اثر افزودن اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multifora boiss*) بر ویژگی‌های باکتریایی و قارچی سس مایونز

بهاره حاجی محمدی تلک آبادی[1]، آسیه احمدی دستگردی[2*]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *as.ahmadi17@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۱

چکیده

اسانس گیاهان دارویی به دلیل ویژگی‌های ضدمیکروبی به عنوان جایگزین نگه‌دارنده‌های سنتزی در فرآورده‌های غذایی مطرح می‌باشند. در این مطالعه هدف شناسایی اجزای اصلی اسانس آویشن شیرازی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس در محیط آزمایشگاهی و سس مایونز می باشد. اسانس به روش تقطیر با آب، استخراج و با دستگاه گازکروماتوگراف آنالیز شد. خاصیت ضدمیکروبی اسانس با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. بقا میکروارگانیسم‌های آلوده کننده سس مایونز در طول ۶ ماه در دمای ۴ درجه سانتی گراد بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی اجزاء اسانس به روش GC تعداد ۱۴ ترکیب را در اسانس این گونه از آویشن اثبات کرد که ترکیبات عمده موجود در اسانس را تیمول و کارواکرول تشکیل دادند. حساس‌ترین پاتوژن به اسانس، قارچها (کمترین MIC) و مقاوم‌ترین پاتوژن باکتری‌های گرم منفی تشخیص داده شدند. این مطالعه تایید کرد که اسانس آویشن دارای ویژگی‌های ضدمیکروبی در محیط آزمایشگاهی است. در دومین فاز مطالعه، فعالیت ضدمیکروبی اسانس در دو نوع مایونز پرچرب و کم چرب در طول ۶ ماه در دمای ۴ درجه سانتی گراد بررسی شد. اسانس از رشد تمام میکروارگانیسم‌های پاتوژن و عامل فساد جلوگیری کرد، در حالی‌که در نمونه کنترل میکروارگانیسم‌ها مشاهده شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس گیاه آویشن شیرازی می‌تواند از رشد باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد در مایونز جلوگیری نماید. بنابراین می‌توان استفاده از آن را به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در فرآورده‌های غذایی از جمله مایونز پیشنهاد نمود.

کلید واژه ها: آویشن شیرازی (*Zataria multiflora boiss*)، اسانس، فعالیت ضدمیکروبی، مایونز.

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان مواد غذایی روز به روز تمایل بیشتری نسبت به مصرف غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی هستند و در آن‌ها مواد طبیعی به کار رفته است از خود نشان می‌دهند و به‌همین دلیل مطالعات زیادی روی امکان جایگزین کردن ترکیبات طبیعی به‌جای نگه‌دارنده‌های شیمیایی در غذاهای مختلف صورت گرفته است. در سال‌های اخیر استفاده از سس‌ها به عنوان چاشنی در بهبود عطر و طعم، مزه، رنگ و به عنوان عامل اشتهاءآور در کنار غذاها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین ارتقاء سطح سلامت و کیفیت این فرآورده‌ها از اهداف تولیدکنندگان می‌باشد. سس مایونز از قدیمی‌ترین سس‌ها می‌باشد که به‌طور وسیعی در سراسر جهان مصرف می‌شود. با وجود آن که مقدار مواد مغذی این محصولات برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌های مولد فساد مناسب است. pH پایین و aw پایین باعث محدود شدن میکروب‌های مولد فساد به مخمرها، تعداد اندکی از باکتری‌ها و کپک‌ها می‌شود (Depree and Savage, 2001). به منظور دسترسی به این اهداف، تولیدکنندگان مایونز در دهه‌های اخیر از افزودنی‌های سنتزی با خواص ضدمیکروبی استفاده کرده‌اند. با توجه به این‌که مصرف این ترکیبات (بنزووات) در عین فواید ذکر شده مضراتی را برای سلامتی انسان نیز به دنبال دارند؛ بنابراین بایستی سعی شود که از این ترکیبات در میزان حداقل

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شود. از آنجا که سس مایونز در ایران در سبد کالای مصرفی مردم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و انتروتوکسین‌های تولیدشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا* و *اشرشیاکلی* در این فرآورده می‌توانند موجب مسمومیت مصرف‌کننده شوند، به همین دلیل باید از رشد میکروارگانیسم‌ها در این فرآورده جلوگیری به عمل آید. ادویه‌جات و گیاهان دارویی، اسانس‌ها و عصاره‌های آن‌ها درجـات متنوعی از فعالیت بیولوژیکی را دارا هستند.

قربانی و همکاران در سال ۱۳۹۴ اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی بر باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس* در سس مایونز را بررسی کردند و دریافتند اثر ضد میکروبی اسانس با افزایش غلظت در نمونه‌ها افزایش می یابد. جعفری خطایلو و الماسی در سال ۱۳۹۷ به مقایسه تأثیر اسانس نعناع فلفلی و بنزوات سدیم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، میکروبی، حسی و رئولوژیکی سس مایونز پرداختند و مشاهده کردند *سالمونلا* و *اشریشیاکلی* برای تمام تیمارها منفی و طبق استاندارد بود. شمارش کلی میکروبی نشان داد که با افزودن اسانس در طول دوره نگهداری، رشد میکروب به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین نمونه-های سس حاوی اسانس نعناع از مطلوبیت و پذیرش کلی قابل قبولی از سوی مصرف‌کنندگان برخوردار بودند. ایجاد مسمومیت سالمونلایی با مصرف مایونز توسط Radford و Board (۱۹۹۳) گزارش شده است. Lock و Board (۱۹۹۴) به بررسی رشد *سالمونلا اینتریتیدیس* PT4 در مایونزهای تجاری پرداختند. Hathcox و همکاران در سال ۱۹۹۵ میزان مرگ و میر *اشرشیاکلی* در مایونز پرچرب و کم‌چرب را بررسی کردند و نشان دادند که *اشرشیاکلی* در مایونزهای پرچرب بیشتر از مایونز کم‌چرب بقا پیدا می کند. آن‌ها نتیجه گرفتند که مایونز کم‌چرب حاوی ترکیبی با خاصیت ضد E. Coli است که در مایونز پرچرب موجود نمی‌باشد. pH کمتر مایونز کم‌چرب در مقایسه با pH بالاتر مایونز پرچرب، یک اثر کشنده در میکروارگانیسم‌های حساس به اسید مانند *اشرشیاکلی* دارد. Covill و Roller در سال ۲۰۰۰ اثرات ضد میکروبی کیتوزان را در مایونز و سالادهای میگو با پایه مایونز بررسی کردند. مایونزهای حاوی کیتوزان، اسیداستیک و عصاره لیمو با *سالمونلا اینتریتیدیس*، *زیگوساکارومایسس بایلی* و *لاکتوباسیلوس* تلقیح شدند.

Leuschner و Zamparini در سال ۲۰۰۲ اثرات ادویه جات را در رشد و بقا *اشرشیاکلی* و *سالمونلا اینتریتیدیس* سیستم های مدل و مایونز بررسی کردند. آن ها مایونزهای تجاری را با S . *اینتریتیدیس* آلوده کردند و در معرض pH پایین قرار دادند و مرگ سلولی را مشاهده کردند. بطور کلی، بیشتر باکتری های موثر در بیماری های غذایی در pH کمتر از ۴/۵ قادر به رشد نیستند، بنابراین غذاهای اسیدی بطور معمول خطرات سلامتی عمده ای برای مصرف کننده ایجاد نمی‌کنند. برای مثال حداقل pH برای رشد *اشرشیاکلی* و *سالمونلا* به ترتیب ۴/۴ و ۴/۵ تخمین زده شده است، در حالی‌که حداکثر pH برای رشد این دو گونه به ترتیب ۹ و ۷/۸ می‌باشد. بنابراین فرآورده های اسیدی رشد و بقاء میکروبی را محدود می‌کند. Silva و Melo-Franco در سال ۲۰۱۲ کاربرد اسانس آویشن علیه *سالمونلا اینتریتیدیس* در مایونز را بررسی کردند و نشان دادند که حضور ۰/۲٪ اسانس آویشن در مایونز باعث کاهش شمارش S. *اینترتیدیس* شد.

Sinaeyan و Sani در سال ۲۰۱۴ فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره Ziziphora clinopodioides را بر روی *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساکارومایسس سرویزیه* در مایونزهای کم چرب بررسی کردند. اسانس z. clinopodioide توانست از رشد باکتری های گرم مثبت و منفی و مخمر جلوگیری کند و اثر نامطلوبی بر خواص حسی مایونز ایجاد نکرد. Roufegari Nejad و همکاران در سال ۲۰۱۵ فعالیت ضد میکروبی پودر

www.SID.ir

برگ نعنا را در سس‌های سالاد ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که جمعیت میکروبی نمونه‌های آلوده با افزایش مقدار پودر برگ نعنا کاهش پیدا کرد و بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی به دلیل دارا بودن ترکیبات ضد میکروبی در سس‌های سالاد استفاده کرد. Ahmadi-Dastgerdi و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه بومادران را در محیط آزمایشگاهی و در سس مایونز بررسی کرده و گزارش کردند اسانس می‌تواند به عنوان یک عامل نگه‌دارنده، آنتی اکسیدان طبیعی و طعم-دهنده در مایونز به‌کار رود.

در این پژوهش سعی شده از اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora boiss*) به عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی (بنزوات و سوربات) در سس مایونز مورد استفاده قرار گیرد و اثر ضد میکروبی آن در طی نگهداری مورد ارزیابی قرار گیرد. گیاه آویشن شیرازی سر شاخه‌های گلدار خشک شده از خانواده نعناعیان است که به دلیل وجود کارواکرول، تیمول و لینالوال و ... در آن دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی می‌باشد (ضابطیان و همکاران، ۱۳۸۹). این ترکیبات به‌طور گسترده به عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی استفاده می شوند و در محیط اسیدی از فعالیت باکتری ها و قارچها جلوگیری می‌کنند.

روش کار

سویه‌های میکروبی استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 4933)، *اشرشیاکلی* (ATCC 25922)، پنی *سیلیوم دیجیتاتوم* (ATCC 9849P) و *ساکارومایسس سرویزیه* (ATCC 60782) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. کلیه محیط‌های کشت، همچنین بنزوات و سوربات از مرک آلمان تهیه شد. مواد تشکیل دهنده مایونز از جمله تخم مرغ، نمک و شکر از سوپرمارکت خریداری شد.

جمع آوری و شناسایی گیاه

سرشاخه‌های گلدار گیاه آویشن شیرازی در تابستان ۱۳۹۷ از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع استان اصفهان (ایستگاه شهید فزوه) تهیه شد. نمونه‌های گیاهی توسط هرباریوم گیاه‌شناسی شناسایی گردید.

آماده کردن نمونه

ابتدا قسمت‌های مختلف گیاه جدا شده و در سایه خشک شده و در سایه و شرایط محیطی به مدت دو روز تا رسیدن به رطوبت نهایی نگهداری شدند. سپس در آسیاب (Mulinex, Spain) پودر شده و به صورت پودر در فریز نگهداری شد (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2017).

استخراج اسانس

پودر گیاه توسط دستگاه کلونجر (مدل اشک شیشه، ایران) اسانس گیری شد. اسانس جمع آوری شده توسط سولفات سدیم آبگیری شد و تا زمان انجام آزمایش‌ها، در

شیشه‌های تیره و دربسته در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شد (Baris et al., 2006; Bozin et al., 2008). بازده اسانس بر اساس وزن خشک نمونه از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{بازده اسانس} = \frac{\text{وزن اسانس}}{\text{وزن نمونه مورد استفاده برای استخراج}} \times ۱۰۰$$

اندازه گیری میزان ترکیبات اسانس

برای اندازه‌گیری ترکیبات اسانس، از دستگاه گازکروماتوگرافی مدل BPX 70 ساخت شرکت SGE استرالیا مجهز به ستون با طول ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میکرومتر، ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر و شناساگر FID استفاده شد. دمای ابتدایی آون ۶۰ درجه سلسیوس و گرادیان حرارتی ۴ درجه سلسیوس در هر دقیقه (۴ min/ درجه سانتی گراد)، دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس، دمای دستگاه در طول فرآیند به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

ثابت ۱۹۸ درجه سانتی گراد و سرعت جریان گاز حامل (هلیم) ml/min ۱بود. شاخص کواتس با استفاده از طیف نرمال آلکان‌ها (C_8-C_{24}) محاسبه شد. همچنین با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام GC و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی، درصد نسبی هر یک از اجزاء متشکله اسانس تعیین گردید (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2017).

بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی اسانس

سویه‌های استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 4933)، *اشرشیاکلی* (ATCC 25922)، کپک پنی *سیلیوم دیجیتاتوم* (ATCC 9849P) و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (ATCC 60782) به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه می‌شود. برای فعال کردن سوش‌ها، طبق دستورالعمل هر میکروارگانیسم عمل شد. جهت بررسی اثرات ضد میکروبی از دو روش چاهک و ریز رقت استفاده شد. با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد میکروارگانیسم‌های تلقیح شده بررسی شد و آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد. پس از تعیین MIC از تمامی لوله هایی که در آنها عدم رشد باکتری و قارچ مشاهده شد ۱۰۰µl نمونه برداری شد و از طریق کشت در پلیت حاوی مولر هینتون آگار و سابوراد دکستروز آگار، MBC تعیین شد. پلیت حاوی کمترین غلظت اسانس که در آن عدم رشد باکتری و قارچ قابل مشاهده است به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Baris et al., 2006; Bozin et al., 2008; Candan et al., 2003; Magiatis et al., 2002; Mazandarani et al., 2013).

تهیه تیمارهای مایونز

بر اساس مقادیر محاسبه شده از فعالیت ضد میکروبی اسانس در آزمون MIC و MBC، اسانس برای بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی اسانس به فاز روغنی مایونز اضافه شد. یک نمونه مایونز با نگه‌دارنده سنتزی بنزوات-سوربات نیز به میزان ۰/۷۵ mg/ml بر اساس حد مجاز میزان بنزوات-سوربات در مایونز طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۴۵۴ تهیه شد. یک نمونه سس مایونز بدون هیچ‌گونه افزودنی و میکروارگانیسم به عنوان شاهد مثبت و یک نمونه بدون افزودنی و با میکروارگانیسم تلقیح شده به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد.

ابتدا سس مایونز در بچ‌های ۵ کیلوگرمی بطور کاملا سترون با یک میکسر آزمایشگاهی (ارکان فلز-ایران) در پایلوت شرکت پاکنام سپهر سپاهان (سس مایونز ناجی، اصفهان، ایران) تولید شد. مایونز با مخلوط کردن فاز روغنی شامل روغن سویای فاقد آنتی اکسیدان (۶۵ درصد) (روغن نباتی ناز اصفهان که حاوی اسید میریستیک: ۰/۰۷٪، اسید پالمیتیک: ۱۰/۹۵٪، اسید استئاریک: ۴/۴۲٪، اسید اولئیک: ۲۳/۳۴٪، اسید لینولئیک: ۵۲/۵۹٪ و اسید لینولنیک: ۷/۲۳٪ است)، آب، سرکه (ژی تاک)، تخم مرغ غیرپاستوریزه و مواد پودری شامل نمک تصفیه شده، شکر (کریستال)، اسیدسیتریک، پودر خردل، زانتان، کربوکسی متیل سلولز، بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم تهیه شد. کلیه ظروف و وسایل سترون شدند. پوسته تخم مرغ با پرسیدین ضد عفونی شد. نمونه‌های مایونز به چهار گروه تقسیم شدند: EO (حاوی اسانس)، BS (بنزوات-سوربات)، C (کنترل بدون افزودنی و میکروارگانیسم) و Cmo (کنترل بدون افزودنی و با میکروارگانیسم تلقیح شده). نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای بسته‌بندی شده و با فویل آلومینیوم پوشانده شدند و تا زمان انجام آزمایشات در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019).

www.SID.ir

اندازه‌گیری pH

pH مایونز پرچرب و کم‌چرب در دمای محیط با pH متر انجام شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی از محیط کشت نوترینت آگار شیب دار برای باکتری و محیط کشت سابورد دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل برای کپک و مخمر استفاده شد. بعد از کشت و ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری ها و ۷۲ ساعت انکوباتور گذاری در ۲۸ درجه سانتی گراد برای قارچ‌ها، سوسپانسیون میکروبی به روش مک فارلند تهیه شد.

تلقیح میکروارگانیسم‌ها به مایونز

سوسپانسیون میکروبی *سالمونلا اینتریتیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*، *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* به هر شیشه سس تلقیح شد، به‌طوری‌که غلظت نهایی برای باکتری و قارچ 10^3 در هر گرم سس باشد. این غلظت بر اساس حداکثر مجاز شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در سس مایونز طبق استاندارد ملی به شماره ۲۹۶۵ انجام شد و برای اطمینان از صحت تلقیح، کشت میکروبی انجام گرفت (Xiong et al, 1999). برای اطمینان از توزیع یکنواخت سوسپانسیون میکروبی، نمونه‌های تلقیح شده به مدت ۳ دقیقه به‌آرامی مخلوط شدند. میزان رشد میکروارگانیسم‌های پس از زمان‌های ۷۲ ساعت، ماه‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و۶ باروش زیر تعیین گردید. نتایج به‌صورت log 10 CFU/g گزارش شد.

شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس*

برای شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* ابتدا رقت تهیه شد، سپس میلی‌لیتر از آن به محیط بردپارکر منتقل‌شده و به‌صورت سطحی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری - شد.

شمارش *اشرشیاکلی*

برای شمارش *اشرشیاکلی* ابتدا رقت تهیه شد و در محیط EC براث کشت سطحی داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد.

شمارش *سالمونلا اینتریتیدیس*

برای شمارش *سالمونلا اینتریتیدیس* ابتدا رقت تهیه شد، سپس در محیط سالمونلا شیگلا آگار به‌صورت سطحی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ۲۴ ساعت انکوبه گذاری شد.

شمارش کپک و مخمر

برای شمارش کپک و مخمر از محیط (YGC) استفاده شد. از روش کشت سطحی استفاده شد و محیط‌های کشت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح ($p<۰/۰۵$) انجام گرفت. رسم منحنی‌ها با نرم افزار Excel انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS V 9.1 استفاده شد.

نتایج

بررسی میزان اسانس

در این تحقیق میزان اسانس گیاه آویشن شیرازی (Zataria multiflora boiss)، به روش تقطیر با آب براساس وزن خشک نمونه ۱/۶۴ درصد (w/w) به دست آمد. اسانس به دست آمده دارای رنگ زرد شفاف و بوی نافذی بود.

بررسی اجزاء اسانس

نتایج حاصل از بررسی اجزاء اسانس به روش GC تعداد ترکیب را در اسانس آویشن شیرازی نشان داد. ترکیبات شناسایی شده به همراه درصد، زمان بازداری (R_t) و اندیس بازداری (RI) در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان گونه که نتایج نشان می دهد کارواکرول،

www.SID.ir

Archive of SID

تیمول، آلفا ترپینن، آلفا پینن، ۳-اکتانون و کارواکرول استات ترکیبات عمده موجود در اسانس را تشکیل دادند.

بررسی قطر هاله

جدول ۲ و شکل ۱ نتایج قطر هاله اثر اسانس آویشن شیرازی، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ضد قارچ فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌های مختلف را نشان می‌دهد.

بررسی حداقل اثر بازدارندگی (MIC)

جدول ۳ نتایج MIC و جدول ۴ نتایج MBC اثر اسانس آویشن شیرازی، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ضد قارچ فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌های مختلف را نشان می‌دهد.

استافیلوکوکوس اورئوس

شکل ۲ بررسی زنده مانی *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی بر در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری را نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های دارای اسانس آویشن تعداد میکروارگانیسم پایین‌تری نسبت به نمونه‌های کنترل دارند و با گذشت زمان این اختلاف بیشتر شده است. تعداد اولیه باکتری‌ها در روز دوم در محدوده ۲/۷۷ تا ۳/۳۸ بود. در نمونه‌های حاوی اسانس بعد از ۴ ماه و نمونه‌های کنترل بعد از ۶ ماه تعداد باکتری از تعداد قابل شمارش خارج شد. هم‌چنین نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های ۳۰ و ۶۵ درصد چربی در تیمارهای یکسان وجود نداشت.

سس مایونز و پایداری اکسیداتیو آن

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی (درصد) اسانس گیاه آویشن شیرازی

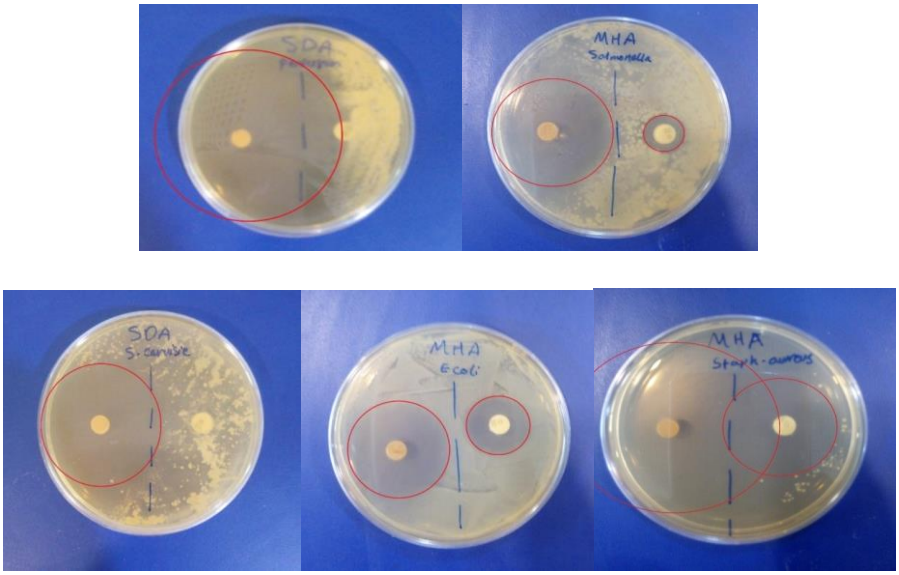
No	Compound	RI	Rt (min)	Relative peak area (%)
1	α-Thujene	924	1.533	0.1532
2	α-Pinene	932	4.232	3.933
3	3-Octanone	984	5.620	3.203
4	Myrcene	988	6.527	1.202
5	α-Terpinene	1014	6.849	10.87
6	p-Cymene	1020	7.931	3.239
7	γ-Terprinene	1054	13.060	0.4015
8	linalool	1095	15.422	0.5058
9	Carvacrol methyl ether	1241	17.863	0.9719
10	Thymol	1289	18.363	26.93
11	Carvacrol	1298	18.776	42.22
12	Eugenol	1361	23.088	1.268
13	Carvacrol acetate	1370	29.882	2.846
14	β-Caryophyllene	1417	40.757	2.253

کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور FID روی ستون HP5-MS انجام شد. Rt: زمان بازداری، RI: اندیس بازداری (کواتس).

جدول ۲- نتایج قطر هاله اسانس آویشن شیرازی، کلرامفنیکل و فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم	*اشریشیاکلی*	*سالمونلا*	*استافیلوکوکوس*	*ساکارومایسس*	*پنی سیلیوم*
اسانس	A۰/۰۶ ± ۳/۵۸	A۰/۰۴ ± ۴/۲۲	A۰/۰۵ ± ۶/۲۹	A۰/۰۳± ۴/۵۰	A۰/ ۰۸ ± ۶/۷۸
کلرامفنیکل	B۰/۰۶ ± ۲/۲۴	B۰/۰۴ ± ۱/۴۱	B ۰/۰۵ ± ۳/ ۶۰	-	-
فلوکونازول	-	-	-	B۰/۰۱ ± ۰/۷۲	-

www.SID.ir



شکل ۱- قطر هاله اسانس آویشن شیرازی، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ضد قارچ فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌ها.

جدول ۳- نتایج MIC اسانس آویشن شیرازی، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ضد قارچ فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌ها

میکروارگانیسم	*اشریشیاکلی*	*سالمونلا*	*استافیلوکوکوس*	*ساکارومایسس*	*پنی سیلیوم*
اسانس	A۸۸۳/۸۸ ± ۱۸۷۵	B۰/۰۰ ± ۲۵۰۰	B۰/۰۰ ± ۱۸۷۵	۸۸۳/۸۸ ± ۱۸۷۵	B۰/۰۰ ± ۱۲۵۰
کلرامفنیکل	A۳۵۳۵/۵۳± ۷۵۰۰	A۰/۰۰ ± ۱۰۰۰۰	A۰/۰۰ ± ۵۰۰۰	B	-
فلوکونازول	-	-	-	-	A۰/۰۰ ± ۱۰۰۰۰
				A۰/۰۰ ± ۱۰۰۰۰	

جدول ۴- نتایج MBC اسانس آویشن شیرازی، آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و ضد قارچ فلوکونازول بر میکروارگانیسم‌ها

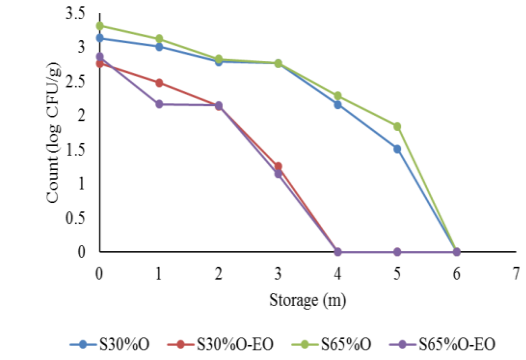
میکروارگانیسم	*اشریشیاکلی*		*سالمونلا*	*استافیلوکوکوس*	*ساکارومایسس*	*پنی سیلیوم*
اسانس	۷۷ ± ۳۷۵۰		۰/۰۰± ۲۵۰۰	۸۸۳/۸۸ ± ۲۵۰۰	B۰/۰۰± ۲۵۰۰	± ۱۸۷۵
کلرامفنیکل	A۱۷۶۷/		B	B	-	B۸۸۳/۸۸
فلوکونازول	± ۷۵۰۰		۰/۰۰± ۵۰۰۰	A۰/۰۰± ۵۰۰۰	۰/۰۰± ۱۰۰۰۰	-
	A۳۵۳۵/۵۳		A	-	A	۰/۰۰± ۱۰۰۰۰
	-		-			A

اشرشیاکلی

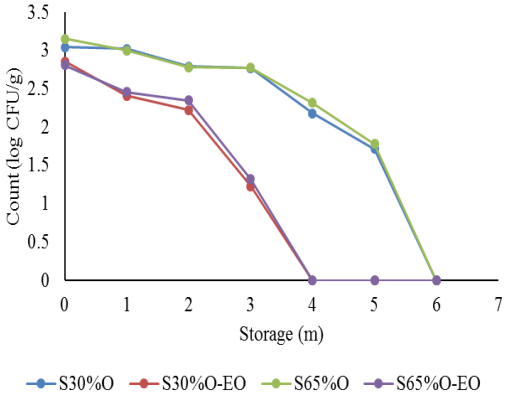
شکل ۳ بررسی زنده مانی *اشرشیاکلی* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی بر در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری را نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های دارای اسانس آویشن تعداد میکروارگانیسم پایین‌تری نسبت به نمونه‌های کنترل دارند و با گذشت زمان این اختلاف بیشتر شده است. تعداد اولیه باکتری‌ها در روز دوم در محدوده لگاریتم ۲/۸۰ تا ۳/۱۶ بود. در نمونه‌های حاوی اسانس بعد از ۴ ماه و نمونه‌های کنترل بعد از ۶ ماه تعداد باکتری از تعداد قابل شمارش خارج شد. هم-چنین نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های ۳۰ و ۶۵ درصد چربی در تیمارهای یکسان وجود نداشت.

www.SID.ir

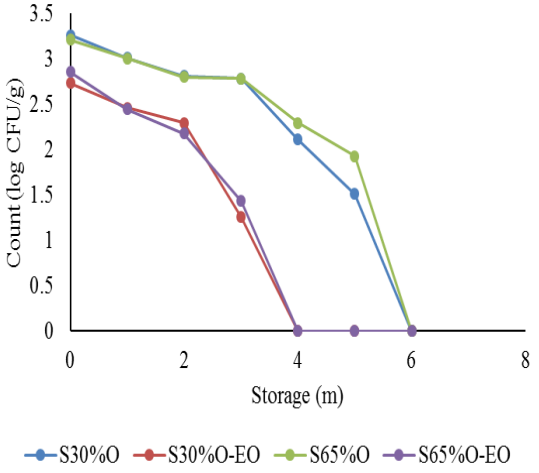
Archive of SID



شکل ۲- بررسی زنده مانی *استافیلوکوکوس اورئوس* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری



شکل ۳- بررسی زنده مانی *اشرشیاکلی* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری



شکل ۴- بررسی زنده مانی *سالمونلا اینتریتیدیس* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری

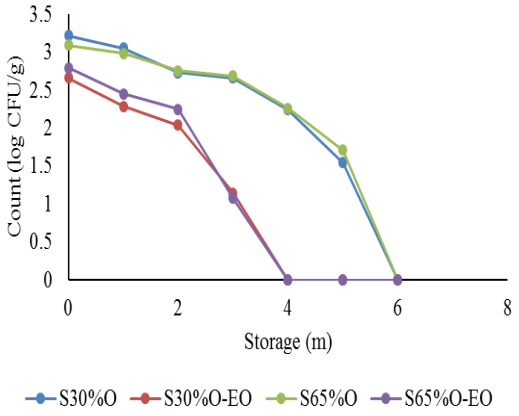
سالمونلا اینتریتیدیس

شکل ۴ بررسی زنده مانی *سالمونلا اینتریتیدیس* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی بر در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری را نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های دارای اسانس آویشن تعداد میکروارگانیسم پایین‌تری نسبت به نمونه‌های کنترل دارند و با گذشت زمان این اختلاف بیشتر شده است. تعداد اولیه باکتری‌های در روز دوم در محدوده لگاریتم ۲/۸۵ تا ۳/۲۱ بود. در نمونه‌های حاوی اسانس بعد از ۴ ماه و نمونه‌های کنترل بعد از ۶ ماه تعداد باکتری از تعداد قابل شمارش خارج شد. هم‌چنین نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های ۳۰ و ۶۵ درصد چربی در تیمارهای یکسان وجود نداشت.

کپک *پنی سیلیوم دیجیتاتوم*

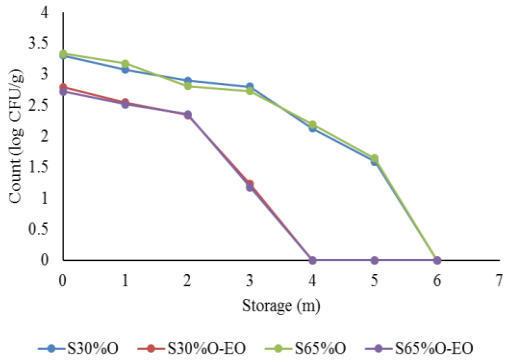
شکل ۵ بررسی زنده مانی *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی بر در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری را نشان می‌دهد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های دارای اسانس آویشن تعداد میکروارگانیسم پایین‌تری نسبت به نمونه‌های کنترل دارند و با گذشت زمان این اختلاف بیشتر شده است. تعداد اولیه باکتری‌های در روز دوم در محدوده لگاریتم ۲/۶۶ تا ۳/۲۱ بود. در نمونه‌های حاوی اسانس بعد از ۴ ماه و نمونه‌های کنترل بعد از ۶ ماه تعداد باکتری از تعداد قابل شمارش خارج شد. هم‌چنین نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های ۳۰ و ۶۵ درصد چربی در تیمارهای یکسان وجود نداشت.

www.SID.ir



شکل ۵- بررسی زنده مانی پنی سیلیوم دیجیتاتومتحت اثر اسانس آویشن شیرازی در نمونه¬های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری

شکل ۶ بررسی زنده مانی *ساکارومایسس سرویزیه* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی بر در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری را نشان می-دهد. همان طور که نتایج نشان می‌دهد نمونه‌های دارای اسانس آویشن تعداد میکروارگانیسم پایین‌تری نسبت به نمونه‌های کنترل دارند و با گذشت زمان این اختلاف بیشتر شده است. تعداد اولیه باکتری‌های در روز دوم در محدوده لگاریتم ۲/۷۲ تا ۳/۳۳ بود. در نمونه‌های حاوی اسانس بعد از ۴ ماه و نمونه‌های کنترل بعد از ۶ ماه تعداد باکتری از تعداد قابل شمارش خارج شد. هم‌چنین نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های ۳۰ و ۶۵ درصد چربی در تیمارهای یکسان وجود نداشت.



شکل ۶- بررسی زنده مانی *ساکارومایسس سرویزیه* تحت اثر اسانس آویشن شیرازی در نمونه‌های سس مایونز ۳۰ و ۶۵ درصد چربی طی ۶ ماه نگهداری

بحث

نتایج نشان می‌دهد این گیاه در مقایسه با سایر گیاهان اسانس قابل توجهی دارد. این نتایج با نتایج بدست آمده از سایر تحقیقات در ایران در مورد این واریته قابل مقایسه است. احتمالا دلیل این اختلاف، اختلافات ژنتیکی، فاکتورهای محیطی مختلف و یا زمان نمونه برداری است که از عوامل مهم موثر بر میزان اسانس بدست آمده از نمونه های گیاهی می‌باشند. در ضمن، روش های متفاوت استخراج اسانس و دستگاه های اسانس گیری بر میزان اسانس تاثیر زیادی دارد. همچنین روش خشک کردن نیز اثر قابل توجهی بر میزان اسانس نمونه دارد. از آنجا که نمونه حاوی اسانس فرار است با روش قرار دادن در سایه خشک می‌گردد. زیرا خشک کردن گیاهان با قرار دادن در سایه و مسیر جریان طبیعی هوا کم‌ترین تغییر و تحول ناخواسته را در گیاه و سلول‌های آن ایجاد می کند و میزان اسانس نمونه، رنگ، بو و ترکیبات موثره آن را حفظ می‌کند. در روش خشک کردن آفتابی میزان اسانس کاهش می‌یابد که علت آن ممکن است اثرات منفی تشعشعات آفتاب بر میزان اسانس نمونه باشد (نجفیان و همکاران، ۱۳۹۵، همامی و همکاران، ۱۳۹۲). مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده از سایر تحقیقات در ایران در مورد این واریته قابل مقایسه است. برای مثال شهسواری و همکاران (۱۳۸۷) ترکیبات تیمول، کارواکرول و پاراسیمن را در اسانس آویشن شیرازی مشاهده کردند. مهران و همکاران (۱۳۹۴) ترکیبات اسانس هفت گونه آویشن را بررسی کرده و کارواکرول را به عنوان ترکیب غالب در آویشن شیرازی گزارش کردند. کرمی و همکاران (۱۳۹۲) ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی در منطقه لرستان را بررسی کرده و تیمول، کارواکرول، کیمول و گاما ترپینن را در اسانس مشاهده کردند. همان‌گونه که مشخص است اجزای مهم اسانس و میزان نرکیبات با

www.SID.ir

Archive of SID

توجه به مناطق مختلف تغییر می‌کند. ترکیبات شیمیایی اسانس تحت تاثیر فاکتورهای مختلف همچون شرایط محیطی و جغرافیایی، زمان رشد گیاه، زمان جمع آوری گیاه، نور، رطوبت، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، شرایط آب و هوایی، روش خشک کردن گیاه، روش استخراج اسانس، سن گیاه و ... است (شهسواری و همکاران، ۱۳۸۷، کرمی و همکاران، ۱۳۹۲).

نتایج نشان داد که اسانس، سطوح متفاوتی از فعالیت ضد میکروبی را علیه نمونه های باکتریایی و قارچی نشان دادند و از رشد تمام گونه‌های میکروبی جلوگیری کرد. حساس‌ترین میکروارگانیسم (کمترین MIC) در بین میکروارگانیسم‌های مورد بررسی *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* و *ساکارومایسس سرویزیه* و مقاوم‌ترین آن ها نسبت به اسانس *سالمونلا اینتریتیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (جدول ۳). این نتایج نشان داد اسانس گیاه اثرات قابل توجهی علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس داشته و بر باکتری‌های گرم منفی این تاثیر ضعیف‌تر بوده است. برخی اسانس‌ها معمولا بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی تاثیر بیشتری دارند، در حالی‌که برخی از آن ها علیه هر دو گروه موثر هستند (آویشن، میخک، دارچین و لیمو) و برخی فقط بر باکتری‌های گرم منفی موثر می‌باشند (روغن سیر) (Holley and Patel, 2005). جدول ۲ نشان می‌دهد قوی‌ترین اثر و بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد، مربوط به *پنی سیلیوم گلوکوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود که در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های شیمیایی کلرامفنیکل و فلوکونازول بیشتر بود.

جلوگیری از عملکرد آنزیم‌ها برای تولید انرژی است. اگرچه بروز فعالیت ضد میکروبی اغلب بسیار واضح است ولی مکانیسم عمل آن بطور کامل درک نشده است (عروجعلیان و کسری کرمانشاهی، ۱۳۸۹، Holley and Patel, 2005).

از نتایج بدست آمده واضح است که ترکیبات شیمیایی اسانس و نقش سینرژیستی که ترکیبات جزئی با سایر ترکیبات دارند تاثیر مهمی بر فعالیت های ضد میکروبی این گیاه دارند. ترکیبات اسانس، ساختار و گروه‌های عاملی نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن ها ایفا می‌کنند. به عنوان مثال فعالیت ضدمیکروبی اسانس می‌تواند ناشی از حضور مقادیر تیمول و کارواکرول در اسانس باشد (جدول ۱). محققین زیادی فعالیت ضد-میکروبی این ترکیبات را بررسی کردند (Pattnaik et al. 1997 ; Aligiannis et al. 2000 ; Magiatis et al. 2002 ;Tzakou et al. 2001; Tabanca et al. 2001 ; Knobloch et al. 1989). معمولا ترکیبات حاوی گروه‌های فنولیک موثرتر هستند. ترکیبات آروماتیک و فنولیک اثرات ضد میکروبی خود را در غشای سیتوپلاسمی با تغییر ساختار و عملکرد آن انجام می‌دهند. توانایی ترکیبات فنولی در مداخله در متابولیسم سلولی از طریق مکانیسم‌هایی مانند شکستن غشا، غیرفعال‌سازی آنزیمی و شلاته کردن فلزات است. همچنین ترکیبات غیر فنولیک اسانس‌ها نیز موثر می-باشند (Holley and Patel, 2005). احتمالا وجود مقادیر زیاد β- پینن، α- پینن و کامفن در این تحقیق با خاصیت ضد میکروبی این اسانس مرتبط است. تمام این ترکیبات به عنوان عوامل قوی ضد میکروبی تایید شده‌اند. ترکیبات شیمیایی اسانس از قبیل هیدروکربن های منوترپن اثر حفاظتی قابل مشاهده دارند (عروجعلیان و کسری کرمانشاهی، ۱۳۸۹، Magiatis et al. 2002). ترپن‌ها توانایی شکستن و نفوذ به ساختار لیپیدی دیواره سلولی باکتری‌ها را دارند که منجر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و شکستن غشای سلولی و نشت سیتوپلاسمی و تخریب سلولی و نهایتا مرگ سلولی می‌شوند (Fisher and Phillips, 2008). P- سیمن هیدروفوبیک است و باعث تورم غشای سیتوپلاسمی می‌شود.

www.SID.ir

کارایی بیشتر P- سیمن در لایه لیپیدی باکتری انجام می‌شود (Burt, 2004). تیمول متعلق به فنل های مونوترپنی است که توسط پیوندهای هیدروفوبیک و هیدروژنی به پروتئین‌های غشا متصل می‌شود و نفوذپذیری غشا را تغییر می‌دهد. در pH پایین مولکول تحقیقات نشان می‌دهد که اسانس‌ها نفوذپذیری غشا را افزایش داده و ترکیبات اسانس در غشا حل شده و باعث تورم و کاهش عملکرد غشا می‌شوند. عوامل دیگری که منجر به اختلال و نقص در غشا و شکستن غشا می‌شوند شامل اختلاف pH و پتانسیل الکتریکی و تغییر در انتقال یون‌ها و یا دپلاریزاسیون، در نتیجه تغییرات ساختاری در غشا، دخالت در سیستم تولید انرژی در سلول (ATP) و تیمول گسسته نمی‌شود و بنابراین هیدروفوبیک‌تر است و بهتر به نواحی هیدروفوبیک پروتئین‌ها متصل شده و بهتر در فاز لیپید حل می‌شود (Burt, 2004). بررسی‌ها نشان داد که غشای خارجی *اشرشیاکلی* و *سالمونلا* در مجاورت کارواکرول و تیمول متلاشی می‌شود ولی باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها هیچ تغییری در مورفولوژی دیواره سلولی نشان نمی‌دهند که این امر به دلیل حلالیت لیپوپلی‌ساکاریدها در غشای خارجی است (Holley and Patel, 2005). اوژنول نوعی فنیل پروپانید است که دارای خاصیت ضد میکروبی است. گزارشات حاکی از آن است که اسانس های حاوی اوژنول یا تیمول بالاترین اثرات ضد باکتریایی را دارند. همچنین مشخص شد اوژنول علیه *اشرشیاکلی*، *انتروباکتر* و *کلبسیلا نومونیه* نسبت به آمپیسیلین، اریترومایسین و سولفامتیزول قوی‌تر است. اوژنول باعث فساد دیواره سلولی و تخریب سولی می‌شود. گروه‌های هیدروکسیل اوژنول به پروتئین ها متصل می‌شوند و از عملکرد آنزیم جلوگیری می‌کنند (Burt, 2004).

جدول ۲ و ۳ نشان می‌دهد که به طور معمول قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها در برابر اسانس ها حساس‌تر هستند که این امر ناشی از ساختار سلولی متفاوت آن‌هاست. تاثیر متفاوت اسانس بر میکروارگانیسم‌ها، نشان‌دهنده ساختار متفاوت آن‌ها و نحوه عملکرد متفاوت اسانس نسبت به آن‌هاست (Ahmadi-Dastgerdi et al., 2019). بر اساس تحقیقات صورت گرفته باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند. نتایج بدست آمده در این تحقیق، (بالاتر بودن MIC اسانس علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت) نیز حاکی از حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی بود. به دلیل وجود غشاهای خارجی نسبتا نفوذ ناپذیر احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی (لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی) منطقی بنظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند. این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند. لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی احتمالا مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود. در باکتری‌های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس ها با لایه فسفولیپید دو لایه ای صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا بصورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (Burt, 2004 ,Fisher and Phillips 2008;). علاوه بر این اختلاف در هیدروفوبیسیتی سطح سلول می‌تواند از جمله فاکتورهای موثر دیگر باشد. سلول‌های گرم منفی سطح هیدروفوبیک‌تری دارند که توسط پروتئین‌های پورین در غشای خارجی سلول‌های گرم منفی منشعب شده اند. این امر کانال-های بزرگی ایجاد می‌کند که عبور ترکیباتی با جرم

www.SID.ir

Archive of SID

مولکولی کم مانند ترکیبات فنولیک موجود در اسانس را محدود می‌کند و به آن‌ها اجازه دسترسی به فضای پری پلاسمیک، لایه گلیکوپروتئین و غشای سیتوپلاسمی را می‌دهد (Holley and Patel, 2005). پیچیدگی فیزیکوشیمیایی بیشتر دیواره سلولی باکتری-های گرم منفی نیز حاکی از تفاوت در حساسیت دو گروه از باکتری‌ها است (Holley and Patel, 2005). سایر مطالعات موید تاخیر زمانی در رشد باکتری‌های گرم منفی در اثر افزودن اسانس هستند. بنابراین در یک بازه زمانی طولانی، اسانس ها اثرات مشابهی را روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌گذارند Fisher (and Phillips, 2008). در مورد *اشرشیاکلی*، دو علت عمده تاثیر بازدارندگی اسانس بر باکتری عبارتند از: زمان تاثیر اسانس و مهاجرت ترکیبات بازدارنده به اطراف هاله. به قطعیت نمی‌توان علت تاثیر بازدارندگی اسانس بر *اشرشیاکلی* را بر اساس، فرضیه کشندگی اسانس استوار ساخت، زیرا دیواره سلولی این باکتری بیشتر از ترکیبات لیپیدی ساخته شده است تا ترکیبات پپتیدوگلیکانی. اما غشای سلولی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر پپتیدوگلیکانی می‌باشد (Hathcox et al. 1995, Gomez-Lucia et al. 1990).

از آن جایی‌که سیستم‌های طبیعی معمولا دارای پیچیدگی بیشتری نسبت به شرایط آزمایشگاهی هستند، لذا علاوه بر مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن در محیط آزمایشگاهی این ویژگی در سس مایونز و بر روی باکتری‌ها و قارچها نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که مشخص است در نمونه‌های حاوی اسانس هیچگونه رشد میکروبی مشاهده نشد. این نتایج مشابه نتایج بدست آمده در بررسی فعالیت ضد میکروبی بسیاری از اسانس ها بر ضد گونه‌های باکتریایی در in vitro و سیستم‌های غذایی است (Roufegari Nejad et al. 2015). Silva وFranco در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که حضور ۰/۲٪ اسانس آویشن در مایونز باعث کاهش شمارش *سالمونلا اینترتیدیس* شد. همچنین در نمونه های حاوی نگه-دارنده شیمیایی، سلول‌های زنده میکروبی در طول نگهداری مشاهده نشدند. فعالیت ضد میکروبی اسانس، احتمالا به دلیل واکنش ترکیبات اسانس با غشا سلولی و دیواره سلولی باکتری‌ها است که با افزایش نفوذپذیری غشا و نشت مواد از دیواره سلولی، تورم غشا، کاهش عملکرد غشا به دلیل جلوگیری از فعالیت آنزیم‌ها و همچنین توانایی جذب مواد مغذی باکتری‌ها، از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند (Holley and Patel, 2005).

Kisko و Rolle(۲۰۰۵) مشاهده کردند که ترپینن دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *اشرشیاکلی* در آب سیب است. در مطالعات قبلی، برخی ادویه جات از جمله سیر و میخک اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسید علیه *سالمونلا اینتریتیدیس* و *اشرشیاکلی* نشان دادند و نتیجه گرفتند که *اشرشیاکلی* حساس‌تر است (Leuschner & Zamparini, 2002; Souza et al. 2005). تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که S. *سرویزیه* در مجاورت تیمول دچار صدمه و مرگ می شود (Wallis, 2013). با این وجود نسبت دادن فعالیت ضدمیکروبی اسانس به یک ترکیب خاص به دلیل پیچیدگی و متغیر بودن آن مشکل است. در برخی موارد فعالیت اسانس زمانی که به یک سیستم غذایی پیچیده افزوده می‌شود به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. برای مثال Firouzi و همکاران (۲۰۰۷) دریافت که اسانس آویشن و جوز هندی در سیستم براث علیه *اشرشیاکلی* موثر بود ولی در جوجه‌های آماده به پخت هیچ اثری نداشت. همچنین Uhart و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کرد که ادویه جات، سالمونلا تایفی موریوم را غیر فعال کردند اما زمانی که در گوشت بکار برده شدند فعالیت آن ها کاهش پیدا کرد.

رشد میکروارگانیسم‌ها در مایونز بسته به pH، نوع اسید بکار رفته، درجه حرارت و زمان نگهداری متغیر است (Rhee et al. 2003; Yolmeh et al. 2014). فعالیت ضد میکروبی اسانس در مواد غذایی به فاکتورهای

www.SID.ir

زیادی از جمله غلظت نهایی در ماده غذایی، وزن مولکولی، pH و درجه حرارت بستگی دارد. اثرات ضد-میکروبی اسانس در مایونز، به ویژه علیه باکتری‌های گرم منفی بستگی به pH دارد. بنابراین محتمل است که اسیدیته و pH مایونز اجازه رشد میکروبی در مایونز را نمی‌دهد (Manios et al. 2014). بنابراین ماهیت اسیدی مایونز، توانایی اسانس را برای نفوذ به غشای سلولی باکتریایی بهبود می‌بخشد (Silva and Franco, 2012). در pH پایین هیدروفوبیسیتی اسانس‌های روغنی افزایش می‌یابد. بنابراین تمایل دارند در فاز لیپیدی ماده غذایی پخش شوند. در نتیجه در فاز لیپیدی غشای باکتریایی آسان‌تر حل می‌شوند و عملکرد ضد میکروبی را تقویت می‌کنند (Holley and Patel, 2005). زمانی که pH کاهش می‌یابد فاز کمون افزایش و میزان رشد کاهش می یابد. طبق یک قاعده کلی، حساسیت میکروارگانیسم‌ها به اثر ضدمیکروبی اسانس با کاهش pH ماده غذایی، درجه حرارت نگهداری و مقدار اکسیژن موجود در فرآورده افزایش می‌یابد (Djenane et al. 2013; Burt, 2004). درجه حرارت بکار رفته در طول دوره نگهداری مایونز در این مطالعه (۴ ^{o}C)، فعالیت ضد میکروبی اسانس را فزایش می‌دهد (Manios et al. 2014; Xiong et al. 1999).

به طور کلی ترکیب شیمیایی و شرایط فیزیکی سیستم ماده غذایی اثر مهمی بر تاثیر مواد ضدمیکروبی در مهار میکروارگانیسم‌ها دارد. تاثیر ترکیبات ماده غذایی روی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های روغنی بسیار مهم است. حضور چربی، کربوهیدرات، پروتئین و نمک بر موثر بودن این ترکیبات در مواد غذایی تاثیرگذار هستند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش بیان‌گر اثرات مثبت اسانس گیاه آویشن شیرازی بر سویه‌های میکروبی بوده و با توجه به این نتایج می‌توان به ساخت نگه‌دارنده‌هایی مناسب جهت از بین بردن این میکروارگانیسم‌ها با استفاده از اسانس مذکور امیدوار بود. مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص ضد میکروبی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد، از دلایل آن می توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتری اسانس‌ها، منابع تهیه آنها و سویه‌های باکتریایی به کار برده شده، اشاره کرد. بطور کلی ترکیبات اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش گیاه، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس، روش خشک کردن و استخراج اسانس متفاوت است. به نظر می‌رسد بسیاری از ترکیبات اسانس، سلول را مورد هدف قرار می‌دهند. ترکیبات لیپوفیل از غشای سیتوپلاسم عبور کرده و ساختار سلول را به هم ریخته و مختل می‌کند و آن‌ها را نفوذ پذیر می‌کند.

منابع

۱. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۹۳. مایونز و سس های سالاد. تجدید نظر دوم. شماره ۲۴۵۴.
۲. سازمان ملی استاندارد ایران. ۱۳۸۶. میکروبیولوژی مایونز و سس های سالاد. تجدید نظر دوم. شماره ۲۹۶۵.
۳. شهسواری، ن.، برزگر، م.، سحری، م.، نقدی بادی، ح. ۱۳۸۷. بررسی اثر آنتی اکسیدانی اسانس های آویشن شیرازی (Zataria multifora boiss) و زیره کوهی(Bunium persicum Boidd) در روغن سویا. نشریه گیاهان دارویی. ۲۸: ۵۷-۶۸.
۴. جعفری خطایلو، ی.، الماسی، ه. ۱۳۹۷. مقایسه تأثیر اسانس نعناع فلفلی و بنزوات سدیم بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی، میکروبی، حسی و رئولوژیکی سس مایونز. علوم و صنایع غذایی.
۵. قربانی، ش.، روزبه نصیرانی، ل.، جوری، م. ح. ۱۳۹۴. اثر ضد میکروبی اسانس پونه کوهی (Mentha longifolia) بر باکتری *سالمونلا اینتریتیدیس* در سس مایونز. مجله میکروب شناسی مواد غذایی. ۶: ۱۵-۲۶.
۶. کرمی، ک.، حیدری جمشیدی ا و آریاپور، ع. ۱۳۹۲. بررسی خصوصیت ضد باکتریایی و ترکیب های

Archive of SID

شیمیایی اسانس حاصل از گیاه آویشن شیرازی (Zataria multifora boiss) در منطقه کریت-استان لرستان. فصلنامه اکو فیزیولوژی گیاهی. ۱۳(۵): ۶۴-۸۰.

۷. مهران، م.، حسینی، ح.، حاتمی، ع.، تقی‌زاده، م و صفایی، ع. ۱۳۹۵. بررسی ترکیبات اسانس هفت گونه آویشن و مقایسه خاصیت ضداکسیدانی آنها. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی. ۲، ۵۸: ۱۳۴-۱۴۰.

۸. ضابطیان حسینی، ف.، مرتضوی، س.ع.، فضلی بزار، ب.ص.، کوچکی، آ و بلوریان، ش. ۱۳۸۹. بررسی اثر عصاره اویشن باغی بر PT4 salmonella enteritidise موجود در سس مایونز. نشریه پژوهش های علوم و صنایع غزایی ایران. ۲، ۸۴.

۹. نجفیان، ش.، شاهچراغی، م. ع و روشن، و. ۱۳۹۵. اثر مدت زمان استخراج بر محتوا و و ترکیب های اسانس دو گونه آویشن شیرازی و آویشن دنایی در مرحله گلدهی. مجله علوم و فنون باغبانی ایرانی. ۱۷: ۱۸۱-۱۹۲.

۱۰. همامی، س.، رضایی، م.، جایمند، ک و افضل زاده، ر. ۱۳۹۲. بررسی و مقایسه ترکیب های شیمیایی اسانس گیاه بومادران با دو روش تقطیر با آب و دستگاه مایکروویو. مجله گیاهان دارویی اکوفیتوشیمی.

11. Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., Rahimi, E. 2017. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers and Leaves of Achillea millefolium subsp. millefolium. J Essent Oil Bear Pl. 20(2): 395 - 409

12. Ahmadi-Dastgerdi, A., Ezzatpanah, H., Asgary, S., Dokhani, S., Rahimi, E., Gholami-Ahangaran, M. 2019. Oxidative Stability of Mayonnaise Supplemented with Essential Oil of Achillea millefoliumssp. millefolium during Storage. J Food Sci Thechnol. 13(1):34-41.

13. Aligiannis, N., Kalpoutzakism, E., Chinou, I.B., Mitakou, S., Gikas, E, & Tsarbopoulos, A. 2000. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. J Agri Food Chem. 49(2):811-815.

14. Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H. Ozkan, H., Smoken, M. and Zbek, T. 2006. Biological activities of the essentional oil and Methanol extract of Achillea biebersteinii Afan. (Asteraceae). Turkey J. Biology. 30:65-73.

15. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A. & Igic, R. 2008. Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). Food Chem. 111(4): 925–929.

16. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J food microbiol. 94(3): 223-253.

17. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A. & Akpulat, H. A. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of Achillea millefolium subsp. millefolium Afan. (Asteraceae). J Ethnopharmacol. 87(2): 215–220.

18. Depree, J.A., and Savage, G.P. 2001. Physical and flavour stability of mayonnaise. Trends Food Sci Tech. 12(5-6): 157-163.

19. Djenane, D., Yangüela, J., Roncalés, P., & Aider, M. 2013. Use of essential oils as natural food preservatives: effect on the growth of Salmonella enteritidis in liquid whole eggs stored under abuse refrigerated conditions. J Food Res. 2(3): 65.

20. Fisher, K. and Phillips, K. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends Food Sci Tech. 19(3): 156-164.

21. Firouzi, R., Shekarforoush, S.S., Nazer, A.H., Borumand, Z. & Jooyandeh, A.R. 2007. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of Yersinia enterocolitica and Listeria monocytogenes in barbecued chicken. J Food Protect. 70(11): 2626–2630.

22. Gomez-Lucia, E., Goyache, J., A. Orden. J., Domenech, A., Javier Hernandez, F., Ruiz-Santa-Quiteria, J., Suarez, G. 1990. Influence of temperature of incubation on Staphylococcus aureus growth and enterotoxin production in homemade mayonnaise. J Food Protec. 53(5): 386-390.

23. Hathcox, A. K., Beuchat, L. R. & Doyle, M. P. 1995. Death of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. Appl Environ Microbiol. 61(12): 4172–4177.

24. Holley, R. A., & Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and

www.SID.ir

mustard flour and acetic acid against Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol. 2959–2963.
35. Roller, S. & Covill, N. 2000. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. J Food Protect. 63(2): 202–209.
36. Roufegari Nejad, L., Adeli Milani, M. & Ghasemi Afshar, P. 2015. Evaluation of the composition and antimicrobial properties of Mentha piperita L. leaf powder in Italian salad dressing. J Appli Environ Biol Sci. 5(11): 151-156.
37. Silva, L. & Melo Franco, B.D.G. 2012. Application of oregano essential oil against salmonella enteritidis in mayonnaise salad. Int J Food Sci Nut Eng. 2(5): 70-75.
38. Sinaeyan, S. & Sani, A. M. 2014. Antimicrobial activity of Ziziphora clinopodioides Essential Oil and Extract on Salmonella enterica, Staphylococcus aureus and Saccharomyces cerevisiae in low fat mayonnaise. BTAIJ. 10(24).
39. Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Demirci, F. and Baser, K. H. C. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Micromeriacristata subsp. phyrgiaand the Enantiomeric Distribution of Borneol. J Agri Food Chem.49: 4300–4303.
40. Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I. B. & Harvala, C. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Salvia ringens. Planta Medica. 67: 81–83.
41. Uhart, M., Maks, N. & Ravishankar, S. 2006. Effect of spices on growth and survival of Salmonella typhimurium DT 104 in ground beef stored at 4 and 8 ^{O}C. J Food Saf. 26(2): 115–125.
42. Yolmeh, M., Habibi Najafi, M.B., Farhoosh, R. & Salehi, F. 2014. Modeling of antibacterial activity of annatto dye on Escherichia coli in mayonnaise. Food Biosci. 88(13).
43. Xiong, Y. L. & Kupski, D. R. 1999. Time-dependent marinade absorption and retention, cooking yield, and palatability of chicken filets marinated in various phosphate solutions. Poult Sci.78 (7): 1053–1059.
smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22(4): 273-292.
25. Knobloch, K., Pauli, A., Iberi, B., Wegand, H. & Weis, N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J Essent Oil Res. 1(3): 119–128.
26. Leuschner, R.G., & Zamparini, J. 2002. Effects of spices on growth and survival of Escherichia coli 0157 and Salmonella enterica serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. Food Control. 13(6-7): 399-404.
27. Lock, J.L. & Board, R.G. 1994. The fate of Salmonella enteritidis PT4 in deliberately infected commercial mayonnaise. Food Microbiol. 11: 499–504.
28. Lock, J.L. & Board, R.G. 1995. The fate of Salmonella enteritidis PT4 in home-made mayonnaise prepared from artificially inoculated eggs. Food Microbiol. 12: 181–186.
29. Magiatis, P., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I. & Haroutounian, S. A. 2002. Chemical Composition and In-Vitro Antimicrobial Activity ofthe Essential Oils of Three Greek Achillea Species. Zeitschrift Für Naturforschung. 57(3-4): 287–290.
30. Manios, Y., Androutsos, O., Katsarou, C., Iotova, V., Socha, P., Geyer, C. and De Bourdeaudhuij, I. 2014. Designing and implementing a kindergarten-based, family-involved intervention to prevent obesity in early childhood: The ToyBox-study. Obesity reviews. 15(S3): 5-13.
31. Mazandarani, M., Momeji, A. & Zarghami Moghaddam, P. 2013. Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Activities from Different Parts of Nasturtium Officinale R. Br. In Mazandaran, 3(2): 659–664.
32. Pattnaik, S., Subramanyam, V.R, Bapaji, M. & Kole, C.R. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios. 89(358): 39–46.
33. Radford, S.A., & Board, R.G. 1993. Fate of pathogens in home-made mayonnaise and related products. Food microbiol. 10(4): 269-278.
34. Rhee, M.S., Lee, S.Y., Dougherty, R.H., Kang, D.H. 2003. Antimicrobial effects of

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of Thyme (*Zataria multiflora boiss*) essential oil against bacterial and fungal strains in mayonnaise

Hajimohammadi-Telkabadi B[1], Ahmadi-Dastgerdi A[2*]

1. Graduated of Master, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

Corresponding Author: *as.ahmadi17@gmail.com*

Received: 12 July 2019 Accepted: 13 October 2019

Abstract

Essential oils are considered as alternative to synthetic preservatives in food products because of their antimicrobial properties. The aim of this study was to identify the main components of thyme (*Zataria multiflora boiss*) essential oil and to evaluate the antimicrobial activity of essential oil in vitro and mayonnaise. The essential oil was extracted by distillation and analyzed by gas chromatography. The antimicrobial activity of the essential oil was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. GC analysis of the essential oil resulted in the identification of forty compounds by a high number of monoterpenes such as thymol and carvacrol. The most susceptible pathogens were the fungi (lowest MIC) and the most resistant pathogen to Gram-negative bacteria. This study confirms that the essential oil of thyme possessed antimicrobial properties in vitro. In the second phase, efficiency of essential oil as natural preservative in high fat and low fat mayonnaise kept during storage at 4^{o}C for 6 months was studied. The results showed that of essential oil had influence against all of the tested microorganisms in mayonnaise and the pathogens did not grow in mayonnaise formulations, whereas in the control mayonnaise all of the pathogens and fungus grew. In conclusion the essential oil of thyme (*Zataria multiflora boiss*) would lead to control food pathogen and food spoilage organisms as natural food preservative and therefore, it would be used in biotechnological fields as natural preservative ingredients in food industry.

Keywords: Thyme (*Zataria multiflora boiss*), antimicrobial activity, essential oil, Mayonnaise.

www.SID.ir