یافت. در مطالعه‌ی حاضر همچنین اثر ممانعت کنندگی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به تنهایی و به همراه اتیلن دی آمین تترا استیک اسید در شیر پاستوریزه تلقیح شده با باکتری‌های *سالمونلا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان دهنده اثر ناکافی بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به‌صورت تنها در مهار رشد سالمونلا و اثر مناسب آن در مهار رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌باشد و این در حالی است که استفاده‌ی توام از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید باعث ایجاد اثر مناسب در مهار رشد *سالمونلا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* شده است. این افزایش اثر در مورد سالمونلا به‌صورت چشمگیر و معنی‌دار بوده است. نکته دیگر این است که زمانی‌که آنتی‌اکسیدان‌های فنلی در حداقل غلظت‌های ممانعت کنندگی به کار می‌روند حضور چربی در غذا اثر این آنتی‌اکسیدان‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. لذا اثر بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات کم‌چرب موثرتر از محصولات پرچرب می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۸ صورت گرفت، عنوان گردید جمعیت اولیه ۳ نوع سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* در پنیر با استفاده از مصرف بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش چشمگیری نیافت و این‌گونه نتیجه گیری شد که چربی غذا باعث کاهش خاصیت ضد میکروبی آنتی‌اکسیدان‌های فنلی شده باشد (Paradu et al.,1998). با توجه به‌اینکه وسعت عمل مواد نگهدارنده مجاز به تنهایی محدود بوده و استفاده از مقادیر بالاتر نیز خالی از خطر نیست، استفاده توام از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول با مواد ضد

میکروبی دیگر مانند اتیلن دی آمین تترا استیک اسید به‌منظور افزایش قدرت ضد میکروبی و همچنین کاهش میزان مورد استفاده از هر کدام می‌تواند بسیار مهم و تأثیر گذار باشد. این مطالعه نشان داد که می‌توان از بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول به همراه اتیلن دی آمین تترا استیک اسید جهت کاهش رشد باکتری‌های پاتوژن و افزایش طول عمر نگهداری پنیر سفید ایرانی استفاده نمود.

منابع

۱. کریم، گیتی. (۱۳۸۰). شیر و فرآورده‌های آن. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران، صفحه ۶۲۰.

۲. مرتضوی، علی.، دزیانی، مسعود.، عزتی، رقیه و عرب، حسن. (۱۳۸۶). تولید و کاربرد پروتئین آب پنیر در صنایع غذایی. انتشارات پریور، صفحه ۴۸۵.

3. Al khayat, M.A., Blank, G., and Biliaderis, C. 1987. Germination and outgrowth of *Bacillus suibtilis* spores in the presence of selected antioxidants. J Food Protect. 8: 50-57.
4. Ayaz, M., Luedecke, L.O., and Branen, A.L. 1980. Antimicrobial effect of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Food Protect. 4: 43-47.
5. Baron, E.J.O., Peterson, L.R., and Finegold, S.M. 1994. Baily and Scotts Microbiology. Toronto, Mosby, Canada.
6. Brannen, A.L., Davidson, P.M., and Katz, B. 2000. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. Food Technol. 934: 42-45.
7. Davidson, P.M., and Branen, A.L. 1993. Antimicrobial in foods. 2ed Ed. Marcel Dekker, New York, pp. USA.
8. Erickson, D.K., and Tompkin, RB. 1997. Antimicrobial and antirancidity agents. Environ Microbiol. 44: 604-617.
9. Jay, M.J. 2000. Modern Food Microbiology. 2ed Ed. Aspen Publishers, New York, pp. USA.
10. Kabara, J.J. 1980. Grass antimicrobial agents for cosmetic products. Cosmetic Chem. 37: 65-70.
11. Kabara, J.J. 1981. Food grade chemicals for use in designing food preservatives. J Food Protect. 44: 633-647.
12. Mclay, J.K. 2002. The effect of monolourin and lactoproxidase on *E.coli* O157:H7. Int J Food Microbiol. 73: 11-19.
13. Paradu, J.L., Chirife, J., and Magrimi, R.C. 1998. Effect of BHA and BHT and Potassium sorbate on growth of Staphylococcus aureus in a model system and process cheese. J Food Protect. 45: 1108-1111.
14. Razavi Rohani, S.M., and Griffiths, M.W. 1994. The effect of mono and polyglycerol laurate in spoilage and pathogenic bacteria association with foods. Food Microbiol. 16: 59-74.