بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس میخک در همبرگر خام طی نگه‌داری در انجماد

سید ابراهیم حسینی[1*]، شاهرخ شعبانی[2]، فاطمه دلفان آذری[3]

۱- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- مربی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- دانش‌آموخته علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: Ebhoseini@srbiau.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۲/۸/۹ پذیرش نهایی: ۹۴/٤/١٤)

چکیده

امروزه سلامت مواد غذایی در برابر عوامل بیماری‌زا و نیز جایگزینی ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌ها به جای نگه‌دارنده‌های شیمیایی در مواد غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس میخک بر ویژگی‌های میکروبی همبرگر طی دوره نگه‌داری در فریزر است. گیاه میخک با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس بر روی میکروارگانیسم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای*، *کاندیدا آلبیکانس* و *آسپرژیلوس نایجر* تعیین شد. سپس اثر ضدمیکروبی غلظت‌های ۰/۰۰۱۵٪ ، ۰/۰۱٪ ، ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ اسانس در روزهای صفر، ۷، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نگه‌داری همبرگر در انجماد بررسی گردید. نمونه‌ها با روش هدونیک از نظر ویژگی‌های حسی بررسی شدند. نتایج حاصل از آزمون MIC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۱٪، *اشریشیا کولای* ۰/۰۶۵٪، *کاندیدا آلبیکانس* ۰/۰۳٪ و *آسپرژیلوس نایجر* ۰/۰۱٪ حجمی- حجمی به‌دست آمد. نتایج آزمون‌های میکروبی نشان داد، با افزایش غلظت اسانس میخک و افزایش زمان نگه‌داری در فریزر، میزان بار میکروبی کاهش بیشتری نشان می‌دهد. هم‌چنین نتایج آزمون حسی در غلظت‌های ۰/۰۰۱۵٪ و حداکثر ۰/۰۱٪ پذیرش بیشتری را برای ارزیابان حسی داشت.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدمیکروبی، اسانس میخک، همبرگر

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

هدف از نگه‌داری مواد غذایی، ممانعت از بروز فساد توسط عوامل خارجی و داخلی و یا به تعویق انداختن آن می‌باشد که در نتیجه آن مواد غذایی بتوانند برای مدت معینی قابل مصرف باقی بمانند. با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در مورد عوارض استفاده از برخی روش‌های ازدیاد زمان ماندگاری و تضمین سلامت غذا به‌ویژه در خصوص استفاده از نگه‌دارنده‌ها، تقاضا برای مواد غذایی طبیعی‌تر همراه با کنترل سلامت، بالا رفته است. از طرف دیگر تولیدکنندگان مواد غذایی هم با درک اثرات سوء نگه‌دارنده‌های شیمیایی، به تولید مواد غذایی فاقد نگه‌دارنده یا دارای نگه‌دارنده‌هایی با منشأ طبیعی روی آورده‌اند (موسوی و همکاران، ۱۳۸۸). اگرچه مدتهاست اثر بازدارندگی ادویه‌جات، عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی شناخته شده است؛ اما در سال‌های اخیر به تأثیر عصاره‌های معطر و اسانس‌های گیاهی و یا مواد مؤثر این اسانس‌ها بر روی پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های عامل فساد در مواد غذایی توجه زیادی شده است. همین موضوع باعث گردیده است تا اهمیت تحقیق در زمینه کاربرد افزودنی‌های طبیعی مثل میخک بیشتر شود (نوری و همکاران، ۱۳۸۹).

در تحقیقی، فعالیت ضد میکروبی اسانس ۵۲ گیاه از جمله میخک توسط هامر و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. در یک مقاله مروری ارائه شده توسط لای و همکاران از میخک به عنوان یک ادویه ضد میکروبی یاد شده است (Hammer *et al*., 1999; Lai and Roy, 2004).

هم‌چنین اثر ضد میکروبی اسانس میخک با غلظت ۰/۱۵٪ (وزنی - وزنی) به همراه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در افزایش زمان ماندگاری گوشت جوجه خرد شده در یخچال در سال ۲۰۰٤ توسط یاداو و سینگ بررسی شد (Yadav and Singh, 2004).

نیز پارامترهای بازدارنده اسانس‌های روغنی برای کاهش بیماری‌زاهای با منشأ غذایی توسط موریرا و همکاران بررسی شد. هم‌چنین در میان اسانس‌های مورد بررسی (میخک، اوکالیپتوس، برگ چای، رزماری، نعناع، لیموترش، پونه کوهی، کاج، ریحان)، اسانس میخک اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری را بر روی باکتری‌ها از خود نشان داد (Moreira *et al*., 2005).

تحقیقی توسط زوبیداه و هاسناهبگام در خصوص مقایسه اثر CA (Crude aqueous) و CM (Solvent extract) میخک بر روی خصوصیات *استرپتوکوکوس موتانس* (*Streptococcus mutans*) در خصوص پوسیدگی دندان انجام شد (Zubaida and Hasnah Begum, 2006).

در تحقیق آگاروال و همکاران اثر اسانس ۳۰ گیاه مختلف بر روی بیوفیلم *کاندیدا آلبیکانس* مورد بررسی قرار گرفت که گیاه میخک نیز از جمله گیاهان مورد بررسی بود (Agarwal *et al*., 2007). هم‌چنین اثرات ضد میکروبی اسانس فلفل سیاه، میخک، شمعدانی، پونه کوهی، جوز، آویشن بر علیه ۲۵ گونه مختلف باکتری توسط دورمن و دینس صورت گرفت (Dorman *et al*., 2008).

در تحقیق کومار و تانوار اثرات پودر میخک در ناگت مرغ از نظر میکروبی و حسی و یکسری پارامترهای

www.SID.ir
Archive of SID

شیمیایی نظیر رطوبت، پروتئین، چربی، خاکستر و... مورد بررسی قرار گرفت (Kumar *et al*.,2011).

از آنجایی که لازم است قبل از بکارگیری هر نگه‌دارنده طبیعی در مواد غذایی، اثرات آنها بر روی فاکتورهای رشد میکروب‌های بیماری زا و عامل فساد در محیط‌های آزمایشگاهی و مواد غذایی مورد بررسی قرار گیرد و مقادیر مؤثر آنها بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف مشخص گردد، از اینرو در این تحقیق سعی شده است که اثر غلظت‌های مختلف اسانس میخک به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی روی باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلی‌فرم‌ها و نیز قارچ‌ها در شرایط دمایی ۱۸- درجه سلسیوس و زمان‌های مختلف نگه‌داری در این محصول مورد مطالعه قرار گیرد. از اهداف دیگر این مطالعه، ایجاد تنوع در طعم و مزه همبرگر و هم‌چنین امکان استفاده از این اسانس به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در فرآورده‌های گوشتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیه گیاه و اسانس‌گیری

گیاه میخک هندی با نام علمی *Eugenia Caryophyllata* از خانواده *Myrtaceae* به صورت نیم کوب شده از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تهیه شد. مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه نیم کوب شده (به همراه آب مقطر به اندازه نصف بالن) با روش تقطیر و با دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری شد. محل جمع شدن اسانس در دستگاه، با فویل آلومینیومی پوشانده شد تا از تغییر کیفیت اسانس در اثر تابش نور جلوگیری شود و دمای دستگاه طوری تنظیم شد تا آب داخل آن در حال جوش ملایم باشد. اسانس بدست آمده با استفاده از سولفات سدیم خشک (مرک، آلمان) آبگیری و تا قبل از استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره (با درب کاملاً بسته) در یخچال نگه‌داری شد (فیض‌بخش و مکاوی‌پور، ۱۳۹۰).

- سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی مورد استفاده *اشریشیاکولای* (ATCC 10536)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 29213)، *آسپرژیلوس نایجر* (ATCC 16404) و *کاندیدا آلبیکانس* (ATCC 10231) بودند که به صورت کشت‌های آماده از آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند.

- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس، از روش رقیق‌سازی بر روی محیط آگار (Agar Dilution Method) استفاده شد. بدین ترتیب که غلظت‌های مورد نظر از اسانس (۰/۱۱٪ - ۰/۰۰۵٪ حجمی – حجمی) که با فیلتر سرنگی ۰/۲۵ میکرون استریل شده بودند به محیط کشت استریل مولر هینتون آگار :MHA (Mueller Hinton Agar) (های مدیا، هندوستان) برای باکتری و یست گلوکز کلرامفنیکل آگار :YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenichol Agar) (لیوفیلکم، ایتالیا) برای قارچ اضافه شدند و برای افزایش قابلیت حل شدن اسانس در محیط کشت به آن دی متیل سولفوکسید (Dimethylsulfoxide) :DMSO (مرک آلمان) استریل افزوده شد (Hammer *et al*., 1999; Bansod and Rai, 2008). پس از انتقال آنها به درون پلیت و بسته شدن محیط کشت، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگه‌داری شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

سپس از میکروارگانیسم‌های مورد نظر کشت‌های تازه تهیه و سوسپانسیونی با غلظت نیم مک فارلند (حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری و $۱۰^{۶}$ قارچ در هر میلی‌لیتر) ساخته شد و از آن ۳ میکرولیتر به پلیت‌های مذکور تلقیح شد. از پلیت‌های حاوی محیط کشت و دی متیل سولفوکسید بدون اسانس نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت (برای باکتری) و ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت (برای قارچ) گرمخانه گذاری شدند. پلیت‌هایی که در آنها رشد میکروارگانیسم به شدت کاهش پیدا کرده بود به عنوان MIC اسانس، برای میکروارگانیسم مربوطه در نظر گرفته شد (Hammer *et al*.,1999; Joseph, 2011; Bansod and Rai, 2008).

- آماده‌سازی همبرگر

نمونه‌های همبرگر با ۹۵٪ گوشت از خط تولید یکی از کارخانه‌های تولید همبرگر در تهران، قبل از مرحله قالب زنی یعنی به صورت خمیر همبرگر حاصل از میکسر، تهیه شد و بعد از افزودن ٤ غلظت مشخص اسانس بدست آمده از نتیجه آزمایش MIC به آن، در کیسه‌های نایلونی (Low Density Polyethylene) LDPE: بسته‌بندی شد و در دمای $۱۸^{\circ}C$- به مدت ۳ ماه نگه‌داری شد.

- طرح مطالعه

همبرگر فرموله و بسته‌بندی شده به تعداد ۷۵ نمونه آماده گردید. این نمونه‌ها مشتمل بر ۵ تیمار بودند که هر تیمار غلظت مشخصی از اسانس میخک را در برداشت (۰٪ یا شاهد، ۰/۰۰۱۵٪، ۰/۰۱٪، ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪). برای هر تیمار ۱۵ نمونه در نظر گرفته شد و در ۵ مقطع زمانی ابتدای تهیه، یک هفته، یک ماه، دو ماه و سه ماه تحت آزمایش‌های میکروبی قرار گرفتند. کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار در مورد هر تیمار انجام شد.

- آزمون‌های میکروبی

آزمایش‌های میکروبی شامل شمارش کلی‌فرم‌ها، کپک و مخمر و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. شمارش کلی‌فرم‌ها طبق روش استاندارد ملی ایران به شماره ۹۲٦۳، شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* طبق استاندارد ملی ایران شماره۱-٦۸۰٦ و شمارش کپک و مخمر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۱۰۸۹۹ انجام شد.

- ارزیابی حسی

نمونه‌های همبرگر فرموله شده در آزمایشگاه با روش هدونیک ۵ نقطه‌ای (۱= غیر قابل قبول، ۲= قابل قبول، ۳= خوب، ٤= بسیار خوب، ۵= عالی) توسط ۱۰ پنلیست که در ارتباط با آزمون‌های حسی و نحوه انجام آن توجیه شده بودند (کارشناسان کارخانه)، از نظر ویژگی‌های رنگ، بو، مزه، آبداری، بافت و پذیرش کلی مورد بررسی قرار گرفتند.

- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 17 و آزمون مقایسه میانگین (ANOVA) و دانکن با سطح اطمینان ۹۵٪ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

یافته‌ها

- نتایج اندازه‌گیری میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس میخک

www.SID.ir
Archive of SID

میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس میخک در محیط کشت، برای کپک *آسپرژیلوس نایجر* ۰/۰۱٪ (V/V)، برای مخمر *کاندیدا آلبیکانس* ۰/۰۳٪ (V/V)، برای باکتری *اشریشیا کولای* ۰/۰۶۵٪ (V/V) و برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۱٪ (V/V) بدست آمد. به علت اختلاف شرایط بین محیط کشت و محیط ماده غذایی (همبرگر) میزان غلظت‌های استفاده شده اسانس برای آزمون‌های میکروبی در همبرگر ۰/۰۰۱۵٪ ، ۰/۰۱٪ ، ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ حجمی- حجمی انتخاب شد.

- نتایج آزمون‌های میکروبی کلی‌فرم‌ها

نتایج حاصل از بررسی و شمارش آلودگی کلی‌فرمی نمونه‌های همبرگر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس میخک در جدول شماره (۱) آورده شده است.

جدول (۱)- نتایج آزمون میکروبی کلی‌فرم‌ها در همبرگر با غلظت‌های مختلف اسانس تحت شرایط نگه‌داری در فریزر

غلظت	زمان			
	بلافاصله	۷ روز	۱ ماه	۲ ماه	۳ ماه
٪ ۰	۱۱/۵±۲/۱۲^{Dc}	۱۰/۵±۰/۷۰^{Dc}	۵/۵۰±۳/۵۳^{Cb}	۲/۶۰±۱/۵۵^{Bb}	۱/۱۵±۰/۲۱^{Aa}
٪ ۰/۰۰۱۵	۵/۵۰±۲/۱۲^{Cb}	٤/۱۰±۱/۵۵^{Bb}	۲/۲۰±۰/۵٦^{Aa}	۱/۰۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۳۹±۰/۰۸^{Aa}
٪ ۰/۰۱	۱/۳۵±۰/۲۱^{Aa}	۱/۰۰±۰/۱٤^{Aa}	۰/۷۰±۰/۲۸^{Aa}	۰/۳۰±۰/۲۸^{Aa}	۰/۱۳±۰/۰٤^{Aa}
٪ ۰/۱	۰/۵۰±۰/۱٤^{Aa}	۰/۲۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۲۰±۰/۱٤^{Aa}	۰/۰۸±۰/۰۲^{Aa}	۰/۰٤±۰/۰۳^{Aa}
٪ ۰/۱۵	۰/۳۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۱۰±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰٦±۰/۰۲^{Aa}	۰/۰۱±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰۰±۰/۰۰^{Aa}

* مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.
*حروف بزرگ غیر مشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).
* حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).
* اعداد گزارش شده باید در $۱۰^{۰}$ ضرب گردند.

- نتایج آزمون‌های میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج حاصل از بررسی و شمارش آلودگی *استافیلوکوکوس اورئوس* نمونه‌های همبرگر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس میخک در جدول شماره (۲) آورده شده است.

جدول (۲)- نتایج آزمون میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* در همبرگر با غلظت‌های مختلف اسانس تحت شرایط نگه‌داری در فریزر

غلظت	زمان			
	بلافاصله	۷ روز	۱ ماه	۲ ماه	۳ ماه
٪ ۰	۱۳/۰۰±۱/٤۱^{Dd}	۱۲/۵۰±۰/۷۰^{Dd}	٦/۰۰±۲/۸۲^{Cb}	۳/۹۰±۰/۱٤^{Bb}	۲/۰۰±۰/۰۰^{Aa}
٪ ۰/۰۰۱۵	۹/۵۰±۰/۷۰^{Bc}	۹/۵۰±۲/۱۲^{Bc}	۲/۷۰±۰/۵٦^{Aa}	۲/۰۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۹۰±۰/۱٤^{Aa}
٪ ۰/۰۱	٦/۵۰±۲/۱۲^{Bb}	٦/۰۰±٤/۲٤^{Bb}	۱/۹۵±۰/۷۵^{Aa}	۱/۱۰±۰/۱٤^{Aa}	۰/٤۳±۰/۰۳^{Aa}
٪ ۰/۱	۲/۵۰±۰/۷۰^{Aa}	۱/۵۰±۰/۷۰^{Aa}	۰/٦۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۳۸±۰/۰۵^{Aa}	۰/۱۲±۰/۰۳^{Aa}
٪ ۰/۱۵	۱/۳۵±۰/۲۱^{Aa}	۰/۷۵±۰/۰۷^{Aa}	۰/۱۹±۰/۰۸^{Aa}	۰/۱۱±۰/۰۸^{Aa}	۰/۰۱±۰/۰۰^{Aa}

* مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.
* حروف بزرگ غیر مشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).
* حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).
* اعداد گزارش شده باید در $۱۰^{۰}$ ضرب گردند.

Archive of SID

www.SID.ir

- نتایج آزمون‌های میکروبی قارچ‌ها

نتایج حاصل از بررسی و شمارش قارچ‌های نمونه‌های همبرگر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس میخک در جدول شماره (۳) آورده شده است.

جدول (۳)- نتایج آزمون میکروبی کپک و مخمر در همبرگر با غلظت های مختلف اسانس تحت شرایط نگه‌داری در فریزر

غلظت	زمان				
	بلافاصله	۷ روز	۱ ماه	۲ ماه	۳ ماه
٪ ۰	۲۰/۰۰±۱٤/۱٤^{Dd}	۱۵/۰۰±۷/۰۷^{Cc}	۱۲/۰۰±۲/۸۲^{Bb}	٤/۸۰±۰/۱٤^{Aa}	۱/۳۵±۰/۳۵^{Aa}
٪ ۰/۰۰۱۵	۱۵/۰۰±۷/۰۷^{Cc}	۹/۵۰±۰/۷۰^{Bb}	۳/۰۰±۲/۸۲^{Aa}	۰/٦۰±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰۸±۰/۰٤^{Aa}
٪ ۰/۰۱	۱۰/۰۰±۰/۰۰^{Bb}	٤/۲۰±۰/۵٦^{Aa}	۱/۲۰±۰/۲۸^{Aa}	۰/۱۸±۰/۰۱^{Aa}	۰/۰۱±۰/۰۰^{Aa}
٪ ۰/۱	٦/۰۰±۱/٤۱^{Aa}	۲/۹۵±۰/٤۹^{Aa}	۰/۲٤±۰/۰۵^{Aa}	۰/۰۳±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰۰±۰/۰۰^{Aa}
٪ ۰/۱۵	٤/۰۰±۱/٤۱^{Aa}	۱/۹۵±۰/۲۱^{Aa}	۰/۰۵±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰۰±۰/۰۰^{Aa}	۰/۰۰±۰/۰۰^{Aa}

* مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

* حروف بزرگ غیر مشابه در هر ردیف بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).

* حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).

* اعداد گزارش شده باید در $۱۰^{۵}$ ضرب گردند.

- نتایج ارزیابی حسی همبرگر

نتایج ارزیابی حسی حاصل از بررسی نمونه‌های همبرگر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس میخک در شماره جدول (٤) آورده شده است.

جدول (٤)- نتایج ارزیابی حسی همبرگر با غلظت‌های مختلف اسانس میخک

غلظت	شاخص					
	رنگ	آبداری	بافت	مزه	بو	پذیرش کلی
٪ ۰	٤ /٦۰±۰/۵۱٦^{c}	۳/۸۰±۰/٦۳۲^{c}	٤/۱۰±۰/۷۳۸^{c}	٤/۷۰±۰/٤۸۳^{d}	٤/۷۰±۰/٤۸۳^{c}	٤/٦۰±۰/۵۱٦^{d}
٪ ۰/۰۰۱۵	٤/٤۰±۰/۵۱٦^{c}	۳/٦۰±۰/۵۱٦^{c}	۳/۷۰±۰/٦۷۵^{bc}	۳/۹۰±۰/۷۳۸^{c}	۳/۹۰±۰/۷۳۸^{bc}	٤/۱۰±۰/۷۳۸^{d}
٪ ۰/۰۱	۳/۷۰±۰/٦٦۷^{b}	۳/۰۰±۰/٦٦۷^{b}	۳/۱۰±۰/۷۳۸^{b}	۲/۸۰±۰/۹۱۹^{b}	۳/۰۰±۱/۰۵٤^{b}	۳/۱۰±۰/۵٦۸^{c}
٪ ۰/۱	۲/۸۰±۰/٤۲۲^{a}	۲/۵۰±۰/۷۰۷^{ab}	۲/٤۰±۰/۵۱٦^{a}	۱/٦۰±۰/٦۹۹^{a}	۲/۰۰±۱/۲٤۷^{a}	۱/۹۰±۰/۷۳۸^{b}
٪ ۰/۱۵	۲/٤۰±۰/٦۹۹^{a}	۲/۱۰±۰/۷۳۸^{a}	۲/۱۰±۰/۷۳۸^{a}	۱/۱۰±۰/۳۱٦^{a}	۱/۵۰±۱/۲٦۹^{a}	۱/۲۰±۰/٤۲۲^{a}

* مقادیر بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است.

* حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون بیانگر وجود اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

کپک *آسپرژیلوس نایجر* با MIC برابر با ۰/۰۱٪ (V/V) حساس‌ترین میکروارگانیسم مورد بررسی در این تحقیق بود و بعد از آن مخمر *کاندیدا آلبیکانس* با MIC برابر ۰/۰۳٪ (V/V)، باکتری *اشریشیاکولای* با MIC برابر ۰/۰۶۵٪ (V/V) و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با MIC برابر با ۰/۱٪ (V/V) به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار دارند. *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین حساسیت را به اسانس میخک نشان داد. این نتیجه‌گیری کاملاً با نتایج تحقیق میلیند و همکاران مطابقت دارد. آنها نیز در تحقیق خود این نکته را اذعان داشته‌اند (Milind *etal.*, 2011).

در یک تحقیق که توسط دورمن و دینس انجام شد، اثرات ضد میکروبی اسانس فلفل سیاه، میخک، شمعدانی، پونه کوهی، جوز، آویشن بر علیه ۲۵ گونه مختلف باکتری صورت گرفت. این آزمایشات نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت، نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل اسانس‌های گیاهی، مقاوم‌ترند (Dorman and Deans, 2008). نتایج این پژوهش با نتایج تحقیق دورمن و دینس مطابقت دارد و بررسی‌ها نشان داده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت مقاوم‌تر از باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس می‌باشند که این موضوع مربوط به تفاوت ترکیبات، ساختار و ضخامت دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (Gonzalez *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

در خصوص کلی‌فرم‌ها و *استافیلوکوکوس اورئوس*، با افزایش غلظت اسانس و نیز با گذر زمان، میزان میکروارگانیسم‌ها کاهش یافتند ولی غلظت ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ عملکردی مشابه را از خود نشان دادند. بطور کلی زمان و غلظت بالای اسانس (حداقل تا ۰/۱٪) هر دو به یک اندازه در کاهش بار میکروبی مؤثر بودند و نتایج تحقیق این موضوع را نشان داد که اگر همبرگر را بدون استفاده از اسانس در شرایط مناسب نگه‌داری (دمای فریزر) به مدت تقریباً ۳ ماه نگه‌داری کنیم بار میکروبی آن با مرور زمان کاهش می‌یابد. غلظت ۰/۱٪ از اسانس بدون نیاز به گذشت زمان نیز از نظر کاهش بار میکروبی به همین اندازه مؤثر بود.

به‌طور کلی باید گفت که با افزایش غلظت اسانس، کاهش بار میکروبی مشهود بود. ضمن این‌که غلظت ۰/۰۱٪ ، ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ اسانس به یک اندازه در کاهش بار میکروبی اثرگذار بودند. گذشت زمان نیز با توجه به نتایج نمونه شاهد باعث کاهش مشهود بار میکروبی شد. اما این حالت در مورد نمونه‌های حاوی اسانس (به‌خصوص غلظت ۰/۰۱٪ به بالا) کمتر بود. برآورد کلی این است که زمان و غلظت بالای اسانس (حداقل تا ۰/۰۱٪) هر دو به یک اندازه در کاهش بار میکروبی مؤثر بوده‌اند. چه بسا نتایج حاصل از تیمار ۳ ماهه در مورد نمونه شاهد (بدون اسانس) تقریباً مشابه نتایج حاصل از تیمار بلافاصله پس از تهیه با غلظت اسانس ۰/۰۱٪ می‌باشد و هر دو به یک اندازه در کاهش بار میکروبی مؤثر بوده‌اند.

در مورد کپک‌ها و مخمرها غلظت‌های بالاتر اسانس بار میکروبی را بهتر کاهش دادند. گذشت زمان نیز با توجه به نتایج نمونه شاهد باعث کاهش مشهود بار میکروبی شده است. اما این حالت در مورد نمونه‌های حاوی اسانس (به‌خصوص غلظت ۰/۱٪ به بالا) کمتر دیده شد و زمان و غلظت بالای اسانس (حداقل تا

Archive of SID
www.SID.ir

۰/۱٪) هر دو به یک اندازه در کاهش بار میکروبی مؤثر بودند. گذشت زمان ۲ ماه در مورد نمونه‌ای که هیچ درصدی از اسانس میخک در آن بکار نرفته بود به اندازه غلظت ۰/۱٪ اسانس میخک در نمونه بدون تأثیر زمان نگه‌داری در کاهش بار میکروبی مؤثر بوده است.

تقریباً در کلیه نتایج به‌دست آمده در مورد هر سه میکروارگانیسم تحت شرایط نگه‌داری در دمای فریزر، با گذر زمان، بار میکروبی کاهش یافت. هم‌چنین غلظت‌های بالاتر اسانس نسبت به غلظت‌های پایین‌تر آن اثر بهتری را در کاهش بار میکروبی از خود نشان دادند. هر چند که غلظت‌های ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ اسانس در محصول از نظر کاهش بار میکروبی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در کلیه تحقیق‌های انجام شده مشابه که در ذیل به آنها اشاره خواهد شد، اسانس میخک در کاهش بار میکروبی به خوبی اثر خود را نشان داده است. هم‌چنین گذر زمان نیز به تنهایی در کاهش بار میکروبی مؤثر بوده است. این را می‌توان به شرایط نگه‌داری (۱۸- درجه سلسیوس)، و حضور مواد مؤثر دیگر نظیر انواع ادویه در فرمولاسیون همبرگر، پیاز و غیره نسبت داد. گذشت زمان باعث ایجاد فرصت برای مواد ضد میکروبی مذکور شده و اثر خود را به صورت سینرژیست در کنار یکدیگر در کاهش بار میکروبی محصول نشان داده اند (Mahdavianmehr *et al.*, 2010).

در تحقیقی که در سال ۱۳۸۸ توسط نوری و همکاران در خصوص بررسی اثر نگه‌دارندگی اسانس دارچین و درجه حرارت نگه‌داری بر روی میزان رشد *اشریشیاکولای* O157:H7 در همبرگر با استفاده از تکنولوژی ترکیبی صورت گرفت، نتایجی مشابه نتایج این تحقیق بدست آمد. بدین معنی که با افزایش غلظت اسانس تا ۰/۰۳٪، میزان رشد باکتری کاهش یافت. هم‌چنین با افزایش مدت زمان نگه‌داری (به مدت ۲۱ روز)، میزان رشد باکتری کاهش یافت و از نظر آماری اثر مدت نگه‌داری بر روی رشد باکتری معنی‌دار بود (نوری و همکاران، ۱۳۸۹).

نیز فعالیت ضد میکروبی عصاره ادویه‌هایی نظیر سیر، میخک و چند ادویه دیگر توسط آرورا و کاور بر روی باکتری‌های بیماری‌زا و مخمرها بررسی شد. آزمایش‌ها نشان داد که عصاره سیر در فاصله زمانی یک ساعت در شرایط انکوباسیون، می‌تواند ۹۳٪ *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* را از بین ببرد. هم‌چنین در همین فاصله زمانی کلیه مخمرها توسط عصاره سیر از بین رفتند. در حالی که این زمان برای عصاره میخک ۵ ساعت به‌طول انجامید. نتایج این تحقیق نیز به گونه‌ای از نظر مقاوم‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به قارچ‌ها در مقابل اسانس‌ها با تحقیق انجام شده مطابقت دارد (Arora *et al.*, 1999).

در سال ۲۰۱۱ نیز جوزف و سوجاتا اسانس میخک را بر علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیس*، *آسپرژیلوس نایجر* و گونه‌های *رایزوپوس* به‌کار بردند و برای این منظور از غلظت ۲/۵٪ حجمی- حجمی اسانس استفاده کردند. اسانس با این غلظت از نظر کاهش بار میکروبی بسیار مؤثر نشان داده شد (Joseph and Sujatha, 2011).

به علت نامطلوب بودن طعم در غلظت‌های بالای اسانس، بهترین نتیجه از نظر خواص ارگانولپتیک و کاهش بار میکروبی، استفاده از غلظت‌های ۰/۰۰۱۵٪ و ۰/۰۱٪ اسانس و گذشت زمان ۳ ماه پس از تهیه نمونه

www.SID.ir
Archive of SID

می‌باشد. نتایج آزمون حسی در غلظت‌های پایین (۰/۰۰۱۵٪ و حداکثر ۰/۰۱٪)، پذیرش را از نظر مصرف‌کننده به همراه داشت.

اسانس‌ها و عصاره‌ها، حاوی ترکیبات مؤثری در بازدارندگی رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای نگه‌دارنده‌های شیمیایی در فرایند تولید مواد غذایی گردند. نتایج به‌دست آمده از مطالعات پیشین با نتایج حاصله از تحقیق اخیر هم‌خوانی دارد. با توجه به تأکید بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از مواد نگه‌دارنده طبیعی، این تحقیق به‌عنوان کوششی در جهت به‌کارگیری اسانس میخک برای ایجاد طعم مناسب به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی و ضد باکتریایی مناسب علیه پاتوژن‌ها و قارچ‌ها در فرآورده‌های گوشتی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شرکت فرآورده‌های گوشتی تهران همبرگر (مام) که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته‌اند قدردانی و تشکر می‌شود.

منابع

- فیض بخش، علیرضا و مکاوی پور، فاطمه (۱۳۹۰). اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و NAA بر ماهیت اسانس گیاه جعفری فرنگی (*Chaerophyllumaureum L.*). فصلنامه داروهای گیاهی، سال دوم، شماره یک، صفحات: ۳۸-۳۳.
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸٤). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- شمارش استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز مثبت (استافیلوکوکوس و سایر گونه‌ها)- روش آزمون- قسمت اول: روش استفاده از محیط کشت برد پارکر آگار. استاندارد شماره ۱-٦۸۰٦.
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸٦). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کلی فرم‌ها-روش شمارش کلنی. استاندارد شماره ۹۲٦۳
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۷). میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش جامع برای شمارش کپک‌ها و مخمرها- قسمت اول. استاندارد شماره ۱-۱۰۸۹۹
- موسوی، میر حسن؛ آخوندزاده بستی، افشین؛ میثاقی، علی؛ کریم، گیتی؛ زهرایی صالحی، تقی و مصطفوی، احسان (۱۳۸۸). اثر نایسین بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* در سوپ جو تجارتی. مجله علوم داروئی، دوره ۱۵، شماره ۳، صفحات: ۲٤۰-۲۳۵.

Archive of SID
www.SID.ir

- نوری، نگین؛ توریان، فهیمه؛ رکنی، نوردهر؛ آخوندزاده، افشین و میثاقی، علی (۱۳۸۹). بررسی اثر نگه‌دارندگی اسانس دارچین و درجه حرارت نگه‌داری بر روی میزان رشد *E. coli O157:H7* در همبرگر با استفاده از تکنولوژی ترکیبی. مجله علوم و صنایع غذایی، دوره ۷، شماره ٤، صفحات: ٤٢-٣٥.
- Arora, D. and Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents, 12(3): 257-262.
- Agarwal, V., Lal, P. and Pruthi, V. (2007). Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. Mycopathologia Journal, 165(1): 13-19.
- Bansod, S. and Rai, M. (2008). Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillusfumigatus*and *A. niger*. World Journal of Medical Sciences, 3(2): 81-88.
- Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2008). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology, 88(2): 308-316.
- Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginnekn, L., Debevere, J., *et al*. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in food: the past, the present and the future. International Journal of Food Microbiology, 117(1): 1-28.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86(6): 985–990.
- Joseph, B. and Sujatha, S. (2011). Bioactive Compounds and its Autochthonous Microbial Activities of Extract and Clove Oil (*Syzygiumaromaticum*L.) on Some Food Borne Pathogens. Asian Journal of Biological Sciences, 4(1): 35-48.
- Kumar, D. and Tanwar, V.K. (2011). Utilization of clove powder as phytopreservative for chicken nuggets preparation. Journal of Stored Products and Postharvest Research, 2(1): 11 – 14.
- Lai, P.K. and Roy, J. (2004). Antimicrobial and Chemopreventive Properties of Herbs and Spices, Current Medicinal Chemistry, 11(11): 1451-1460.
- MahdavianMehr, H., Hosseini, Z., Haddad Khodaparast, M.H. and Edalatian, M.R. (2010). Study on the antimicrobial effect of *Salvia Leriifolia* (Nowroozak) leaf extract powder on the growth of *Staphylococcus Aureus* in hamburger. Journal of Food Safety, 30(4): 941- 953.
- Milind, P. and Deepa, KH. (2011). Clove: a champion spice. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 2(1): 47-54.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E. and Roura, S.I. (2005).Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. LWT- Food Science and Technology, 38(5): 565-570.
- Yadav, A.S. and Singh, R.P. (2004). Natural preservatives in poultry meat products. Natural Product Radiance, 3(4): 300-303.
- Zhang, J., Davis, T.A., Matthews, M.A., Drews, M.J., Laberg, M. and An, Y.H. (2006). Sterilization using high- pressure carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, 38(3): 354-372.
- Zubaidah, H.A.R. and Hasnah Begum, S.G.KH. (2006). Comparative studies on the effect of crude aqueous (CA) and solvent (CM) extracts of clove on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans.* Journal of Oral Science, 48(3): 117-123.

Archive of SID

www.SID.ir

Antimicrobial properties of clove essential oil on raw hamburger during storage in freezer

Hoseini, S.E.[1*], Shabani, SH.[2], Delfan Azari, F.[3]

1- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Instructor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3 M.Sc. Graduated of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*Corresponding author email: Ebhoseini@srbiau.ac.ir
(Received: 2013/410/31 Accepted: 2015/7/5)

Archive of SID

Abstract

Providing safe foods resistant to pathogens as well as replacing chemical preservatives with natural compounds including essential oils has attracted great attention in current studies. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial properties of clove's essential oil on hamburger. For this reason, clove essential oil was extracted by Clevenger apparatus method. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger* was measured. The antimicrobial effect of the essence in the concentrations of 0.0015%, 0.01%, 0.1% and 0.15% was examined on hamburger. The samples were examined at 0, 7, 30, 60 and 90 days of cold storage. Sensory characteristics of the samples were assessed through Hedonic method. MICs resulted from the test for *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* and *A. niger* were 0.1%, 0.065%, 0.03% and 0.01% (V/V), respectively. The results of microbial examinations indicated that with the increasing of the concentration of clove oil essence and also with the progression of storage time, the microbial load was gradually decreased. According to the sensory assays conducted by the consumers, low concentrations of 0.0015% and maximum of 0.01% were found desirable.

Key words: Antimicrobial effect, Clove essence, Hamburger

www.SID.ir