

بررسی اثر اسانس رزماری بر روی روند رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ آماده تجارتي

کامران جعفرزاده خالدی^۱، مهزاد آقازاده مشگی^{۲*}، انوشه شریفان^۳، کامبیز لاریجانی^۴

Investigation of effect of the Rosemary essential oil on growth of *Staphylococcus aureus* in commercial instant soup

Jafarzadeh Khaledi, K.¹, Aghazadeh Meshgi, M.^{2*}, Sharifan, A.³ and Larjani, K.⁴

1- Graduated of Master of Science, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2*- Department of Food Hygiene, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran (mahzad.aghazadeh@gmail.com)

3- Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Increasing tendency to reduce the use of synthetic preservatives has led to research and use of naturally derived antimicrobials. The essential oil of rosemary is used as flavoring agent in food and because of great antimicrobial and antioxidative characteristics, it is known as a pharmaceutical plant.

The aim of this survey was to investigate the effect of different concentrations of rosemary essential oil (0, 50 and 100 ppm) at two temperatures (8 and 25 °C) during fourteen days storage on growth of *Staphylococcus aureus* in a commercial soup. Surface plate count was used after serial dilution preparation of samples for determination the number of bacteria after 24 hours.

Results were statistically significant ($p < 0.05$) and indicated that increasing the concentration of the essential oil caused a decrease in bacterial population.

Keywords: Rosemary essential oil, *Staphylococcus aureus*, Natural preservative

صنایع غذایی استفاده شده و به عنوان ترکیبات طعم دهنده در انواع غذاها، نوشابه‌ها و محصولات قنادی استفاده می‌شوند. آنها همچنین دارای خاصیت ضد میکروبی بر ضد طیف وسیعی از ریززنده‌ها (Microorganisms) می‌باشند (۱۲).

چکیده

توجه و علاقه فراینده مینی بر استفاده کمتر از نگهدارنده‌های سنتتیک منجر به انجام تحقیقات در زمینه یافتن و استفاده از مشتقات طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی شده است. اسانس رزماری به علت دارا بودن خاصیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وسیع، به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر اسانس گیاه رزماری بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ آماده تجارتي در حضور غلظت‌های مختلف اسانس (0، 50 و 100 ppm) در درجه حرارت‌های ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز بود.

شمارش تعداد کل باکتری به روش کشت سطحی پس از تهیه رقت‌های متوالی و کشت در محیط نوترینت آگار، پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری انجام پذیرفت.

نتایج حاصل از بررسی نشان می‌دهد تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری از نظر آماری معنی‌دار ($p < 0.05$) بوده و با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد.

واژگان کلیدی: اسانس رزماری، استافیلوکوکوس اورئوس، نگهدارنده طبیعی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۴

مقدمه

اسانس‌های گیاهی مدت زمان طولانی است که جهت درمان بیماری‌ها استفاده می‌شوند و در بسیاری از کشورهای پیشرفته، مواد با منشأ گیاهی نقش مهمی را در حفظ سلامت جامعه بازی می‌کنند. بعلاوه شناسایی این ترکیبات با فعالیت ضد میکروبی همیشه برای دانشمندان که به جست و جوی منابع جدید دارویی برای درمان بیماری‌های مختلف هستند، جذاب بوده است.

اسانس‌های گیاهی که به عنوان ترکیبات GRAS (Generally Recognized as Safe) شناخته می‌شوند، بطور گسترده‌ای در

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و

تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران (mahzad.aghazadeh@gmail.com)

۳- گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد

اسلامی، تهران، ایران

۴- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

سندرم شوک توکسیک و... می‌باشد. انترتوکسین تولید شده توسط این باکتری به حرارت مقاوم می‌باشد به طوری که پخت معمولی، پاستوریزاسیون و خشک کردن آن را از بین نمی‌برند. رشد استافیلوکوک به تعداد بیش از یک میلیون در گرم لازم است تا توکسین کافی جهت بروز مسمومیت تولید شود. مسمومیت حاصل از استافیلوکوکوس اورئوس یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی بوده و در اغلب کشورها از نظر وقوع در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد (۲). در این پژوهش اثرات اسانس رزماری، درجه حرارت و مدت زمان نگهداری بر روی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در سوپ جو تجارتي در حضور غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ ppm، ۰ اسانس رزماری طی ۱۴ روز نگهداری در درجه حرارت‌های ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. لازم به ذکر است که غلظت‌های اسانس مورد استفاده در آزمایش‌های میکروبی، پس از انجام آزمون‌های حسی بر روی نمونه‌های سوپ جو تجارتي حاوی مقادیر مختلف اسانس به دست آمدند.

مواد و روش کار

تهیه گیاه

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) در مرداد ماه از منطقه شمال غرب تهران جمع‌آوری گردید و در دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران تأیید نام علمی گردید. اندام هوایی گیاه برای مدت کوتاهی جهت از بین بردن گرد و خاک چسبیده، در جریان آب شست و شو گردید و سپس به مدت دو روز در دمای اتاق خشک گردیدند (۱).

استخراج اسانس

در این تحقیق به منظور استخراج اسانس گیاه مورد نظر از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر استفاده گردید. بدین

استعمال ترکیبات نگهدارنده سنتتیک منجر به بروز مشکلات زیستی، ناشی از باقی ماندن مواد سمی، ترکیبات سرطان‌زا و ترکیبات بر هم زننده تعادل هرمونی خواهد شد. همچنین با توجه به اینکه استفاده مداوم از ترکیبات سنتتیک موجب مقاومت برخی از ریززنده‌ها به این ترکیبات می‌شود، ضرورت توسعه نگهدارنده‌های جدید طبیعی با کارایی بیشتر و همچنین سازگار با محیط زیست وجود دارد (۱۳). نکته حائز اهمیت این است که نوع و میزان ترکیبات و به تبع آن میزان فعالیت ضد میکروبی اسانس به محل کاشت گیاه وابسته است (۸، ۹ و ۲۰). از طرفی اگر از اسانس‌های گیاهی به عنوان ماده ضد میکروبی در ماده غذایی استفاده شود، باید به تأثیرات خصوصیات حسی (Organoleptic) نیز توجه شود، زیرا که این نگهدارنده‌های طبیعی می‌توانند طعم و مزه ماده غذایی را تغییر دهند (۱۱).

رزماری گیاهی است از خانواده نعنائیان (Lamiaceae or Labiatae)، چند ساله و به فرم بوته‌ای که در تمامی فصل‌های سال سرسبز می‌باشد. از خصوصیات این گیاه بوی فراوان برگ‌ها می‌باشد که آن را به عنوان یک گیاه معطر مشهور نموده است. این گیاه از گیاهان بومی مدیترانه بوده و در ایران نیز کشت می‌شود. اسانس رزماری با کاربرد طعم‌دهندگی در مواد غذایی استفاده می‌شود و همچنین به علت دارا بودن خاصیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی وسیع به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است (۳ و ۱۹). اسانس رزماری همچنین دارای خواص آنتی‌موتازنیک (Antimutagenic) (۱۵) بوده و عدم سمیت آن در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۱۴).

جنس استافیلوکوکوس متعلق به خانواده میکروکوکاسه (Micrococcaceae) می‌باشد که مهم‌ترین گونه این جنس استافیلوکوکوس اورئوس است. استافیلوکوکوس اورئوس عامل اصلی مسمومیت غذایی استافیلوکوکی و عفونت‌های خارج روده‌ای مانند زخم، دمل، ذات‌الریه، مننژیت، باکترامی،

مختلف اسانس همراه با یک نمونه شاهد بعد از آماده نمودن سوپ در شرایط یکسان توسط هفت پانل تست تعلیم دیده آزمون گردیدند.

در تعیین خصوصیات عطر و طعم نمونه‌ها از آزمون لذت بخشی (Hedonic test) ۷ طبقه‌ای شامل طبقات ۱- غیر قابل تحمل، ۲- بد، ۳- جالب نیست، ۴- متوسط، ۵- خوب، ۶- خیلی خوب و ۷- فوق العاده استفاده گردید. بدین منظور سوپ حاوی سه غلظت اسانس (۲۰۰ ppm و ۱۰۰ و ۵۰) و یک نمونه شاهد و فاقد اسانس مورد آزمون قرار گرفت (۴ و ۱۷). همچنین در مورد سؤال پذیرش کلی، عدد ۱ به معنای پذیرش نمونه و عدد ۰ به معنای عدم پذیرش نمونه در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی سوپ‌ترا

ابتدا سوپ جو تجارتي طبق دستور العمل کارخانه تولید کننده در شرایط آزمایشگاهی آماده‌سازی گردید و اجازه داده شد به مدت بیست دقیقه در حرارت لازم بجوشد. پس از این مرحله سوپ به دست آمده در فانل‌های شیشه‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری توزیع و در اتوکلاو (۱۲۱) درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید تا تنها روند رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدون حضور رقبا همانگونه که در سوپ پخته مشاهده می‌شود، بررسی گردد. سپس به سوپ استریل، غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ و ۰ و همچنین سوسپانسیون حاوی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اضافه گردید. لازم به توضیح است که غلظت‌های اسانس بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های ارگانولپتیکی تعیین گردیدند. در نهایت نمونه‌ها در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند.

لازم به توضیح است که درصد مقادیر اسانس، با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون‌های چشایی در نظر گرفته شد.

منظور ۱۰۰ گرم گیاه خشک شده به بالن تقطیر منتقل و به مدت ۳ ساعت عمل استخراج و اسانس‌گیری انجام شد. لازم به ذکر است که برای افزایش راندمان استخراج، گیاه خشک شده قبل از استخراج اسانس خرد گردید. در نهایت اسانس به دست آمده در شیشه تیره رنگ سترون شده در یخچال نگهداری شد (۱).

شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

به منظور تجزیه کیفی و کمی اسانس رزماری، نمونه آماده شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی توأم با طیف سنج جرمی (GC-MS) موجود در آزمایشگاه تخصصی مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات تزریق گردید. مشخصات و شرایط دستگاه GC-MS به شرح ذیل می‌باشد:

دستگاه GC: مدل HP-6890 شرکت HEWLETT PACKARD امریکا، نوع ستون HP-5MS، ابعاد ستون شامل طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۳۲ میکرون، برنامه‌ریزی دمایی ستون ۲۲۰-۶۰، دمای محل تزریق ۲۵۰°C، گاز حامل هلیوم با شدت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه.

دستگاه MS: مدل HP-5973 شرکت HEWLETT PACKARD امریکا، انرژی یونش (EI) ۷۰ الکترون ولت، دمای محفظه یونش ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، تجزیه‌گر جرمی کوادروپل، دمای تجزیه‌گر جرمی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد.

در نهایت با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداري، اندیس کوآتس و تطبیق آنها با الگوهای کتابخانه‌ای، طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند.

ارزیابی حسی

جهت ارزیابی تأثیر اسانس بر روی خصوصیات حسی شامل عطر، طعم و پذیرش کلی، سوپ‌های حاوی غلظت‌های

ريززننده مورد بررسي

باکتری مورد استفاده در این تحقیق استافیلوکوکوس اورئوس بود که با شماره کلکسیون PTCC1431 به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

تلقیح باکتری

جهت دستیابی به کشت تازه و فعال ریززننده، از محیط کشت ذخیره ریززننده‌ها در شرایط استریل و در زیر هود لامینار فلو توسط لوپ استریل تعدادی کلنی برداشته و به صورت سه منطقه‌ای در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و سپس پلیت‌ها ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۳۵- ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفتند. به منظور تهیه سوسپانسیون میکروبی، توسط لوپ استریل تعدادی کلنی از کشت‌های تازه و فعال باکتری استافیلوکوکوس اورئوس برداشته شده و به سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد. شمارش تعداد کل باکتری به روش کشت سطحی پس از تهیه رقت‌های متوالی و کشت در محیط نوترینت آگار، پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری انجام پذیرفت. پس از محاسبه میزان باکتری، مقدار معینی از سوسپانسیون اولیه که در یخچال از آن نگهداری می‌شد به سوبسترا تلقیح گردید تا میزان 10^3 باکتری در هر میلی‌لیتر سوپ به دست آید.

ارزیابی رشد باکتری

نگهداری نمونه‌ها به مدت دو هفته در دو دمای ۸ درجه سانتی‌گراد (دمای نامناسب یخچالی) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) انجام گرفته و پس از نمونه‌برداری در روزهای ۱، ۳، ۵، ۷ و ۱۴ شمارش تعداد کل باکتری پس از تهیه رقت‌های متوالی و کشت به روش سطحی (Surface plate) در محیط نوترینت آگار انجام پذیرفت.

همچنین برای تمام نمونه‌ها یک محیط فاقد اسانس به عنوان کنترل مثبت و یک محیط فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

پس از گردآوری اطلاعات بر پایه اصول آماری، جهت ارزیابی نتایج آزمون‌های حسی و همچنین بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس و درجات مختلف نگهداری بر روی لگاریتم تعداد باکتری، از تکنیک‌های آماری شامل آزمون آنالیز واریانس (با استفاده از نرم افزار SPSS) استفاده گردید.

نتایج

پس از تزریق اسانس به دستگاه GC-MS، با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری و ضرایب کوتاه ترکیبات و در نهایت مقایسه آنها با شاخص‌های مرجع طیف‌های مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شناسایی شدند. ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس رزماری همراه با درصد فراوانی هر جزء در جدول ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۲، مقایسه میانگین ($Mean \pm SE$) نتایج حاصل از ارزیابی گروه چشایی، ناشی از میزان پذیرش طعم، بو و پذیرش کلی نمونه‌های سوپ حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری را نشان می‌دهد.

همچنین مقایسه میانگین بین سطوح مختلف فاکتور غلظت اسانس به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ در نمودار شماره ۱ به نمایش گذارده شده است و نمودار شماره ۲ روند رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس طی ۱۴ روز نگهداری در دو دمای ۸°C و ۲۵°C را به نشان می‌دهد.

جدول ۱- ترکیبات شناسایی شده در اسانس رزماری مورد آزمون

شماره	شاخص بازداری	ضریب کوآتس	نام ترکیب	درصد
۱	۷/۸۶	۹۲۷	Tricyclene	۰/۲۲
۲	۸/۱۴	۹۳۹	α -Pinene	۱۰/۴۴
۳	۸/۵	۹۵۴	Camphene	۴/۴۰
۴	۸/۵۸	۹۶۸	Verbenene	۰/۵۵
۵	۸/۸۴	۹۷۹	Octen-3-ol	۰/۵۴
۶	۹/۰۵	۹۸۴	3-Octanone	۴/۰۱
۷	۹/۱۸	۹۹۱	Myrcene	۴/۷۰
۸	۹/۶۵	۱۰۰۳	α -Phellandrene	۰/۱۹
۹	۹/۹۲	۱۰۱۷	α -Terpinene	۰/۴۹
۱۰	۱۰/۱۰	۱۰۲۵	p-Cymene	۱/۴۸
۱۱	۱۰/۲۳	۱۰۲۹	Limonene	۳/۹۴
۱۲	۱۰/۳۶	۱۰۳۱	1,8-Cineole	۷/۳۸
۱۳	۱۰/۸۵	۱۰۵۰	(E)- β -Ocimene	۰/۷۵
۱۴	۱۱/۰۹		n. i.	۰/۱۴
۱۵	۱۱/۵۵	۱۰۶۰	γ -Terpinene	۱/۳۶
۱۶	۱۱/۶۶	۱۰۹۷	Linalool	۳/۳۳
۱۷	۱۱/۹۴		n. i.	۰/۲۶
۱۸	۱۲/۴۶	۱۱۰۷	2,6-Dimethyl phenol	۰/۳۰
۱۹	۱۲/۹۶	۱۱۴۵	(E)-Verbenol	۰/۹۵
۲۰	۱۳/۰۸	۱۱۴۶	Camphore	۹/۳۱
۲۱	۱۳/۳۴	۱۱۶۳	(E)-Pinocamphone	۰/۶۱
۲۲	۱۳/۵۱	۱۱۶۹	Borneol	۸/۳۷
۲۳	۱۳/۶۶	۱۱۷۷	Terpinen-4-ol	۴/۳۷
۲۴	۱۳/۹۳	۱۱۸۹	α -Terpineol	۳/۷۱
۲۵	۱۴/۱۷		n. i.	۲/۶۰
۲۶	۱۴/۵۳	۱۲۰۵	Verbenone	۱۱/۴۲
۲۷	۱۴/۹۹		n. i.	۴/۳۵
۲۸	۱۵/۱۵	۱۲۵۷	Linalyl acetate	۲/۴۷
۲۹	۱۵/۶۶		n. i.	۰/۳۴
۳۰	۱۵/۹۱	۱۲۸۹	Bornyl acetate	۵/۱۴
۳۱	۱۷/۴۶	۱۳۴۹	α -Terpinyl acetate	۰/۱۷
۳۲	۱۷/۶۱	۱۳۵۹	neoiso-Dihydro carveol acetate	۰/۳۲
۳۳	۱۸/۸۱	۱۴۱۹	(E)-Caryophyllene	۱/۰۲
۳۴	۱۸/۹۲	۱۴۳۶	Neryl acetone	۰/۲۱
۳۵	۱۹/۴۵	۱۴۵۵	α -Humulene	۰/۱۵

n. i. = ترکیبات شناسایی نشده

بحث

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تأثیر مقادیر متفاوت اسانس بر روی عطر و طعم سوپ از لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی دار می‌باشد. در این رابطه می‌توان گفت نمونه‌های حاوی ۵۰ppm و ۱۰۰ppm اسانس مطلوب‌ترین نمونه‌ها از لحاظ عطر و بو توصیف شدند. اگرچه تفاوت معنی‌داری بین نمونه شاهد و دو نمونه مذکور مشاهده نمی‌شود، اما به عنوان سوپ با عطر و بوی جدید از سوی ارزیاب‌ها مورد اقبال قرار گرفتند. اما در مورد طعم، نمونه‌های حاوی ۱۰۰ppm و ۲۰۰ppm اسانس به دلیل پس طعم (After taste) حاصله، مورد اقبال گروه ارزیاب قرار نگرفتند و بطور کلی نمونه سوپ حاوی ۵۰ppm اسانس، مطلوب و قابل رقابت با نمونه سوپ تجارتي معرفی گردید. در نهایت با استفاده از این نتایج، مقادیر اسانس مورد استفاده جهت بررسی‌های میکروبی‌شناسی در نظر گرفته شد.

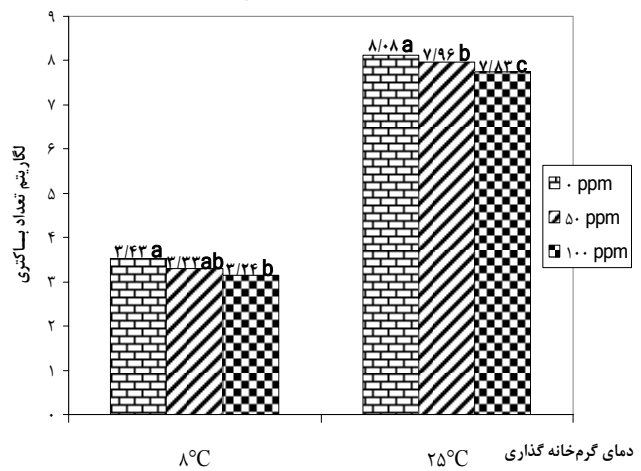
بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های میکروبی‌شناسی، تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری از نظر آماری (آنالیز واریانس) معنی‌دار ($p < 0.05$) بود و این به این معنی است که با افزایش غلظت اسانس، میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد. اثر مدت نگهداری بر روی رشد باکتری نیز از نظر آماری (آنالیز واریانس) معنی‌دار ($p < 0.05$) بود که نشان می‌دهد با افزایش مدت نگهداری میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد. همچنین با کاهش دمای نگهداری، رشد باکتری نیز کاهش یافت و تأثیر دمای نگهداری بر روی رشد باکتری و اثر تداخلی آن با غلظت‌های مختلف اسانس از نظر آماری (آنالیز واریانس) معنی‌دار ($p < 0.05$) بود.

روغن‌های فرار یا اسانس‌ها هم از نظر مقدار و هم از نظر ترکیب‌های سازنده تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و درونی هستند. عوامل بیرونی مانند دما، رطوبت، نور، موقعیت جغرافیایی، خاک و غیره اهمیت دارند، اما ذکر این نکته نیز

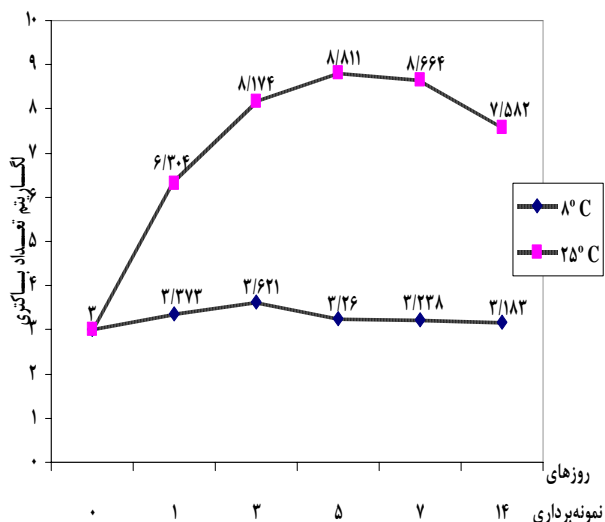
جدول ۲- مقایسه میانگین بین سطوح مختلف فاکتورهای طعم، عطر و پذیرش

غلظت اسانس (ppm)	مزه	عطر و بو	پذیرش کلی
۰	۴/۷۱ a	۴/۱۴ a	۱ a
۵۰	۳/۲۹ b	۵ a	۰/۸۵ a
۱۰۰	۱/۷۱ c	۳/۱۴ b	۰/۱۴ b
۲۰۰	۱ d	۲ c	۰ b

تیمارها با حروف مشابه در هر ستون به معنای عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰.۵٪ به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.



نمودار ۱- مقایسه میانگین بین سطوح مختلف فاکتور غلظت در دو دمای ۲۵°C و ۸°C



a, b, c: در هر ستون تفاوت بین میانگین‌های فاقد حروف مشترک، معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

نمودار ۲- روند رشد باکتری طی ۱۴ روز نگهداری در دو دمای ۸°C و ۲۵°C

بطور کلی سازوکار اثر اسانس‌ها بر روی سلول باکتری عبارتند از ایجاد اختلال در ساختمان دیواره سلولی، آسیب زدن به غشاء سیتوپلاسمی، آسیب رساندن به پروئین‌های غشاء، خروج محتویات سلول به خارج، ایجاد انعقاد در سیتوپلاسم و اختلال در سیستم انتقال فعال پروتون (Proton Motive Force) (۶).

اصولاً اسانس‌ها ماهیت آبگریز دارند و همین موضوع به آنها کمک می‌کند تا در غشاء و میتوکندری سلول نفوذ کنند و آنها را نفوذپذیر کنند، در نتیجه نقل و انتقال یون‌ها با اختلال مواجه می‌شود و خروج و نشست محتویات سلولی اتفاق می‌افتد در نهایت سلول می‌میرد.

از زمان شناخت‌ترین‌های موجود در اسانس‌های گیاهی به عنوان فاکتورهای ضد میکروبی اولیه، سازوکار عمل ضد میکروبی این اسانس‌ها به آنها نسبت داده شد. ساختمان فنل‌های طبیعی موجود در اکثر ترپن‌های بسیار فعال نظریه ارتباط میان نحوه فعالیت و ساختمان فنلی آنها را قابل قبول می‌سازد. نحوه فعالیت ترکیبات فنلی معمولاً به صورت دخالت در عمل غشاء سیتوپلاسمی و شامل نیروی تحریک پروتئین و انتقال یونها می‌باشد (۶).

معمولاً اسانس‌های غنی از ترکیبات فنلی دارای خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی هستند و در واقع این ترکیبات فنلی موجود در اسانس‌های گیاهی بیشترین تأثیر را در ایجاد خاصیت ضد میکروبی در آنها دارند، این ترکیبات هم در غشاء سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند (۵ و ۱۰).

در مجموع، ترپن‌ها ممکن است دارای سازوکارهای ضد میکروبی دیگری نیز باشند. کانر و بوچات (۱۹۸۴)، پیشنهاد کردند که اسانس‌های موجود در گیاهان دارویی ممکن است از طریق ایجاد اختلال در تولید انرژی و سنتز ترکیبات ساختمانی از فعالیت سیستم‌های آنزیمی مخمرها جلوگیری نمایند (۷).

ضروری است که روشن شدن تأثیر عوامل محیطی چیزی را از نقش عوامل ژنتیکی که خود نیز ممکن است تحت تأثیر محیط قرار گیرند کم نمی‌کند (۱). در هر حال با توجه به این تفاوت‌ها، مقایسه شیمیایی ترکیبات متشکله اسانس در کنار بررسی میکروبی الزامی می‌نماید.

با مطالعه داده‌ها و بررسی درصد ترکیبات حاصل (جدول ۱) می‌توان گفت که به ترتیب بیشترین درصد را وربنون، آلفا-پینن، کامفور، بورنتول، او-۸-سینئول و بورنیل استات به خود اختصاص می‌دهند و این در حالی است که نتایج حاصل از بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس رزماری کشت شده در مناطق دیگر، متفاوت گزارش شده است. به عنوان مثال Djeddi و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیق خود با به دست آوردن ۳۴ ترکیب در نتیجه آنالیز اسانس، کامفور (۱۴/۶٪)، او-۸-سینئول (۱۲/۲٪)، بتا-کاریوفیلن (۱۰/۹٪)، بورنتول (۱۰/۶٪)، بتا-پینن (۸/۵٪) و کامفن (۷/۲٪) را به عنوان بیشترین ترکیبات موجود در اسانس رزماری کشت شده در الجزایر عنوان داشته‌اند. همچنین می‌توان به نتایج حاصله از آنالیز اسانس رزماری کشت شده در شهر کرمان اشاره کرد، مقتدر و افضلی (۲۰۰۹) پس از تجزیه شیمیایی اسانس رزماری، ۴۱ ترکیب را در اسانس مورد آزمون شناسایی نمودند که به ترتیب ترکیبات زیر بیشترین درصد را به خود اختصاص می‌دهند:

آلفا-پینن (۱۵/۵۲٪)، کامفور (۱۱/۶۶٪)، وربنون (۱۱/۱۰٪)، او-۸-سینئول (۱۰/۶۳٪)، بورنتول (۷/۲۹٪)، بورنیل استات (۵/۴۱٪) و کامفن (۹/۳۱٪).

درباره سازوکار اثر اسانس‌ها روی ریززنده‌ها نظرات مختلفی مطرح است. با توجه به گروه‌های شیمیایی متعدد در اجزای تشکیل دهنده اسانس‌ها، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها به یک سازوکار خاص معطوف نمی‌گردد و این مواد هدف‌های متعددی را در سلول تحت تأثیر قرار می‌دهند.

فهرست منابع

۱. جايمندي، ك.، رضايي، م. (۱۳۸۵): دستگاه‌هاي تقطير، روش‌هاي آزمون و شاخص‌هاي بازداري در تجزيه اسانس، چاپ اول، انجمن گياهان دارويي، تهران، ايران، صفحه: ۱۸، ۱۰۷-۱۰۵.
۲. رضويلر، و. (۱۳۸۷): ميكروبيهاي بيماريزا در مواد غذايي و اپيدميولوژي مسموميتهاي غذايي، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ايران، صفحه: ۱۳۱-۱۲۷.
۳. زرگري، ع. (۱۳۶۹): گياهان دارويي، جلد چهارم، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ايران، صفحه: ۷۲-۷۱.
۴. واتس، بي. ام، يلي ماكي، جي. ال، جفري، ال. ئي، الياس، ال. جي. (۱۳۷۷): روش‌هاي ارزيايي حسي مواد غذايي، چاپ اول، ترجمه قاضي‌زاده، م.، رازقي، ع. انتشارات انستيتو تحقيقات تغذيه‌اي و صنايع غذايي کشور، تهران، ايران، صفحه: ۷۸-۷۵.
5. Brul, S., Coote, P. (1999): Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* ; 50(1-2): 1-17.
6. Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* ; 94(3): 223-253.
7. Conner, D. E., Beuchat, L. R. (1984): Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.* ; 49(2): 429-434.
8. Dimitrijevic, S. I., Mihajlovski, K. R., Antonovic, D. G., Milanovic-Stevanovic, M. R., Mijin, D. Z. (2007): A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. *Food Chem.* ; 104(2): 774-782.
9. Djeddi, S., Bouchenah, N., Settar, I., Skaltsa, H. (2007): Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Nat. Compd.* ; 43(4): 487-490.
10. Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000): Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* ; 88(2): 308-316.
11. Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P. (2008): The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions

همچنين بايد به مطالعاتي اشاره داشت كه نشان داده‌اند وقتي اسانس‌ها بطور كامل استفاده مي‌شوند نسبت به زماني كه فقط اجزاي تشكيل دهنده اصلي (Major components) آنها استفاده مي‌شوند، داراي تأثير بيشتري مي‌باشند. بنا بر اين اين امر مشخص مي‌كند كه اجزاي كم مقدار (Minor components) اسانس‌ها براي فعاليت اسانس مهم بوده و ممكن است يك اثر تشديد كننده داشته باشند (۶).

به هر حال پيش از اين ويژگي ضد ميكروبي اسانس رزماري در تحقيق‌هاي گوناگون در محيط‌هاي كشت به اثبات رسيده بود (۹ و ۱۸)، اما در مواد غذايي نه تنها عوامل داخلي نظير مقادير چربي، پروتئين، آب، آنتي‌اكسيدان‌ها، نگهدارنده‌ها، pH، نمك و ديگر افزودني‌ها مي‌توانند بر روي حساسيت باكتري‌ها تأثير بگذارند، بلكه عوامل خارجي مانند درجه حرارت، نوع بسته بندي، خصوصيات ريززنده و... نيز مي‌توانند فعاليت باكتري‌ها را تحت تأثير قرار دهند.

از آنچه كه تا كنون گفته شد مشخص مي‌شود كه اثر ضد باكتريايي اسانس رزماري مورد به دليل وجود مواد مؤثره موجود در تركيب آن است و هرچه درصد اين تركيبات بيشتتر باشد، خاصيت ضد ميكروبي نيز بيشتتر مي‌گردد.

با توجه به اين موضوع كه در دماي ۸ درجه سانتي‌گراد، فاكور دما مؤثرتر از فاكور غلظت اسانس در كنترل رشد باكتري عمل نمود، تعداد باكتري حتي در نمونه شاهد در اين دما به ميزان كافي جهت توليد توكسين (بيش از يك ميليون در گرم غذا) نرسيد و با توجه به اينكه در دماي ۲۵ درجه سانتي‌گراد، ميزان اسانس مطلوب به دست آمده در آزمايش‌هاي چشايي، توانايي بازدارندگي از رشد باكتري تا زير تعداد كافي جهت توليد توكسين را دارا نمي‌باشد، حتي با عنايت به كاهش معني‌دار تعداد باكتري، ميزان اسانسي كه تغييرات مطلوب حسي در ماده غذايي را ايجاد مي‌نمايد، انتظارات لازم جهت كنترل رشد باكتري استافيلوكوكوس اورئوس را برآورده نمي‌نمايد.

20. Yesil Celiktas, O., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K. H. C. (2007): Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*; 100(2): 553–559.
12. Kotzekidou, P., Giannakidis, P., Boulamatsis, A. (2008): Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT-Food Sci. Technol.*; 41(1): 119–127.
13. Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Shekhar Prasad, C., Kishore Dubey. N. (2008): Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg.* ; 9(4): 575–580.
14. Lemonica, I. P., Demasceno, D. C., Di-Stasi, L. C. (1996): Study of the embryonic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Braz. J. Med. Biol. Res.* ; 29(2): 223-227.
15. Minnuni, M., Wolleb, U., Mueller, O., Pfeifer, A., Aeschbacher, H. U. (1992): Natural antioxidants as inhibitors of oxygen species induced mutagenicity. *Mutat. Res.*; 269(2): 193-200.
16. Moghtader, M., Afzali, D. (2009): Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*; 5(3): 393-397.
17. Moosavy, M., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Alipour, M., Emami Razavi, N., Gandomi, H., Noori, N. (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 membrans. *Food Res. Int.*; 41(10): 1050-1057.
18. Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., Reglero, G. (2005): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *J. Food Prot.*; 68(4): 790-795.
19. Wang, W., Wu, N., Zu, Y. G., Fu., Y. J. (2008): Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*; 108(3): 1019–1022.