

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس

مریم شافعی^{a*}، انوشه شریفان^b، مهزاد آقازاده مشگی^c

^a دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی - علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^b استادیار دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^c استادیار دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۱۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۹/۶/۲۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۳/۱۲

چکیده

مقدمه: اسانسهای گیاهی در صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارند و دارای خاصیت ضد میکروبی بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها می باشند. در این تحقیق اثر ضد میکروبی اسانس گیاه کاکوتی در شرایط آزمایشگاهی بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس مورد مطالعه قرار گرفت و نیز اسانس جهت شناسایی ترکیبات متشکله تجزیه شد.

مواد و روش ها: شناسایی ترکیبات اسانس کاکوتی توسط تزریق نمونه به دستگاه GC/MS انجام شد. جهت بررسی اثر ضد میکروبی اسانس، غلظتهای مختلف اسانس (۳، ۲، ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۲ درصد) به محیط کشت YM Agar (محیط کشت مناسب مخمر) اضافه گردید و رشد یا عدم رشد مخمر در این شرایط بررسی شد.

یافته ها: دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی، ۳۳ ترکیب مختلف را در اسانس جداسازی و شناسایی کرد که از بین آنها ۶ ترکیب بیش از ۶۵ درصد اسانس را تشکیل می داد که به ترتیب پولگون (۲۷/۱۵٪)، آلفا-تریپنیل استات (۰/۸۳٪)، تیمول (۹/۷۱٪)، گرانبول (۸/۲۶٪)، متنون (۶/۸۲٪) و آلفا-تریپنول (۳/۷۹٪) است. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس کاکوتی در محیط کشت برای مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس ۰/۲۵٪ بود.

نتیجه گیری: گیاه کاکوتی دارای اثر بازدارندگی بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس می باشد. از آنجایی که ترکیبات ضد میکروبی روغنها در حقیقت فنولیکها و ترپنها هستند، احتمالاً نحوه مکانیسم اثر ضد میکروبی آنها مشابه دیگر ترکیبات فنولیکی و ترپنی می باشد.

واژه های کلیدی: اسانس، کاکوتی، کلویورومایسس مارکسیانوس

مقدمه

درخواست مصرف کننده مبنی بر استفاده کمتر از نگهدارنده‌های سنتتیک منجر به تحقیقات و مصرف مشتقات طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی شده است (Yesil Celiktas et al., 2007). اسانسهای گیاهی که به عنوان ترکیبات طبیعی شناخته می‌شوند، بطور گسترده‌ای در صنایع غذایی استفاده شده و دارای خاصیت ضد میکروبی بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Dusan et al., 2006).

یکی از این گیاهان، گیاه کاکوتی کوهی است که به نام علمی *Ziziphora clinopodioides* شناخته می‌شود و احتمالاً یکی از انواع گیاهان دارویی است که در کتب طب سنتی ایران به نام "مشک طرامشک" و "صعتر" از آن نام برده شده است (عقیلی خراسانی، ۱۳۷۱). این گیاه متعلق به جنس *ziziphora* و تیره نعناعیان می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۵). گیاهان تیره نعناع از دیر باز در طب سنتی مورد استفاده بوده‌اند و معمولاً در درمان عفونتهای دستگاه گوارش یا دل درد کاربرد داشته‌اند (مهرابیان و همکاران، ۱۳۷۵). در بسیاری از مناطق ایران از گیاه کاکوتی کوهی به عنوان چاشنی به همراه ماست و سایر فرآورده‌های لبنی استفاده می‌شود (سجادی و همکاران، ۱۳۸۲). گیاه کاکوتی که یکی از انواع آویشن محسوب می‌شود به فراوانی در مناطق کوهستانی شمال غرب ایران و البرز مرکزی می‌روید و به عنوان معطر کننده در مواد غذایی و ادویه‌جات استفاده می‌شود. از این گیاه در معالجه امراض معده (عزیزی و همکاران، ۱۳۸۳) و به عنوان ضد عفونی کننده برای رفع سرماخوردگی استفاده می‌شود (باباخانو و همکاران، ۱۳۷۷). اجزاء کاکوتی فعالیت آنتی توموری دارند و رشد نوعی از تومورهای بدخیم را تا ۳۲/۶ درصد و غدد سرطانی را تا ۴۷/۵ درصد کاهش می‌دهند (Chachoyan et al., 1996).

مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس یکی از عوامل آلوده کننده و مولد فساد در برخی از مواد غذایی از جمله ماست و فرآورده‌های وابسته به آن، مانند نوشیدنی دوغ در ایران می‌باشد (viljoen et al., 2003) و می‌تواند سبب باکتری‌بندی ناشی از تولید دوغ گردد. لذا بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه کاکوتی بر روی این مخمر

می‌تواند گامی سودمند جهت دستیابی به روشهای جدید ایمن سازی مواد غذایی با استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی باشد.

در یک مطالعه سنگ آتش و همکاران (۱۳۸۵) تاثیر اسانس و عصاره کاکوتی کوهی را بر فعالیت باکتریهای آغازگر ماست بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد باکتریهای آغازگر در همه نمونه‌های ماست در طول نگهداری کاهش معناداری داشت. زنده مانی باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی در سطح $p < 0.01$ با نمونه‌های شاهد اختلاف معناداری نداشت. زنده مانی باکتری‌های آغازگر در بالاترین غلظت عصاره کاکوتی (۴۰۰۰ میکرو گرم در لیتر)، از روز هفدهم به بعد کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.01$).

Chitsaz و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز ترکیب و خاصیت ضد باکتری اسانس کاکوتی را بر روی چندین گونه از باکتری‌ها مورد بررسی قرار دادند. اسانس از رشد همه ارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمایش جلوگیری کرد که بیشترین اثر را بر روی سالمونلا تیفی موربوم^۱ (با MIC ۲۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) داشت.

در یک مطالعه کریمی (۱۳۸۷) اثرات ضد میکروبی اسانسهای نعناع و پونه و گلاب را بر روی دباریومایسس هانسنی^۲ در دوغ ایرانی در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد در یک دوره زمانی ۲۸ روزه مورد مطالعه قرار داد. نتایج نشان دادند که همه غلظت‌های اسانس‌های نعناع و پونه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد اثر مشخص و معنی‌داری در کاهش لگاریتم تعداد مخمر داشته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد فقط غلظتهای ۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ درصد اسانس نعناع و غلظتهای ۱/۵، ۱، ۰/۵ درصد اسانس پونه باعث کاهش لگاریتم تعداد مخمر بطور معنی‌داری می‌شوند.

Simsek و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که تعداد استرپتوکوکوس ترموفیلوس^۳ و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس^۴ در نمونه‌های ایران (دوغ محلی) تولید شده با ادویه‌های نعناع، آویشن و سیر و نمونه شاهد در طول نگهداری بصورت معناداری کاهش می‌یابد.

هر چند استفاده از گیاهان تیره نعناع به عنوان چاشنی در غذاهای مختلف و همچنین در معالجه بسیاری از

¹- *Salmonella typhimorium* ²- *Debaryomyces hansenii* ³- *Streptococcus thermophilus* ⁴- *Lactobacillus bulgaricus*

شد. بدین صورت که در هر پلیت CC ۱۴ از محیط کشت YM Agar به همراه درصد مورد نظر از اسانس و حلال DMSO ریخته شد. از آنجا که اسانس روغنی است و بر روی سطح محیط کشت به صورت یکنواخت پخش نمی‌شود حلال DMSO مورد استفاده قرار گرفت. لکه گذاری به صورت مضاعف بر روی پلیت‌ها انجام گرفت. هر لکه ۳ میکرولیتر و حاوی CFU/ml 10^6 از مخمر بود. همچنین یک پلیت شاهد (دارای لکه مخمر و فاقد اسانس) و نیز یک پلیت جهت در نظر گرفتن اثر احتمالی DMSO (دارای لکه مخمر و حاوی ۷ درصد DMSO ولی فاقد اسانس) تهیه گردید. پلیت‌ها به گرمخانه 24°C منتقل شد و بعد از ۴۸ ساعت برای رشد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظت اسانس که مانع از رشد مخمر شده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای اطمینان از نتیجه، آزمایشها در سه تکرار انجام شد.

- تجزیه اسانس: ترکیبات موجود در اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل (HP-6840/5973) با استفاده از ستون HP-5MS (30m \times 0.23mm . film 0.32 μm) جداسازی و شناسایی گردید. گاز حامل (99.999% He)، سرعت گاز (1ml/min) و انرژی یونشی آن ۷۰ eV بود. شناسایی اجزای تشکیل دهنده با مقایسه طیف جرمی آنها با طیف ترکیبات موجود در حافظه کامپیوتر و استانداردهای معتبر صورت گرفت.

یافته ها

مشاهده پلیت های مربوط به درصدهای مختلف آزمایش نشان داد که تنها در پلیت مربوط به غلظت ۰/۲٪ اسانس، مخمر رشد کرده بود و در دیگر پلیت ها هیچ گونه رشدی مشاهده نشد. در حالیکه در پلیت های شاهد و پلیت‌های حاوی DMSO به تنهایی، مخمر کاملاً رشد کرده بود. با توجه به نتایج حداقل غلظت مهاری اسانس کاکوتی برای مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس (V/V) ۰/۲۵٪ است.

بحث

مقایسه نتایج حاصل از کروماتوگرافی اسانس گیاه کاکوتی (شکل ۱) با اسانس سایر گونه‌های *ziziphora* نشان

بیماریها از دیر باز در ایران مرسوم بوده و برای مثال می‌توان به استفاده از گیاه کاکوتی در نوشیدنی دوغ اشاره کرد ولی مطالعه و تحقیقی بر روی اثر این گیاه بر مخمر عامل فساد این فرآورده یعنی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس صورت نگرفته است. ضمن اینکه گیاه کاکوتی مورد بررسی در این تحقیق بومی خراسان می‌باشد و مطالعه چندانی در زمینه ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس آن انجام نگرفته است. لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر اسانس گیاه کاکوتی بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس انجام گردید.

مواد و روش ها

- تهیه گیاه: گیاه کاکوتی به مقدار مورد نیاز از مناطق کوهستانی خراسان جمع آوری شد و مورد تأیید نام علمی قرار گرفت.

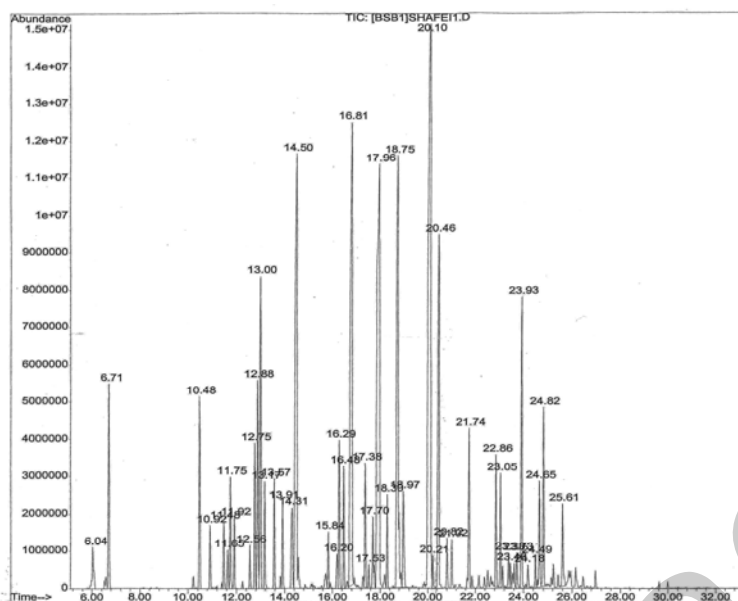
- تهیه سویه میکروبی: مخمر *Kluyveromyces marxianus* (PTCC 5193) از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

- تهیه اسانس: گیاه خشک شده را با دستگاه خرد کن، آسیاب کرده، سپس روغن اسانسی به روش تقطیر با آب در دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج و جمع آوری شد. نسبت اسانس به وزن خشک گیاه ۰/۵۰ W/W درصد اندازه‌گیری شد. اسانس در شیشه های رنگی در بسته در یخچال برای استفاده نگهداری شد.

- تهیه سوسپانسیون میکروبی: پودر مخمر لیوفیلیزه در ۲۰ ml محیط کشت YM broth حل شد و در انکوباتور در دمای 24°C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. ترکیب شیمیایی محیط کشت (YM) عبارتند از (گرم به ازاء لیتر): گلوکز ۱۰، عصاره مخمر ۳، پیتون سویا ۵، عصاره مالت ۳. پس از طی ۴۸ ساعت شمارش میکروبی انجام شد. جهت پی بردن به جمعیت میکروبی، با تهیه رقت‌های مورد نیاز از روش پور پلیت استفاده شد. سوسپانسیون یک کشت خطی جهت اطمینان از عدم آلودگی تهیه شد. سوسپانسیون را در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده و جهت کشت مجدد در فواصل دو هفته استفاده شد.

- تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC): جهت تعیین حداقل غلظت مهاری از غلظتهای ۰/۱٪، ۰/۲٪، ۰/۳٪، ۰/۴٪، ۰/۵٪، ۰/۶٪، ۰/۷٪، ۰/۸٪، ۰/۹٪، ۱٪، ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ اسانس و روش لکه‌گذاری استفاده

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن



شکل ۱ - کروماتوگرام روغن اسانسی کاکوتی

جدول ۱- نام ترکیبات و درصد آنها در اسانس کاکوتی

درصد	RT	نام ترکیب	درصد	RT	نام ترکیب
۰/۸۲	۱۲۲۶	piperitenone	۲/۱۶	۸۰۰	Octanol
۱۲۳۷	۲۷/۱۵	Pulegone	۱/۹۵	۹۳۹	Alpha-pinene
۸/۲۶	۱۲۵۳	Geraniol	۰/۶۲	۹۵۴	Camphene
۹/۷۱	۱۲۹۰	Thymol	۰/۲	۹۷۵	Sabinene
۱/۲۵	۱۲۹۹	Carvacrol	۰/۴۳	۹۷۹	Beta-pinene
۱۰/۸۳	۱۳۴۹	Alpha-terpinyl acetate	۱/۰۲	۹۹۱	Myrcene
۰/۳۱	۱۳۵۹	Eugenol	۰/۳۸	۱۰۱۷	Alpha Ttrepinene
۰/۵۱	۱۳۸۸	Beta-bourbonene	۲/۲۵	۱۰۲۹	Limonene
۱/۶۶	۱۴۱۹	Beta-caryophyllene	۲/۶۱	۱۰۳۱	1,8-cineol
۱/۲۶	۱۴۸۵	Germacrene-D	۰/۹۸	۱۰۶۰	Gama-terpinene
۱/۰۶	۱۵۰۶	Beta-bisbolene	۰/۸۱	۱۰۸۷	Linalool
۰/۳۶	۱۵۱۴	Gama-cadinene	۱/۲	۱۰۸۹	Terpinolene
۰/۲۳	۱۵۲۳	Delta-cadinene	۶/۸۲	۱۱۴۱	Menthone
۱/۱۵	۱۵۶۳	Nerolidol	۱/۶۳	۱۱۶۴	Iso menthone
۱/۱۳	۱۵۷۸	Spathulenol	۱/۴۸	۱۱۷۲	Menthol
۰/۹۲	۱۶۴۶	Epi alpha cadinol	۲/۸۱	۱۱۷۹	Iso menthol

۱۰۴

می‌شد (جوادیان و همکاران، ۱۳۷۵). همان طور که در جدول ۱ نیز آمده در مورد اسانس مورد مطالعه نیز پولگون ماده اصلی می‌باشد ولی در عین حال درصد این ترکیب در موارد مختلف متفاوت است. برای مثال در گونه‌های *z. tenuior* رشد کرده در قزوین درصد این ترکیب تا ۸۷٪ گزارش شده است (جوادیان و همکاران، ۱۳۷۵) در حالیکه درصد پولگون در نمونه مورد مطالعه ۲۷/۱۵٪ می‌باشد. ترکیب اصلی دیگر در این نمونه آلفا- ترپینیل استات می‌باشد که برای مثال در کاکوتی جمع‌آوری شده از

می‌دهد که علی‌رغم وجود شباهتها در ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس گیاه مورد بررسی در این تحقیق با سایر گونه‌ها، شرایط آب و هوایی، محل رویش، ارتفاع محل و ... می‌تواند دلیل برخی تفاوتها در این ترکیبات باشد. پولگون ماده اصلی اسانسهای گونه‌های *z. hispanica*، *z. tenuior* و *z. brevicalyx* را تشکیل می‌دهد (Dzhumaev et al., 1990). همچنین در مقایسه‌ای که بین سه نوع گیاه کاکوتی مختلف از سه منطقه ایران شده بود، در هر سه مورد پولگون ترکیب اصلی را شامل

فعالیت ضد میکروبی لیمون در مخمر ممکن است ناشی از این باشد که این ترین تمامیت سلولی را نابود می کند و دارای اثر بازدارندگی بر فعالیت تنفسی در میتوکندری است که البته عملکرد این ترین ممکن است به گونه قارچ نیز بستگی داشته باشد (Sikkema *et al.*, 1995). چندین محقق نیز فعالیت ضد قارچی بالای تیمول را در گونه های مختلف قارچ گزارش داده اند (Curtis *et al.*, 1996; Adam *et al.*, 1998; Bouchra *et al.*, 2003). 1,8 سینئول نیز به دلیل خصوصیات ضد میکروبی قابل ملاحظه شناخته شده است (Pattnaik *et al.*, 1997; Tzakou *et al.*, 2001; Mourey and canillac, 2003; Viljoen *et al.*, 2002) اثر ضد میکروبی اسانهای روغنی تنها ناشی از ترکیبات عمده آنها نمی باشد، ترکیباتی که مقادیر کمتری دارند نظیر آلفا- تریپنتول، تریپنین ۴-ال و لینالول نیز می توانند در فعالیت ضد میکروبی اسانسها سهمیم باشند. تریپنین ۴-ال به عنوان یک سری از ترکیبات، دارای خاصیت ضد باکتری بر علیه چندین میکروارگانیسم هستند (Barel *et al.*, 1991). آلفا- تریپنتول نیز به عنوان ضد باکتری گزارش شده است (Carson and Riley., 1995; Cosentino *et al.*, 1999) خاصیت بازدارندگی قوی لینالول در برابر ۱۲ باکتری و ۱۰ قارچ ثابت شده است (Pattnaik *et al.*, 1997). در حقیقت این امکان نیز وجود دارد که ترکیباتی با درصد کمتر احتمالاً دارای اثر سینرژیستی با دیگر ترکیبات موثر و فعال باشند (Marino *et al.*, 2001).

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق می تواند در جهت افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی و نیز کنترل فساد آنها و پیشگیری از ابتلا به مسمومیت های ناشی از مواد غذایی سودمند باشد و نیز اینکه می تواند گامی در جهت کاهش استفاده از نگهدارنده های سنتتیک و افزایش کاربرد نگهدارنده های طبیعی باشد. نتایج این تحقیق همچنین می تواند مورد استفاده صنایع غذایی، سازمان های نظارت بر مواد غذایی و مؤسسه استاندارد، مؤسسات تحقیقاتی گیاهان دارویی، تحقیقات پزشکی، صنایع تبدیلی کشاورزی و کارشناسان مربوطه، صنایع دارویی و آرایشی- بهداشتی قرار گیرد. امید است مطالعات آینده ابعاد بیشتری از

مناطق کوهستانی لار و لواسان وجود ندارد (چیت ساز و همکاران، ۱۳۸۶). تفاوت های موجود می تواند ناشی از تاثیر عوامل محیطی بر گیاه باشد.

نتایج بدست آمده از تحقیق نشان می دهد که گیاه کاکوتی دارای اثر بازدارندگی بر روی مخمر کلویرومایسس مارکسیانوس می باشد. از آنجایی که ترکیبات ضد میکروبی روغن ها در حقیقت فنولیکها و ترپنها هستند، به نظر می رسد که نحوه مکانیسم اثر ضد میکروبی آنها مشابه دیگر ترکیبات فنولیکی و ترپنی باشد. بیشتر مطالعات در ارتباط با مکانیسم ترکیبات فنولیک بر اثر آنها بر روی غشاهای سلولی تمرکز کرده است. در حقیقت فنولیکها علاوه بر صدمه به غشای سلولی که سبب نابود شدن لایه و نفوذ پذیری آن می شوند بر عملکرد لایه نیز تاثیر مخرب می گذارند. تاثیراتی نظیر اختلال در انتقال الکترون، سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک که در نهایت می تواند منجر به اثر بازدارندگی بر علیه باکتری باشد. فرآیند دیگری که علت اثر بازدارندگی بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی است نابودی غشای سلولی و تراوش مواد داخل سلولی است که این فرآیند توسط بسیاری از مواد ضد میکروبی استفاده می شود (Denyer and hugo, 1991; Tassou *et al.*, 2000).

تحقیقات اخیر که بر روی مخمر ساکارومایسس سرویزیه صورت گرفته، نشان داده که اثر بازدارندگی برخی از اسانسهای روغنی با قابلیت تشکیل کلنی ارتباط دارد. تفاوت در حساسیت مخمرهای مختلف به اسانسها علاوه بر نوع مخمر و ترکیب شیمیایی اسانس به مرحله رشد سلول نیز وابسته است. به گونه ای که سلولها در مرحله تقسیم سلولی نسبت به اثر ضد میکروبی اسانس بسیار حساستر هستند چرا که در مرحله جوانه زنی نفوذ اسانسها بسیار موثرتر است (Bakkali *et al.*, 2005; Bruni *et al.*, 2005; sacchtti *et al.*, 2003).

ترکیب عمده اسانس مورد مطالعه در این تحقیق پولگون می باشد. پولگون یک کتون می باشد که جزء مونوترپنها است. ترپنها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتریها نفوذ کنند که این امر منجر به دناتوراسیون پروتئینها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم و در نهایت مرگ سلول می شود (Oussalah *et al.*, 2006).

Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M. & Dehesa, M. (2003). Chemical composition and biological activities of *Isphingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (*Lauraceae*) flower calices. Food Chem. 85, 415-421.

Chachoyan, A. A. & Oganesyanyan, G. B. (1996). Antitumor activity of some spices of the family *Lamiaceae*. Rastitelnye Resursy. 32 (4), 59-64.

Chitsaz, M., Barton, M., Bazargan, M. & Kamallnejad, M. (2005). Essential oil composition and antibacterial effects of *Ziziphora clinopodioides*. Journal of Shahed university. 68, 15-23.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29, 130-135.

Curtis, O. F., Shetty, K., Cassagnol, G. & Peleg, M. (1996). Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol and thymol) on a food spoilage yeast (*Debaromyces hansenii*). Food Biotechnol. 10, 55-73.

Denyer, S. P. & Hugo, W. B. (1991). Mechanisms of Action of Chemical Biocides; their Study and Exploitation, The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication, pp. 171-188.

Hattingh, A. & Viljoen, B. C. (2002). Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. Food Microbiology. 19, 597-604.

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Shekhar Prasad, C. & Kishore, N. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities.

خواص ضد میکروبی این اسانس را روشن نماید.

منابع

باباخانلو، م.، میرزا، م.، سفیدکن، ف.، احمدی، ل.، برازنده، م. و عسگری، ف. (۱۳۷۷). بررسی ترکیبهای تشکیل دهنده اسانس کاکوتی کوهی (*Z. clinopodioides* L.). نشریه تحقیقات گیاهان دارویی، شماره ۲، صفحات: ۱۱۴-۱۰۳.

سجادی، س.، قاسمی دهکردی، ن. و بلوچی، م. (۱۳۸۲). بررسی مواد متشکله اسانس اندامهای هوایی گیاه کاکوتی کوهی. نشریه پژوهش و سازندگی، شماره ۸، صفحات: ۹-۱.

سنگ آتش، م.، گارازیان، ر.، حداد خداپرست، م.، نجفی، م. و بیرقی طوسی، ش. (۱۳۸۵). تاثیر اسانس و عصاره کاکوتی کوهی بر فعالیت باکتریهای آغازگر ماست. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۳، شماره ۴، صفحات: ۵۳-۴۷.

عزیزی، ک. (۱۳۸۳). اثر تنش خشکی و شوری بر روی خصوصیات کمی آویشن شیرازی، کاکوتی، آویشن باغی و کلپوره. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشگاه فردوسی مشهد.

کریمی، ر. (۱۳۸۶). مطالعه اثر ضد میکروبی اسانسهای نعنای، پونه، گلاب و تاثیر دمای نگهداری بر روی رشد *Debaryomyces hansenii* در دوغ ایرانی. رساله دکتری رشته بهداشت مواد غذایی. دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم و تحقیقات، دانشکده تخصصی علوم دامپزشکی.

مظفریان، و. (۱۳۷۵). فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر تهران.

مهرابیان، ص.، ملاباشی، ز. و مجد، ا. (۱۳۷۵). بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه از گیاهان تیره نعنای (کاکوتی، مریم گلی و نعنای)، بر روی باکتری بیماریزای روده ای و عامل مسمومیت غذایی. نشریه علوم، جلد هشتم، شماره ۱، صفحات: ۱۱-۱.

Adams, R. P. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 585, 1-13.

Barel, S., Segal, R. & Yashphe, J. (1991). The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. Journal of Ethnopharmacology 33, 187-191.

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9, 575–580.

Loureiro, V. & Querol, A. (1999). The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. Trends in Food Science and Technology. 10, 356-365.

Marino, M., Bersani, C. & Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae. International Journal of Food Microbiology, 67, 187–195.

Oussalah, M., Caillet, S. & Lacroix, M. (2006). Mechanism of action of *Spanish oregano*, *Chinese cinnamon*, and *savory* oils against cell membrane and walls of *Escherichia coli O157:H7* and *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 69(5), 1046–1055.

Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M. & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios 89, 39–46.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M.

& Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chem. 91, 621–632.

Sikkema, J., de Bont, J. A. M. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev. 59, 201–222.

Tassou, C., Koutsoumanis, K. & Nychas, G. J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33, 273–280.

Viljoen, B. C. (2003). Temperature abuse initiating yeasts growth in yoghurt. Food Research International. 36, 193-197.

Yesil Celiktas, O., Hames Kocabas, E. E., Bedir, E. F., Vardar Sukan, T. & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 100, 553–559.

Composition of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* and Its Antimicrobial Activity on *Kluyveromyces marxianus*

M. shafei ^{a*}, A. Sharifan ^b, M. Aghazade Meshki ^c

^a M. Sc. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran.

^b Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

^c Assistant Professor of the Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Essential oils have many applications in food industry. Their antimicrobial activity affects different classes of microorganisms. This study was designed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* on *Kluyveromyces marxianus*.

Materials and Methods: The essential oil was analysed by GC/MS. For the evaluation of the antimicrobial effect of the oil, different concentrations (3%, 2%, 1%, 0.75%, 0.50%, 0.25%, 0.20%) were added to the subculture (YM agar) and the antimicrobial activity was evaluated.

Results: GC analysis revealed 33 different compounds in the essential oil. Six of the identified compounds comprised more than 64% of the compounds present in the oil, pulegone (27.15%), alpha-terpinyl acetate (10.83%), geraniol (8.26%), menthone (6.82%), thymol (6.71%) and alpha terpineol (4.44%) were present in respective decreasing order. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* was 0.25% for *Kluyveromyces marxianus*.

Conclusion: The plant *Ziziphora clinopodioides* has antimicrobial activity. The antimicrobial activity of the essential oil might be partially due to phenolic compounds present in the oil.

Keywords: Essential oil, *Kluyveromyces marxianus*, *Ziziphora clinopodioides*.

* Corresponding Author: Lavin_61@yahoo.com