Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 286- 295

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص.۲۹۵-۲۸۶

بررسی تاثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* و *آسپرژیلوس فلاووس* در پنیر سفید ایرانی

مریم عزیزخانی*[۱]، فهیمه توریان [۲]، مریم بریری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۰۴

چکیده

با توجه به تاثیرات منفی نگهدارنده های شیمیایی بر سلامت مصرف‌کنندگان، توجه مراجع قانونی و صنایع غذایی بر کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی متمرکز شده است. در این پژوهش تاثیر اسانس‌های ریحان و مریم گلی کبیر بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* و *آسپرژیلوس فلاووس* طی دوره نگهداری پنیر سفید ایرانی مورد مطالعه قرار گرفت. روش‌های بکار رفته در این تحقیق مشتمل بر تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC)، حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌ها، تعیین تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر رشد لیستریا و آسپرژیلوس در پنیر طی دوره نگهداری محصول بود. ترکیبات اصلی اسانس مریم گلی کبیر شامل لینالیل استات، لینالول و اسانس ریحان شامل لینالول و آلفا-کادینول بود. MIC و MBC اسانس مریم گلی، به ترتیب، معادل ۰/۰۱۵٪ و ۰/۰۲٪ و اسانس ریحان برابر با ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶٪ برای لیستریا بود. همچنین، MIC و MFC در برابر آسپرژیلوس برای اسانس مریم گلی معادل ۰/۵٪ و ۰/۶۵٪ و برای اسانس ریحان برابر با ۰/۶٪ و ۰/۸٪ بدست آمد. غلظت ۰/۳۵٪ اسانس مریم گلی و ۰/۵٪ اسانس ریحان از تولید اسپور توسط قارچ در محیط کشت جلوگیری نمود. اسانس مریم گلی در غلظت ۱٪ طی دوره نگهداری پنیر از رشد آسپرژیلوس بطور کامل بازداری نمود و جمعیت لیستریا را نسبت به شاهد log ۶ کاهش داد. اسانس ریحان تاثیر ضدمیکربی ضعیف‌تری نسبت به اسانس مریم گلی کبیر نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *آسپرژیلوس فلاووس*، پنیر، ریحان، *لیستریا مونوسیتوژنز*، مریم گلی کبیر

مقدمه

از آنجا که سلامت غذا مساله‌ای بنیادی، از دیدگاه مصرف‌کنندگان مواد غذایی، مراجع قانونی و نیز صاحبان صنایع غذایی می‌باشد و با عنایت به گزارش‌های مرتبط با موارد متعدد عفونت‌ها و مسمومیت‌های حاصل از مواد غذایی آلوده، توجه به ایمنی غذا و نیز ارائه راهکارهایی جهت نگهداری طولانی‌تر مواد غذایی در حال گسترش است. با توجه به تاثیرات منفی نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت، تحقیقات اخیر بر کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بعنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی متمرکز شده است.

اسانس‌های گیاهی مایعات روغنی معطری هستند که از بخش‌های مختلف گیاه بدست آمده و از گذشته بعنوان طعم‌دهنده غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند (Bart, 2004) . مطالعات مختلفی ویژگی‌های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی را تایید نموده و برخی از این ترکیبات نیز در نگهداری مواد غذایی بکار می‌روند (Basti *et al*., 2007). اسانس‌ها با استفاده از ویژگی آبگریزی خود و قابلیت نفوذ به لیپید غشایی وارد سلول میکروارگانیسم شده و موجب خارج شدن یون‌ها و محتویات سلولی می‌شوند. خروج این مواد از سلول، موجب ایجاد اختلال در عملکرد سلولی و در نتیجه مرگ آن می‌شود (Bart., 2004). مریم گلی کبیر (*Salvia sclarea*) و ریحان (*Ocimum basilicum*) گیاهانی علفی از تیره نعناعیان بوده که در سراسر جهان رویشی وسیع دارند. گونه‌های مختلف جنس مریم گلی دارای خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی بوده و در درمان برونشیت، ناراحتی‌های گوارشی و سل مفید هستند. در سال‌های اخیر گزارش شده است که اسانس مریم گلی به دلیل وجود ترکیب ۱و۸- سینئول دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشد (کاظمی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). ریحان در طب سنتی بعنوان خلط‌آور، ضد نفخ، جهت تسکین درد معده و محرک استفاده می‌شود.

۱و ۲- استادیاران، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آمل، ایران.
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، موسسه آموزش عالی خزر، محمودآباد، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: azizkhani.maryam@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

لینالول ، سیترال ، اوژنول ، سینئول ، ژرانیول ، کامفور و متیل سینامات از اجزای مهم اسانس ریحان است. جزء اصلی اسانس اغلب گونه‌های ریحان لینالول می‌باشد که میزان آن در اسانس‌ها بین ۴۰ تا ۶۰ درصد است (داوند سراب و همکاران ۱۳۸۷). ترکیبات اسانس مریم گلی و ریحان توسط کمیسیون اروپایی جهت استفاده به‌عنوان طعم‌دهنده بی‌خطر برای سلامت مصرف‌کننده در موادغذایی به ثبت رسیده است (EC No. 1334/2008).

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری میله‌ای شکل و گرم مثبت بوده و در برابر طیف وسیعی از شرایط نامساعد محیطی از جمله ۱۰ درصد نمک و خشکی مقاوم است (Razavilar *et al*.,1998). عفونت لیستریایی (لیستریوز) اغلب از طریق مصرف آب و غذای آلوده رخ می‌دهد که علایمی شبیه آنفلوانزا، سپتی سمی و مننژیت مخصوصا در نوزادان، خانم‌های باردار، افراد مسن و اشخاص دچار نقص سیستم ایمنی ایجاد می‌نماید. تاکنون موارد متعددی از شیوع لیستریوز در انسان توسط مصرف انواع مواد غذایی مانند شیر و فرآورده‌های لبنی گزارش شده است که بیشترین موارد مشاهده شده مربوط به پنیر نرم ، نیمه نرم و پنیر سفید می‌باشد (Palmer *et a*l.,2001; Millet *et al* 2006). عدم کفایت حرارت پاستوریزاسیون در نابودی کامل این باکتری (در صورتی که جمعیت باکتریایی بیش از 10^3 cfu/ml در شیر باشد) (Palmer *et al*., 2001) و همچنین رشد آن در دمای یخچالی ۴ درجه سانتی‌گراد (نگهداری طولانی مدت پنیرهای آلوده در این دما موجب افزایش تعداد باکتری می‌گردد) اهمیت بررسی این باکتری را بیشتر آشکار می‌سازد (Millet *et al*., 2006).

قارچ‌ها از عوامل مهم فساد موادغذایی در طول انبارداری و ذخیره محسوب می‌شوند که به علت پتانسیل تولید مایکوتوکسین‌ها باعث ایجاد خطرات برای سلامت مصرف‌کننده می‌گردند. بهترین شرایط برای رشد و تولید مایکوتوکسین در این قارچ‌ها در محیط‌هایی با حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بیش از ۸۵ درصد است (Gandomi *et al*., 2009). کنترل قارچ‌ها در صنایع غذایی معمولا با استفاده از نگهدارنده‌های سنتزی مانند سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم انجام می‌شود اما این مواد در اغلب موارد دارای اثرات جانبی مثل سرطان‌زایی و تراتوژنیسیتی (تاثیر منفی بر جنین) ناشی از باقی‌مانده آنها هستند (Mpountoukas *et al*., 2008). خصوصیات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها مورد بررسی قرار گرفته اما اغلب این تحقیقات در محیط آزمایشگاهی انجام شده و بدین ترتیب اطلاعات اندکی پیرامون تاثیر آنها طی دوره نگهداری ماده غذایی در دسترس است (Smith *et a*l., 2001). لذا، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان در برابر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و کپک *آسپرژیلوس فلاووس* در یک مدل غذایی (پنیر سفید ایرانی) طی دوره نگهداری بود.

مواد و روش

تهیه و آنالیز اسانس‌ها

اسانس‌های مورد استفاده از شرکت Pronarom (بلژیک) تهیه گردیده و در تمام مراحل مطالعه از اتانول ۵۰٪ بعنوان حلال اسانس‌ها استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری و کپک

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1298) از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. باکتری لیوفلیزه به محیط کشت BHI Broth[1] منتقل، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و برای حداقل دو مرتبه بطور متوالی تجدید کشت گردید. سپس جهت تهیه میزان تلقیح باکتری از کشت مرحله دوم مقادیر مختلفی به کووت های حاوی 5 میلی لیتر BHI Broth استریل منتقل شده و با استفاده از قرائت جذب نوری (Abs: 0/175 -0/190) در طول موج 600 نانومتر) و شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی، کووت حاوی حدود 10^7 cfu/ml جهت تلقیح به نمونه‌های مورد آزمایش مشخص شد (Basti *et al*., 2007).

کپک *آسپرژیلوس فلاووس* (ATCC 15546) از گروه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. کپک در محیط کشت PDA[2] شیب‌دار به مدت ۱۰ – ۷ روز در ۲۶ درجه سانتی‌گراد، جهت تولید اسپور، گرمخانه‌گذاری گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ به لوله حاوی کپک منتقل و سطح کشت جهت برداشتن اسپور با میله شیشه‌ای خمیده استریل، به آرامی خراش داده شد. بمنظور حذف قطعات میسلیوم موجود در سوسپانسیون از فیلتر نایلونی و برای شمارش اسپورهای قارچی از لام نئوبار استفاده شد. غلظت اسپور توسط محلول ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ به ۱۰۶ اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد (Gandomi *et al*., 2009).

تعیین میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) اسانس‌ها برای *لیستریا مونوسیتوژنز* MIC به کمترین مقدار از یک ترکیب طلاق می‌شود که می‌تواند بطور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص (۱۶ تا ۲۰ ساعت بسته به گونه باکتری) مهار نماید. تعیین MIC به روش میکرو دایلوشن با استفاده از غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. پائین‌ترین غلظتی از اسانس که از رشد باکتری و ایجاد کدورت جلوگیری نمود بعنوان MIC تعیین شد.

1 Brain Heat Infusion
2 Potato Dextrose Agar

www.SID.ir

Archive of SID

MBC به کمترین غلظت از اسانس اطلاق می‌شود که می‌تواند پس از گذشت ۲۴ ساعت جمعیت باکتریایی را به میزان ۹۹ درصد کاهش دهد. جهت تعیین MBC از غلظت‌هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشد در پلیت BHI آگار کشت سطحی داده شد. غلظتی که شمارش تعداد کلونی‌ها در آن صفر بود، بعنوان MBC تعیین شد (عزیزخانی و همکاران،۱۳۹۱؛ Tzortzakis *et al*., 2007).

تعیین میزان MIC و حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌ها برای *آسپرژیلوس فلاووس*

محیط مذاب PDA استریل حاوی غلظت های مختلف اسانس‌ها تهیه و به ازای هر غلظت در سه پلیت توزیع شد. یک دیسک ۵ میلی‌متری کاغذ واتمن شماره ۱ در مرکز پلیت قرار داده شد و با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور (حاوی ۱۰۶ اسپور در میلی‌لیتر) تلقیح گردید. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و قطر کلنی هر ۲۴ ساعت اندازه‌گیری گردید تا زمانی که در گروه شاهد (فاقد اسانس) تمام قطر پلیت توسط قارچ پوشانده شد. دیسک‌ها از پلیت‌های فاقد رشد به محیط فاقد اسانس منتقل و همانند بالا گرمخانه‌گذاری شد تا اثر بازدارندگی و قارچ‌کشی تعیین گردد. کمترین غلظتی از اسانس که از رشد کپک جلوگیری نمود بعنوان MIC و پائین‌ترین غلظتی که موجب کشته شدن کپک گردید بعنوان MFC در نظر گرفته شد. همه مراحل در سه تکرار انجام شد (Gandomi *et al*., 2009). اثر ضدقارچی اسانس‌ها برحسب درصد مهارکنندگی رشد کلنی از فرمول زیر (Soliman *et al*., 2002) محاسبه گردید:

$$MIC = \frac{Dc - Ds}{Dc} \times 100 \quad (۱)$$

D_C: قطر کلونی در شاهد

D_s: قطر کلونی در نمونه تیمار شده

ارزیابی تولید اسپور

۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به پلیت‌های PDA حاوی غلظت‌های مختلف اسانس ها تلقیح و در تمام سطح محیط پخش شد. پلیت ها در ۲۶ درجه به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری شدند. اسپورهای تولید شده در هر پلیت جمع‌آوری، به ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ منتقل و سوسپانسیون به شدت تکان داده شد. تعداد اسپورها در هر سانتی‌متر مربع از پلیت با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. درصد مهارکنندگی تولید اسپور از رابطه زیر محاسبه گردید (Tzortzakis *et al*., 2007):

$$I(\%) = \frac{Nc - Ns}{Nc} \times 100 \quad (۲)$$

Nc: تعداد اسپور در شاهد

Ns: تعداد اسپور در نمونه تیمار شده

تهیه نمونه‌های پنیر و ارزیابی رشد باکتری و قارچ در پنیر

نمونه‌های پنیر سفید ایرانی در یک واحد تولیدی در استان مازندران تهیه شد. پس از انجام مراحل حرارت‌دهی شیر (پاستوریزاسیون در ۲±۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سرد کردن شیر تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد)، میزان تلقیح باکتریایی مورد نظر (10^4باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در هرمیلی‌لیتر) به شیر اضافه گردید. رنت یا مایه پنیر توسط پمپ به مخزن رنت‌زنی (میزان مایه پنیر استفاده شده ۳/۲۵ درصد بود) هدایت شده، سپس ترکیبات ضدکف اضافه و در ظروف پلی‌اتیلنی استریل پر شد. در این مرحله غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد از هر یک از اسانس‌های مریم گلی و ریحان به شیر حاوی باکتری اضافه (نمونه فاقد اسانس بعنوان کنترل در نظر گرفته شد) و به سرعت جهت مخلوط شدن، همزده شد، سپس مجددا آنتی‌فوم (ضد کف) اسپری گردید. پس از آن مخلوط به تونل انعقاد منتقل شد، زمان عبور از تونل ۱۵ دقیقه بود. سپس ظروف حاوی پنیر به روی نقاله خروجی منتقل و پس از پاشش نمک به میزان ۲/۵ درصد و قرار دادن پوشش کاغذی (پارچمنت) روی پنیر، با فویل آلومینیومی دربندی شدند. در مرحله بعدی، تاریخ‌گذاری توسط دستگاه جت پرینتر انجام گرفت. نمونه‌های پنیر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در روزهای ۰، ۱، ۲، ۳ و پس از آن تا روز ۲۱ با فاصله‌های زمانی ۴۸ ساعته جهت شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* روی محیط آگار انتخابی لیستریا (پالکام) مورد آزمایش قرار گرفتند (مشتاقی و همکاران،۱۳۸۷).

به گروه دیگر از نمونه‌های پنیر (تلقیح نشده با *لیستریا مونوسیتوژنز*) حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد از اسانس‌ها (پس از قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش به مدت ۳۰ دقیقه و انجام آزمایش جهت اطمینان از عدم وجود *آسپرژیلوس فلاووس*) اسپور کپک *آسپرژیلوس فلاووس* تلقیح شد. بطور خلاصه، جهت ارزیابی رشد قارچ، پنیر به قطعاتی با قطر ۸ میلی‌متر بریده و در یک پلیت قرار شد. ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور (۱۰۶ اسپور در میلی لیتر) به مرکز قطعات اضافه و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. میانگین دو قطر عمود بر هم کلنی قارچی هر ۲۴ ساعت محاسبه شد (Gandomi *et al*., 2009). پنیر تولیدی حاوی ۱۵ تا ۱۷ درصد چربی و ۱۰ تا ۱۴ درصد پروتئین بود.

ارزیابی حسی

ارزیابی حسی توسط یک پانل هفت نفره صورت پذیرفت. برای ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های پنیر حاوی غلظت‌های مختلف از اسانس‌های مورد مطالعه از تست پذیرش حسی استفاده شد. برای این

www.SID.ir

Archive of SID

منظور پنیر فاقد میکروارگانیسم، تهیه شده با غلظت‌های مختلف اسانس‌های مورد مطالعه به هفت قسمت تقسیم گردید. اعضای پانل معیارهای ارزیابی حسی (شامل طعم، بو و قوام) پنیر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس‌های ریحان و مریم گلی را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره‌ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتا خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتا بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و در نهایتا نمره ۱ فوق العاده بد، لحاظ گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این مطالعه در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار سطح مختلف از دو اسانس ریحان و مریم گلی، صفر ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد، اجرا شد. داده های تجربی با استفاده از نرم افزار SPSS 19.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت میانگین± انحراف معیار از سه تکرار مستقل نشان داده شد. داده های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس ($p< ۰/۰۵$) تحلیل و تفاوت معنی دار بین میانگین ها توسط تست چند دامنه ای دانکن مشخص گردید.

نتایج و بحث

افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌ها نسبت به ترکیبات ضد میکربی سنتزی مورد استفاده در مواد غذایی که تاثیرات سوء بر سلامت مصرف کننده می گذارد، سبب تلاش هر چه بیشتر محققان جهت یافتن ترکیبات ضدمیکربی جدید و حتی الامکان طبیعی، همانند انواع گیاهان دارویی، گردیده است. اسانس های گیاهی منابع بالقوه ترکیبات ضد میکربی می باشند(Bagamboula *et al.*, 2004). ترکیبات طبیعی مشتق‌شده از گیاهان از گذشته در کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در موادغذایی بکار رفته اند (Valero & Salmeron, 2003). درصد ترکیبات مهم اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه (که توسط GC و GC/MS تعیین شد) در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. طبق نتایج GC/MS، ۲۳ ترکیب برای اسانس ریحان و ۳۴ ترکیب برای اسانس مریم گلی کبیر شناسایی شد. مطابق نتایج حاضر، ترکیب اصلی اسانس مریم گلی شامل لینالیل استات (۵۲/۸۳٪)، لینالول (۱۸/۱۸٪) و آلفا–ترپینئول (۵٪) و اسانس ریحان شامل لینالول (۵۸/۶۳٪)، آلفا–کادینول (۱۰/۰۱٪) و آلفا–برگاموتن (۷/۶۲٪) بود.

MIC و MBC اسانس مریم گلی کبیر معادل به ترتیب ۰/۰۱۵٪ و ۰/۰۲٪ و اسانس ریحان برابر با، به ترتیب، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۶٪ در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* بود. همچنین، MIC و MFC در برابر *آسپرژیلوس فلاووس* برای اسانس مریم گلی کبیر معادل، به ترتیب، ۰/۵٪ و ۰/۶۵٪ و برای اسانس ریحان برابر با ۰/۶٪ و ۰/۸٪ بدست آمد (جدول ۲). غلظت ۰/۳۵٪ اسانس مریم گلی کبیر و غلظت ۰/۵٪ اسانس ریحان از تولید اسپور توسط قارچ در محیط کشت جلوگیری نمود (جدول ۲).

جدول ۱- ترکیبات عمده اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان

ترکیب	میزان (درصد)	ترکیب	میزان (درصد)
۱و۸،سینئول	۱/۱۴	آلفا- پینن	۴/۵۷
لینالول	۵۸/۶۳	لیمونن	۱/۵۵
کامفور	۳/۱۱	۱و ۸- سینئول	۲/۲۹
آلفا- ترپینئول	۱/۰۷	لینالول	۱۸/۱۸
بتا-کاریوفیلین	۱/۴۰	آلفا- ترپینئول	۵/۰
آلفا- برگاموتین	۷/۶۲	لینالیل استات	۵۲۰/۸۳
ژرماکرین دی	۲/۰۵	بتا- کاریوفیلین	۱۰/۸۳
گاما-کادینن	۴/۹۲	بتا- میرسین	۱/۰۱
ویریدیفلورول	۳۱/۶	بتا- ترپینئول	۱/۱۹
کادینول (اپی مر آلفا)	۱۰/۰۱	-	-

جدول ۲- تاثیر اسانس های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد و تولید اسپور توسط *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کشت

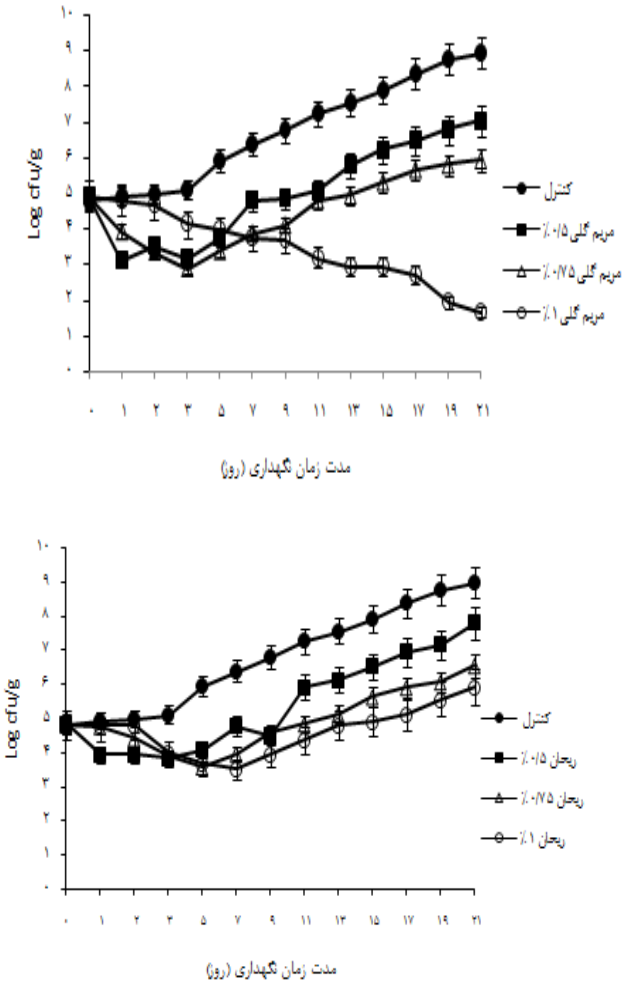
غلظت اسانس (٪)	رشد		تولید اسپور	
	قطر هاله کلنی (mm)	بازداری (٪)	تعداد ($\times ۱۰^۷$ اسپور /cm^2)	بازداری (٪)
مریم گلی‌کبیر				
۰	۱۰۲ ± ۱/۵	۰[a]	۱/۹ ± ۰/۲	۰[a]
۰/۳	۷۵/۲ ± ۱/۹	۲۶/۲[b]	۰/۶۵ ± ۰/۰۳	۶۵/۷[b]
۰/۳۵	۴۹ ± ۰/۸	۵۱/۹[c]	۰	۱۰۰[c]
۰/۴۰	۲۳/۱ ± ۲/۶	۷۷/۳[d]	۰	۱۰۰[c]
۰/۴۵	۵/۳ ± ۰/۷	۹۴/۸[e]	۰	۱۰۰[c]
۰/۵۰	فاقد رشد	۱۰۰[f]	۰	۱۰۰[c]
۰/۵۵	فاقد رشد	۱۰۰[f]	۰	۱۰۰[c]
۰/۶۰	فاقد رشد	۱۰۰[f]	۰	۱۰۰[c]
۰/۶۵	فاقد رشد	۱۰۰[f]	۰	۱۰۰[c]
ریحان				
۰	۱۰۲ ± ۱/۵	۰[a]	۱/۹ ± ۰/۲	۰[a]
۰/۴۵	۹۱/۵ ± ۲/۲	۱۰/۲[b]	۰/۹۷ ± ۰/۰۵	۴۸/۹[b]
۰/۵۰	۶۸/۶ ± ۱/۳	۳۲/۷[c]	۰	۱۰۰[c]
۰/۵۵	۳۳/۲ ± ۱/۵	۶۷/۴[d]	۰	۱۰۰[c]
۰/۶۰	فاقد رشد	۱۰۰[e]	۰	۱۰۰[c]
۰/۶۵	فاقد رشد	۱۰۰[e]	۰	۱۰۰[c]
۰/۷۰	فاقد رشد	۱۰۰[e]	۰	۱۰۰[c]
۰/۷۵	فاقد رشد	۱۰۰[e]	۰	۱۰۰[c]
۰/۸۰	فاقد رشد	۱۰۰[e]	۰	۱۰۰[c]

اسانس مریم گلی کبیر تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر نشان داد ($p< ۰/۰۵$) بطوری که غلظت ۰/۷۵٪

www.SID.ir

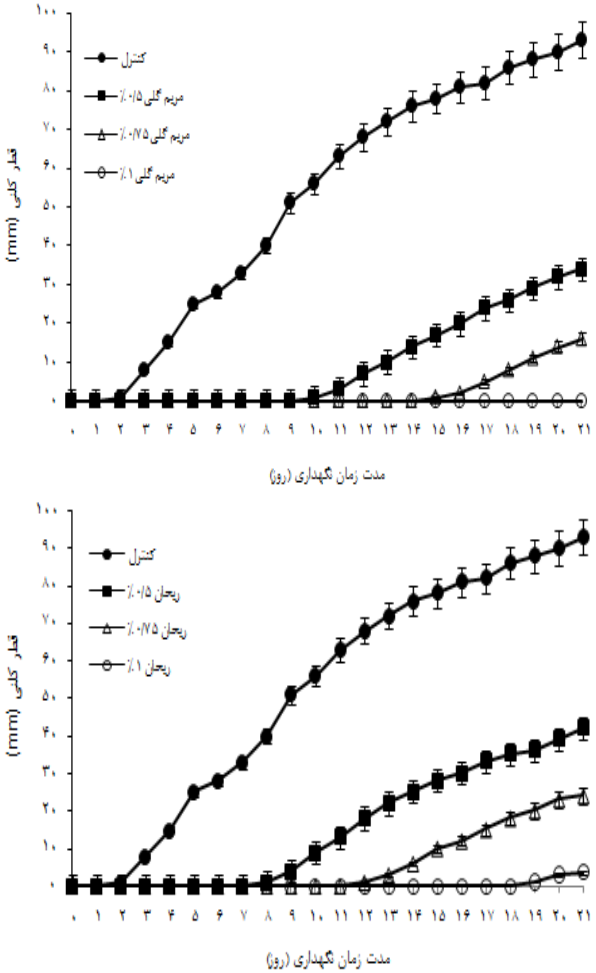
Archive of SID

و ۱٪ اسانس در مقایسه با نمونه شاهد، جمعیت لیستریایی را، به ترتیب، بیش از ۳ log cfu/g و ۶ log cfu/g در آخرین روز دوره نگهداری پنیر (روز ۲۱) کاهش داد($p< ۰/۰۵$) (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تاثیر بازدارندگی اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر در برابر باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر طی دوره ۲۱ روزه نگهداری به طور قابل ملاحظه‌ای پائین‌تر بود ($p< ۰/۰۵$). با این حال، قابلیت بازداری غلظت ۱٪ اسانس ریحان جمعیت لیستریایی را نسبت به نمونه شاهد اندکی بیش از ۳ log cfu/g کاهش داد($p< ۰/۰۵$).



شکل ۱- تاثیر اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر

مطابق شکل ۲، تمام غلظت‌های مورد استفاده اسانس‌ها دارای اثر مهارکنندگی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بودند ($p< ۰/۰۵$). نتایج حاصل نشان می‌دهد که این تاثیر دارای الگوی وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت اسانس‌ها اثر مهارکنندگی افزایش می‌یابد، بطوری که غلظت ۰/۵٪ اسانس مریم گلی کبیر تا ۹ روز از رشد کپک بازداری نمود و در غلظت ۰/۷۵٪ این اسانس تا روز چهاردهم هیچ رشدی مشاهده نشد وپس از آن نیز سرعت رشد نسبت به نمونه شاهد بطور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود($p< ۰/۰۵$). در غلظت ۰/۷۵٪ اسانس مریم گلی کبیر، مهار رشد کپک در مقایسه با شاهد به ۸۲/۸٪ در آخرین روز دوره نگهداری پنیر (روز ۲۱) رسید. غلظت ۱٪ دارای ۱۰۰٪ اثر مهارکنندگی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بوده و طی ۲۱ روز دوره نگهداری هیچ رشدی از کپک در نمونه پنیر مشاهده نشد. اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم گلی کبیر دارای فعالیت ضدقارچی کمتری بوده ($p< ۰/۰۵$) اما بطور کلی، رشد کپک را تا ۱۱ روز در غلظت ۰/۷۵٪ و تا ۱۸ روز در غلظت ۱٪ مهار نمود. اثر مهارکنندگی غلظت ۱٪ اسانس ریحان در روز ۲۱ برابر با ۹۶/۲٪ بود که دارای اختلاف معنی‌داری با اثر بازدارندگی غلظت ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر (۱۰۰٪) می باشد ($p< ۰/۰۱$).



شکل ۲- تاثیر اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در پنیر

گیاهان خانواده نعناع به سبب دارا بودن ترکیبات ترپنوئیدی

www.SID.ir

Archive of SID

گوناگون، اسانس و ترکیبات فنلی از جنبه اثرات ضدمیکربی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته اند. مطالعه حاضر فعالیت ضد میکربی اسانس‌های مریم گلی کبیر و ریحان را در محیط کشت و در مدل غذایی (پنیر) آشکار ساخت. فعالیت ضد لیستریایی برخی از اسانس‌ها در محیط کشت و در نمونه‌های غذایی در تحقیقات پیشین گزارش شده است (Abdollahzadeh *et al*., 2014; Saddam, 2013; Sandasi *et al*., 2008). همچنین، فعالیت ضدمیکربی اسانس‌های مریم گلی و ریحان در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد، مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس ائروجینوزا*، *شیگلا دیسانتری*، *باسیلوس سرئوس*، *پروتئوس وولگاریس*، *اشرشیاکلی*، گونه های ویبریو، *سالمونلا تیفی موریوم* و چند مخمر و کپک، با حداقل غلظت بازدارندگی >۲/۵-۰/۵٪ برای مریم گلی (Kuzma *et al*., 2009; Perini *et al*., 2014) و ۵-۰/۰۳٪ برای ریحان (Adeola *et al*., 2012; Adiguzel *et al*., 2005; Moghaddam *et al*., 2011) مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. عمده این مطالعات در شرایط آزمایشگاهی انجام و کمتر به نمونه‌های غذایی پرداخته شده است. در این مطالعه، اثر ضد لیستریایی اسانس مریم گلی کبیر قوی‌تر از اسانس ریحان بود. مقدار اسانس لازم برای اعمال تاثیر مهارکنندگی و کشندگی برای باکتری و کپک متفاوت بود و بطور مثال MIC بدست آمده برای کپک بسیار بالاتر از MIC باکتری در مورد هر دو اسانس بود. بطورکلی تاثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها بر رشد میکروارگانیسم‌ها نشان داد که باکتری در مقایسه با کپک در برابر اسانس‌های مورد استفاده در این مطالعه حساس‌تر است که این نتیجه با نتایج ایزدی و همکاران (۱۳۸۸) و Sing (۲۰۰۰) منطبق است.

با وجود اینکه اسانس ریحان از رشد هیچ کدام از دو میکروارگانیسم مورد بررسی بطورکامل بازداری نکرد، لیکن این اسانس رشد و تکثیر *لیستریا مونوسیتوژنز* را به خصوص در غلظت ۱٪ در پنیر محدود نمود. غلظت ۰/۷۵٪ و ۱٪ اسانس ریحان به ترتیب تا روز هفتم و نهم رشد باکتری را کاهش داده و پس از این مدت باکتری مجددا شروع به تکثیر نمود. علت این امر ممکن است به خارج شدن ترکیبات ضدمیکربی فرار از بافت پنیر مرتبط باشد. در زمینه ایمنی مواد غذایی، ایجاد چنین تاخیری در رشد میکروارگانیسم طی نگهداری کوتاه مدت محصولات غذایی مفید بنظر می‌رسد زیرا در نگهداری طولانی مدت بدون حضور عوامل ضدمیکربی، جمعیت لیستریایی به سطح بالایی خواهد رسید. غلظت ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر بطور قابل ملاحظه‌ای رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* را در پنیر نسبت به نمونه شاهد کاهش داد (بیشتر از log ۶) اما در این غلظت قادر به کشتن کل جمعیت باکتری در مدل غذایی نبود. در سایر مطالعات، غلظت ۰/۰۴٪ اسانس زیره سبز (فضل آرا و همکاران، ۱۳۹۱) جمعیت *لیستریا مونوسیتوژنز* را در پنیر سفید ایرانی پس از ۱۵ روز نگهداری به میزان log ۱ کاهش داد و از این روز به بعد باکتری از نمونه جدا نشد.

همچنین در مطالعه مشاک و همکاران (۱۳۸۷) غلظت ۰/۰۱۵٪ اسانس آویشن شیرازی موجب کاهش رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در پنیر سفید ایرانی و در مطالعه Vrinda و همکاران (۲۰۰۱)، غلظت ۱-۰/۵٪ اسانس میخک موجب کاهش رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* به میزان log ۳-۱ در پنیر موزارلا گردید. احتمال می‌رود با توجه به روند کاهش رشد باکتری با افزایش غلظت اسانس، استفاده از غلظت‌های بالاتر از ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر موجب توقف کامل تکثیر یا کشتن باکتری گردد لیکن ممکن است باعث ایجاد طعم نامطلوب در پنیر شود.

کپک‌ها از مهمترین عوامل فساد در انواع پنیر می‌باشند (Elsie *et al*., 2014) در مطالعه حاضر، قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* در نمونه پنیر شاهد به ۹۳ mm در پایان دوره ۲۱ روزه نگهداری در ۲۶ درجه سانتی‌گراد رسید، در حالی که قطر کلنی در نمونه حاوی ۱٪ اسانس ریحان ۳/۵ mm بود. هیچ رشدی از *آسپرژیلوس فلاووس* در نمونه حاوی ۱٪ اسانس مریم گلی کبیر در کل دوره نگهداری مشاهده نشد. فعالیت اسانس‌های مختلف در بازداری از رشد و اسپورزایی قارچ‌ها در مطالعات قبلی گزارش شده است (Gandomi *et al*., 2009; Kuate *et al*., 2006; Pawar and Thaker, 2006) Tataoui-Elaraki و همکاران (۱۹۹۳) در تحقیقات اولیه خود تاثیر سه اسانس مراکشی را بر تولید اسپور قارچی بررسی و گزارش نمودند که بخشی از فعالیت بازداری از تولید اسپور می‌تواند به تخریب میسیلیوم و بازداری از رشد قارچ مربوط باشد. Mahanta و همکاران (۲۰۰۷) پیشنهاد نمودند که تاثیر اسانس‌ها بر تولید اسپور، حاصل پخش‌شدن ترکیبات فرار اسانس در سطح میسیلیوم و آسیب به آن می باشد. در مطالعه دیگر، غلظت ۰/۱٪ اسانس آویشن شیرازی، در مقایسه با نمونه شاهد ، به میزان ۷۵/۴٪ از رشد و تولید اسپور توسط *آسپرژیلوس فلاووس* در پنیر سفید ایرانی بازداری نمود (Gandomi *et al*., 2009). در مطالعه حاضر، اسانس مریم گلی کبیر فعالیت ضدمیکربی بیشتری از اسانس ریحان نشان داد. مطابق جدول ۱، ترکیبات اصلی اسانس مریم گلی کبیر لینالیل استات و لینالول و ترکیبات اصلی اسانس ریحان شامل لینالول بود. مطالعات Tadtong و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که لینالیل استات و لینالول در حضور یکدیگر تاثیر سینرژیستی ضدمیکربی نشان داده و نیز موجب افزایش تاثیر سایر ترکیبات فعال نیز می‌گردند. علت تاثیر ضدمیکربی قوی‌تر اسانس مریم گلی کبیر نسبت به اسانس ریحان می‌تواند به وجود توام این دو ترکیب در مجموعه ترکیبات گیاه مریم گلی مربوط باشد.

مطابق نتایج آزمون های حسی، غلظت‌های ۰/۷۵ و ۱ درصد اسانس ریحان در پنیر، از لحاظ شاخص طعم بالاترین امتیاز پذیرش را از نظر اعضای گروه پانل دریافت کردند. اسانس ریحان در مقایسه با اسانس مریم‌گلی کبیر امتیاز بالاتری از لحاظ شاخص‌های حسی

www.SID.ir

Archive of SID

داشت. نتایج مطالعه نشان می‌دهد که کاربرد اسانس مریم گلی کبیر یا اسانس ریحان در پنیر سفید ایرانی، می تواند سبب سلامت این فرآورده و کاهش رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* و *آسپرژیلوس فلاووس* در پنیر گردد. لازم به ذکر است که انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بخصوص استفاده توام انواع اسانس‌های گیاهی با توجه به ترکیبات تشکیل‌دهنده جهت بهره‌گیری از تاثیر تقویت‌کنندگی و سینرژیستی آنها بمنظور ممانعت از رشد پاتوژن‌ها در مدل‌های غذایی و نیز بررسی تاثیر این اسانس‌ها بر ویژگی‌های ارگانولپتیکی انواع مواد غذایی ضروری بنظر می‌رسد.

قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنت) دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل انجام شده است. بدینوسیله از حمایت های مالی معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل صمیمانه قدردانی می شود .

منابع

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. & Hosseini, H., 2014, Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183.

Adeola, S.A., Folorunso, O.S. & Amisu, K.O., 2012, Antimicrobial Activity of Ocimum Basilicum and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of Salmonella typhimurium. *Research Journal of Biology*, 2, 138-144.

Adiguzel, A., Gulluce, M., Sengul, M., Ogutcu, H., Sahin, F. & Karaman, I., 2005, Antimicrobial Effects of Ocimum basilicum (Labiatae) Extract. *Turkish Journal of Biology*, 29,155-160.

Azizkhani, M., Misaghi, A., AkhondzadehBasti, A., GandomiNasrabadi, H. & Hosseini, H., 2012, Effect of Zataria essential oil on growth and enterotoxin E production of Staphylococcus areus ATCC 29213, *Journal of Medicinal Herbs*, 4(44), 184-193.

Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. & and Debevere, J., 2004, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S.flexeneri. *Food Microbiology*, 21,32-42.

Bart, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International *Journal of Food Microbiology,* 94 (3), 223 -253.

Basti,.A.A., Misaghi, A. & Khaschabi, D., 2007, Growth response and modeling of the effects of Zataria multiflora Boiss essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. *Food Science and Technology*, 40, 973-981.

Davandsarab, M., Naghdibadi, H., Nasri, M., Makizadeh, M. &Omidi, H., 2008, Changing of essential oil content and function of Ocimumbasilicum affected by density and nitrogen fertilizer, *Journal of Medicinal Herbs*, 3(27), 60-70.

Elsie, Y.L., Cheong, A.S., Jayaram, J., Thu, T.K.L., Nhiep, N.T., Huong, T.M.H., Zwielehner, J., Nidhi, B., Bansal, M. & Turner, S., 2014, Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould Penicillium commune and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91-97.

Fazlara, A., Sadeghi, A. &Soleimani, P., 2012, Antibacterial effect of cumin essential oil on Listeria monocytogenes in Iranian white cheese, *Journal of Food Science and Technology*, 9(35), 35-43.

Gandomi, H. , Misaghi, A., Basti, A.A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A. & Jebelli Javan, A., 2009, Effect of zataria multiflora boiss essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. *Food and chemical toxicology*, 47, 2397- 2400.

Izadi, Z., Ahmadvand, G., Asnaashari. M., Piri, k. &Davoodi, P., 2009, Biochemical and antimicrobial activity of salvia and peppermint essential oils, *Journal of ArmaghnDanesh*, 16(1), 19-29.

Kazemizadeh, Z., Habibi, Z., Yusefzadeh, M., Ashabi, M. &HeidariReikan, M., 2009, Chemical composition and antibacterial activity of salvia essential oil planted in West Azerbayjanprovince,*Journal of Medicinal Herbs*, 1(33), 75-82.

Kuate, J., Foko, J., Ndindeng, S.A., Jazet-Dongmo, P.M., Foure, E., Damesse, F., Manga, B. & Ducelier, D., 2006, Effect of essential oils from citrus varieties on in vitro growth and sporulation of Phaeoramularia angolensis causing citrus leaf and fruit spot disease. European Journal of Plant Pathology, 114, 151–161.

Kuźma, L., Kalemba, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U. & Wysokińska. , H., 2009, Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil from Salvia sclarea. Plants Regenerated in vitro. *Molecules*, 14, 1438-1447.

Mahanta, J.J., Chutia, M., Bordoloi, M., Pathak, M.G., Adhikary, R.K. & Sarma, T.C., 2007, Cymbopogon citratus L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of Pleurotus spp. spawns. *Flavour and Fragrance Journal,* 22, 525–530.

www.SID.ir

Archive of SID

Mashak, Z., Moradi, B., AkhondzadrhBasti, A., Abbasifar, A. &Gandomi, H., 2008, Listeria monocytogenes behavior during production of Iranian white cheese containing zataria essential oil, *Journal of Medicinal Herbs*, 1(29), 115-122.

Millet, L., Saubusse, M., Didienne, R., Tessier, L. & Montel, M.C., 2006, Control of Listeria monocytogenes in raw-milk cheeses. *Food Microbiology*, 108 (1), 105-١14.

Moghaddam, A.M.D., Shayegh, J., Mikaili, P. & Shara., J.D., 2011, Antimicrobial activity of essential oil extract of Ocimum basilicum L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3453-3456.

Moshtaghi, H. &Bonyadian, M., 2008, Antilisterial effect of Menthaspicata essential oil in a food model, *Journal of Medicinal and Aromatic plants*, 3(24), 326-332.

Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. & Lialiaris, T., 2008, Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. Food and Chemical Toxicology, 46, 2390-2393.

Palmer, A.S., Steward, J. & Fyfe, L., 2001, The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463–470.

Pawar, V.C. & Thaker, V.S., 2006, In vitro efficacy of 75 essential oils against Aspergillus niger. *Mycoses*, 49, 316–323.

Perini, S., Piccoli, R.H., Nunes, C.A., Bruhn, F. R. P., Custódio, D. A. C. & Costa, G. M., 2014, Antimicrobial activity of essential oils against pathogens isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4 (2), 1-6.

Razavilar, V. & Genigeorgis, C., 1998, Prediction of Listeria spp. growth as affected by various levels of chemicals, pH, temperature and storage time in model broth. *Food Microbiology*, 40, 149 - 157.

Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council on flavorings and certain food ingredients with flavoring properties for use in and on foods.

Saddam, S., 2013, Efficacy of Fir and Qysoom essential oils, alone and in combination, in controlling Listeria monocytogenes in vitro and in RTE meat products model. *Food Control*, 34(2), 657-661.

Sandasi, M., Leonard, C.M. & Viljoen, A.M., 2008, The effect of five common essential oil components on Listeria monocytogenes biofilms. *Food Control*, 19(11), 1070-1075.

Sing, M., 2000, Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour and Fragrance Journal, 31, 175-179.

Smith, P., Stewart, J. & Fyfe, L.,2001, The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463- 470.

Soliman, K.M. & Badeaa, R.I., 2002, Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. .*Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675.

Tadtong, S., Suppawat, S., Tintawee, A., Saramas, P., Jareonvong, S. & Hongratanaworakit, T., 2012, Antimicrobial activity of blended essential oil preparation .*Natural Product Communications*, 7(10), 1401-1404.

Tataoui-Elaraki, A., Ferhout, H. & Errifi, A., 1993, Inhibition of fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 5, 535–545.

Tzortzakis, N.G. & Economakis, C.D., 2007, Antifungal activity of lemongrass (Cympopogon citratus L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 253–258.

Valero, M. & Salmeron, M.C., 2003, Antibacterial activity of 11 essential oils against Bacillus cereus in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81.

Vrinda, M.K. & Grag, R., 2001, Inhibitory effect of clove oil on Listeria monositogens in meat and Cheese. *Food Microbiology*, 18, 647 - 650.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 2, June. July. 2016, p. 286- 295

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۵ ص.۲۹۵-۲۸۶

Effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia sclarea* essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese

M. Azizkhani[1*], F. Tooryan[2], M. Boreiri[3]

Received: 2014.09.08
Accepted: 2014.12.25

[1]Introduction: Mold growth on cheese is a common problem for cheese manufacturers during ripening and curing, as well as for the retailer and consumer during refrigerated storage. *Listeria monocytogenes* has gained increasing attention as a pathogen of public health importance owing to large numbers of foodborne outbreaks of listeriosis. Ingested by mouth, *Listeria* is among the most virulent of foodborne pathogens with up to 20% of clinical infections resulting in death. Various types of foods, mostly dairy products such as cheese, have been associated with these outbreaks and there is considerable interest in stopping this upward trend. As a result of the negative consumer perception of chemical preservatives, attention is shifting towards natural alternatives. A technique that has been used since ancient times to prevent fungal growth on foods such as cheese involves physically rubbing the product with certain herbs or spices or their oils. Therefore, regarding to the harmful effects of synthetic preservatives on consumers' health, there is an increasing attention, both in food industry and authorities, to medicinal and aromatic plants as natural preservatives in food products. In this research, the effect of salvia and basil essential oils (EOs) on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese has been investigated.

Materials and method: Commercially available EOs from basil and salvia were used in this study (Pranarôm International, Ghislenghien, Belgium). EOs were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). A broth microdilution assay was employed to determine the lowest concentration (MIC) in which visible growth of the bacterium is inhibited. The concentration of EO present in those wells that yielded plates with no visible colonies was considered to be the minimum bactericidal concentration (MBC). The effects of EOs on radial growth of fungal mycelium were assayed using an agar dilution method. The lowest concentration which inhibited the growth of the fungus was considered to be the minimum inhibitory concentration (MIC) whereas the lowest concentration of EO which killed the fungus (no growth observed on fresh medium) was taken to be minimum fungicidal concentration (MFC). Iranian ultra-filtered white cheese was produced in a commercial factory with different concentrations of EOs and the effects of EOs on bacterial and fungal growth in cheese during shelf-life were determined. Also, eight trained panellists performed sensory analyses. The panellists scored for colour, odour, flavour, overall acceptability and texture using a 9-point hedonic scale (1, dislike extremely to 9, like extremely).

Results and Discussion: Main components of salvia EO included linalyl acetate and linalool and of basil EO consisted of linalool and α-cadinol. The MIC and MBC of salvia were obtained %0.015 and %0.02 and of basil %0.05 and %0.06, respectively, against *L. monocytogenes*. In the current report, *L. monocytogenes* was neither eliminated nor completely inhibited by basil EO, but salvia EO was able to inhibit its proliferation in cheese. The effect was even more pronounced with 1% salvia oil compared to 0.5% or 0.75%. Basil EO at a concentration of 1% caused a 7-day delay in the growth of *L. monocytogenes*. A growth delay of this type is particularly useful in terms of food safety for the short-term storage of products but not on prolonged storage as *Listeria* may reach high levels in foods over longer periods. MIC and MFC of salvia were %0.5 and %0.65, and of basil % 0.6 and %0.8, respectively, against *A. flavus*. At %0.35 and %0.5 the sporulation was inhibited by salvia and basil EOs, respectively. In the present study, no growth of *A. flavus* was observed in the presence of 1% of salvia EO, and colony diameter attained less than 5mm by the 21st day of cold storage in cheese samples treated with 1% basil EO. Also, the bacterial growth reduced up to 6 log cfu/g of cheese. EO of basil showed weaker antimicrobial effect compared to salvia EO. Cheese samples with different concentrations of EOs were

1 And 2- Assistant Professors, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
3- Msc student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Khazar Institute of Higher Education, Mahmoudabad, Iran.
(*Corresponding author: azizkhani.maryam@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

evaluated and compared to the control sample to ascertain consumer acceptability for it. Significant differences were detected among samples containing EOs and the control sample in odour, color and texture, but the samples containing 0.75% and 1% of salvia EO were significantly impaired in both odour and taste as compared with the other samples. With regard to the overall acceptability, the cheese sample containing 0.75% of basil EO was the highest acceptable sample. Generally, it is well known that in complex systems such as cheese, several ingredients interact with each other and affect the sensory properties.

In conclusion, the EO of salvia showed the greatest effect on limiting microbial growth. Both EOs could have potential for commercial use in improving the preservation of these products without the need for propionates or other synthetic additives. Further research could examine the utility of the combined application of basil and salvia EOs in different dairy products such as different types of cheese, as well as the use of different quantities/ratios for optimization of their antimicrobial effects.

Keywords: Cheese, *Ocimum basilicum, Salvia sclarea, Listeria monocytogenes*, *Aspergillus flavus*

www.SID.ir