

## تاثیر اسانس نعناع بر میزان بقاء/اشریشیاکولای O157:H7 در پنیر سنتی ليقوان در طول دوره

## رسیدن

محمد بافنده زنده<sup>۱</sup>، ودود رضویلر<sup>۱\*</sup>، حمید میرزایی<sup>۲</sup>، خسرو محمدی<sup>۲</sup>

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

\*نویسنده مسئول: V.razavi@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵

## چکیده

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی هستند. هدف از این مطالعه، ارزیابی غلظت‌های مختلف اسانس گیاه نعناع بر میزان بقاء/اشریشیاکولای O157:H7 در پنیر سنتی ليقوان می‌باشد. اسانس نعناع با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد و آنالیز اسانس‌ها توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. جهت تعیین حداکثر مقدار استفاده از اسانس ارزیابی حسی انجام گرفت. نمونه‌های پنیر با کمک تولید کنندگان محلی مستقر در روستای ليقوان در سه تکرار، حاوی غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm از اسانس نعناع و با دزهای ۱۰<sup>۳</sup> و ۱۰<sup>۵</sup> CFU/mL از باکتری اشریشیاکولای O157:H7 تهیه شد و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دوره رسیدن، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که استفاده از اسانس نعناع با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm در مقایسه با گروه کنترل در نودمین روز نگهداری، میانگین لگاریتم تعداد/اشریشیاکولای O157:H7 را به طور معنی داری کاهش داده است (P<0/05). لذا در مجموع می‌توان گفت که اسانس نعناع، می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در پنیر سنتی ليقوان استفاده شود ولی حتما باید در غلظت‌هایی استفاده شود که فاقد اثرات سوء بر عطر و طعم ماده غذایی باشند.

**کلید واژه‌ها:** اسانس نعناع، اشریشیاکولای O157:H7 و پنیر سنتی ليقوان.

## مقدمه

میوه‌ها یافت می‌شود (Sheeladevi and Ramanathan, 2012). بیماری‌های ناشی از این باکتری به صورت انفرادی و اپیدمی در نقاط مختلف دنیا گزارش شده است (Selim, 2011). سندروم همولیتیک اورمیک و کولیت خونریزی دهنده از طریق تولید توکسین شبه شیگلا (مخصوصاً توکسین STX) توسط این سویه ایجاد می‌شود. سندروم همولیتیک اورمیک باعث کم خونی همولیتیک، ترومبوسیتوپنی و نارسایی حاد کلیه می‌گردد و کولیت هموراژیک موجب اسهال خونی، کرامپ‌های شکمی شدید، تهوع، استفراغ و به ندرت تب می‌شود (Jay et al., 2005).

پنیر ليقوان به عنوان یک پنیر سفید رسیده در آب نمک بوده و یکی از پرمصرفترین پنیرهای سنتی ایران می‌باشد که در روستای ليقوان واقع در جنوب شرقی تبریز در شمال غرب ایران تولید می‌گردد. در تولید این

امروزه بیماری‌های با منشأ مواد غذایی در تمام دنیا حتی در کشورهای پیشرفته ای مثل آمریکا خسارات جبران ناپذیری در زمینه های مختلف اقتصادی، اجتماعی و سلامت به بار می‌آورند. غذاهای فاسد شده، علاوه بر آسیب به سلامت مصرف کننده، به تولید کننده نیز از لحاظ اقتصادی ضرر می‌رساند. طبق گزارش مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها، در آمریکا عفونت‌های غذایی مثل سالمونلا، اشریشیاکولای O157، کمپیلوباکتر، لیستریا، شیگلا، ویبریو و یرسینیا موجب بیماری حدود ۱۵ درصد از مردم شده است که جمعیتی بالغ بر ۴۸ میلیون نفر را شامل می‌شود (Crim et al., 2014). اشریشیاکولای O157:H7 به عنوان یکی از نگرانی‌های عمومی، در سطح جهان مطرح است و در برخی مواد غذایی از جمله گوشت و فرآورده‌های گوشتی، شیر، سبزیجات، سالاد و آب

تشکیل شدن ترکیبی به نام کارون (Carvon) که درصد بالایی از اسانس را شامل می‌شود (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Foda et al., 2009). هدف مطالعه حاضر تعیین اثر ضد میکروبی غلظت های مختلف اسانس گیاه نعناع بر میزان بقاء اشیریشیا کولای O157:H7 در پنیر سنتی لیقوان در طول دوره رسیدن بود.

## روش کار

تهیه گیاهان و اسانس‌ها

گیاه نعناع به صورت تر از سبزی فروشی‌های محلی موجود در شهر تبریز تهیه شد و ابتدا از نظر مورفولوژیک نام علمی گیاه با استفاده از کلیدهای شناسایی، توسط گیاه شناس پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی تأیید گردید. اسانس روغنی گیاه نعناع، بعد از خشک شدن نمونه گیاهی در سایه، به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر جداسازی شد. در هر بار اسانس‌گیری، چهل گرم از گیاه به صورت مجزا و نیم‌کوب شده در بالون یک لیتری دستگاه کلونجر ریخته شد و مقداری آب که ۴ تا ۶ برابر وزن گیاه بود، برای نرم شدن بافت‌های گیاه به آن اضافه گردید. اسانس موجود در آن بعد از تقطیر به مدت ۳ ساعت جمع‌آوری گردید، سپس این مخلوط با سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری و تا زمان استفاده در دمای یخچال نگهداری شد. ترکیب شیمیایی اسانس با استفاده از دستگاه GC/MS شناسائی شد. جهت تعیین مقدار یا غلظت اسانس نعناع برای افزودن به نمونه‌های شیر برای تولید پنیر، ابتدا پنیر لیقوان آماده مصرف از فروشنده‌های محلی تهیه و به ۵ قسمت مساوی تقسیم و به ترتیب به آنها مقدار صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ppm از اسانس نعناع اضافه و کاملاً همگن شد. سپس ارزیابی حسی توسط یک پانل ۱۵ نفره از دانشجویان و کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام

پنیر از شیر خام گوسفند و معمولاً همراه با حدود ۳۰-۲۰ درصد شیر بز و بدون مایه کشت استفاده می‌شود. اکثر تولید کنندگان پنیرهای سنتی معتقد هستند که استفاده از شیر خام باعث ایجاد عطر و طعم مطبوع در پنیر می‌شود که این امر در واقع به دلیل فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک موجود در شیر و تولید شده توسط میکروفلور شیر خام می‌باشد (میرزائی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰). مواقعی که کیفیت بهداشتی شیر خام مناسب نباشد، خطر انتقال بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را در پی دارد، ضمناً بسیاری از مراحل تولید این پنیر بصورت دستی و با استفاده از تجهیزات سنتی انجام می‌پذیرد، لذا تمام این موارد خطر بروز آلودگی این محصول با میکروب‌های مولد فساد، بخصوص بیماریزا از قبیل سالمونلا، لیستریا مونوسایتوجنز، اشیریشیا کولای تولید کننده وروسایتوتوکسین و استافیلوکوکوس آرتوس از طریق حیوان، محیط و بخصوص کارگران ناقل افزایش می‌دهند و مجموعه این عوامل بهداشت و مدت زمان ماندگاری این محصول را کاهش می‌دهند (پورعلی بهزاد و میرزایی، ۱۳۹۰؛ Mirzaei et al., 2008).

اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی هستند. کاربردهای فراوان آن‌ها به منظور کنترل رشد باکتری‌های بیماری زا با منشاء غذایی و یا باکتری‌های عامل فساد، موجب به کارگیری آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های غذایی شده است (صادقی و همکاران، ۱۳۸۹). گیاه نعناع دارای ۴۰۰۰ گونه است که در ۲۰۰ جنس جای داده شده است. پراکندگی آن به صورتی است که در غالب نواحی کره زمین یافت می‌شود اما بیشترین انتشار آن در منطقه مدیترانه است (زرگری، ۱۳۷۹). در بین جنس‌های مختلف این گیاه، *منتا* (*Mentha*) از جنس‌های مهم تیره نعناع است. گونه *منتا اسپیکاتا* از لحاظ ترکیب اسانس تفاوت‌هایی با دیگر گونه‌های نعناع دارد که اصلی‌ترین این تفاوت‌ها عدم وجود منتول و

پذیرفت. اعضاء پانل معیار خود از ارزیابی حسی پنیر ليقوان حاوی اسانس را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای مشخص نمودند. در این مقیاس نمره ۹ خیلی عالی، نمره ۸ عالی، نمره ۷ خوب، نمره ۶ نسبتاً خوب، نمره ۵ نه خوب نه بد، نمره ۴ نسبتاً بد، نمره ۳ بد، نمره ۲ خیلی بد و نمره ۱ فوق العاده بد لحاظ گردید (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰). براساس نتایج حاصله از این مرحله غلظت اسانس نعنای با بالاترین نمره دریافتی (۲۰۰ ppm) و نصف آن (۱۰۰ ppm) جهت استفاده در تولید نمونه‌های مورد نیاز در این مطالعه انتخاب شد.

باکتری مورد مطالعه

در این مطالعه باکتری /شیریشیا کولای O157:H7 (ATCC 35218) از گروه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. برای انجام مطالعه از تعداد  $10^2$  و  $10^5$  CFU/mL استفاده شد، به این منظور باکتری در دو نوبت متوالی به فواصل ۲۰ و ۲۴ ساعت در محیط کشت آبگوشت مغذی کشت و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. به منظور دستیابی به مقادیر مورد نظر جهت تلقیح از استاندارد ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. از کشت ۲۰ ساعته به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، تعداد باکتری در هر میلی لیتر محاسبه گردید.

تولید پنیر سنتی ليقوان

برای تولید پنیر از شیر تازه و خام میسر از منطقه ليقوان استفاده شد. شیر از نظر وجود بقایای آنتی بیوتیکی با آزمایش بتا استار تست شد. هم چنین جست و جوی /شیریشیا کولای O157:H7 در شیر با استفاده از کشت سطحی صورت پذیرفت. برای تولید پنیر ابتدا ضمن مشاهده مراحل تولید در کارگاه‌های تولید پنیر در منطقه ليقوان و صحبت با تولید کنندگان خبره و با استفاده از راهنمایی و کمک تولید کنندگان محلی روستای ليقوان، پنیر کاملاً به روش سنتی تولید شد. به این ترتیب که ابتدا دمای شیر خام در حدود ۲۳ درجه سانتیگراد تنظیم شد و باکتری در دوزهای مورد نظر به شیر فاقد باکتری /شیریشیا کولای O157:H7 تلقیح شد. سپس رنت به میزان ۰/۰۰۱ درصد و همزمان اسانس نعنای در غلظت های صفر، ۱۰۰ و

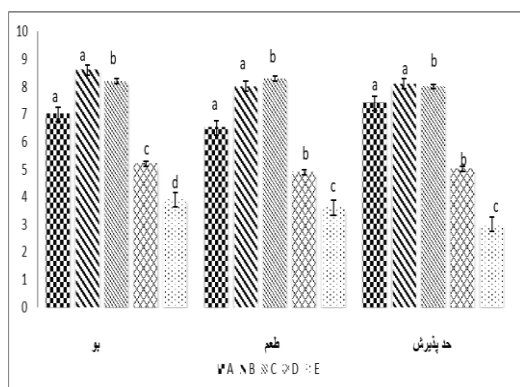
۵۴ تا ۴۴ صفحات ۹۹ - تابستان ۲۰۱۹ - سال هفتم / شماره ۲ / تابستان ۹۹ - صفحات ۴۴ تا ۵۴

## تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا با استفاده از آزمون آماری کولموگروف - اسمیرنوف از نرمال بودن توزیع داده‌ها اطمینان حاصل شد. سپس برای بررسی تاثیر تیمارها در هر کدام از مقاطع زمانی مورد نظر از طرح کاملا تصادفی و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح  $\alpha = 0/05$  استفاده شد.

## نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی اولیه حسی توسط تست پانل نشان داد که اسانس نعناع با غلظت ۲۰۰ ppm از لحاظ طعم دارای بیشترین قابلیت تحمل برای ارزیاب‌ها می‌باشند. لذا از غلظت‌های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm در نمونه‌های پنیر سنتی لیقوان استفاده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) نمره‌های داده شده به ویژگی‌های حسی نمونه‌های پنیر با غلظت‌های مختلف اسانس نعناع A: نمونه کنترل، B: نمونه حاوی ۵۰ ppm، C: نمونه حاوی ۱۰۰ ppm، D: نمونه حاوی ۲۰۰ ppm، E: نمونه حاوی ۳۰۰ ppm  
a, b, c و d: تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر کدام از ویژگی‌های حسی معنی‌دار می‌باشد ( $P \leq 0/05$ )

مطابق جدول یک، نتایج حاصل از آنالیز اسانس نعناع نشان می‌دهد که کارون، لیمونن و  $\beta$  بوربونن به ترتیب

۲۰۰ ppm به نمونه‌ی شیر اضافه و بلافاصله به صورت کامل با همزن دستی به هم زده می‌شد تا در حد ممکن اسانس در لخته حاصله که معمولا در کمتر از ۳۰ دقیقه شروع به تشکیل می‌شود یکنواخت باشد. در طول مدت حدود دو ساعت تشکیل لخته کامل می‌شد. لخته‌ها در پارچه‌های ۸۰×۸۰ cm به مدت ۱-۱/۵ ساعت نگهداری شد. سپس لبه‌های نازک لخته برش داده شده و به وسط پارچه انتقال داده شد و دوباره پارچه‌ها به مدت ۱-۱/۵ ساعت بسته شدند. سپس وزنه‌هایی به وزن ۶-۱۲ کیلوگرم بر روی پارچه‌ها به مدت ۱-۱/۵ ساعت قرار داده شد. لخته‌ها در ابعاد حداقل ۱۰×۱۰ cm برش داده شد. قطعات پنیر در آب نمک ۱۸-۲۴ درصد به مدت ۴-۶ ساعت قرار داده شد. سپس ۶ بار بر روی قطعات پنیر دانه‌های نمک خشک در طول ۳-۶ روز پاشیده شد. در نهایت پنیرها در بسته‌های ۵۰۰ گرمی قرار داده شده و با آب نمک ۱۱ درصد پر شدند و در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ مورد آزمایش قرار گرفته و سه بار تکرار آزمایش صورت گرفت.

## شمارش میکروبی و تأیید/شیرشیا کولای O157:H7

به منظور شمارش/شیرشیا کولای O157:H7 از روش کشت سطحی و با انتقال ۰/۱ میلی لیتر از رقت‌های تهیه شده به پلیت‌های دوگانه حاوی محیط کشت سفکسیم تلوریت- سوربیتول مک کانگی آگار (-CT SMAC) واجد ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر سفکسیم و ۲/۵ میلی گرم در لیتر پتاسیم تلوریت کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های سوربیتول منفی (بی رنگ) شمارش گردید. تعداد ۵-۱۰ کلنی برای تأیید با تست‌های بیوشیمیایی سیمون سترات آگار، MR-VP، SIM agar، broth، TSI agar انتخاب شد (Downes and Itō, 2001).

اسانس نعناع با غلظت های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm بر کاهش میانگین لگاریتم تعداد باکتری /شیریشیا کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^3$  CFU/mL در نمونه های پنیر سنتی ليقوان طی فرآیند رسیدن تا روز ۹۰ را نشان داده شده است. میانگین لگاریتم تعداد /شیریشیا- کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^3$  CFU/mL در پنیرهای سنتی ليقوان توسط غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm اسانس نعناع در مقایسه با نمونه های فاقد اسانس در نودمین روز نگهداری به طور معناداری کاهش یافته است ( $P<0/05$ ). همچنین اثر غلظت ۲۰۰ ppm اسانس نعناع در مقایسه با اثر غلظت ۱۰۰ ppm نعناع در کاهش لگاریتم تعداد /شیریشیا- کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^3$  CFU/mL در پنیرهای سنتی ليقوان معنی دار می باشد ( $P<0/05$ ). جدول شماره سه اثر ضد میکروبی اسانس نعناع با غلظت های صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm بر کاهش میانگین لگاریتم تعداد باکتری /شیریشیا کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^5$  CFU/mL در نمونه های پنیر سنتی ليقوان طی فرآیند رسیدن تا روز ۹۰ را نشان می دهد. میانگین لگاریتم تعداد /شیریشیا کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^5$  CFU/mL در پنیرهای سنتی ليقوان توسط غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm اسانس نعناع در مقایسه با نمونه های فاقد اسانس در نودمین روز نگهداری به طور معناداری کاهش یافته است ( $P<0/05$ ).

جدول ۲- مقایسه میانگین (Mean±SD) لگاریتم تعداد /شیریشیا کولای *O157:H7* با دز تلقیحی  $10^3$  CFU/mL در پنیرهای سنتی ليقوان حاوی مقادیر مختلف اسانس نعناع در زمان های مختلف دوره رسیدن

غلظت اسانس	تعداد تکرار	دوره رسیدن (روز)			
		صفر	۳۰	۶۰	۹۰
صفر	۳	۵/۶۷±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۵/۲۵±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۴/۴۴±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۲/۸۸±۰/۰۱ <sup>a</sup>
۱۰۰	۳	۵/۵۴±۰/۰۶ <sup>a</sup>	۵/۱۷±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۴/۳۳±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۲/۰۴±۰/۰۴ <sup>b</sup>
۲۰۰	۳	۵/۵۲±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۵/۱۰±۰/۰۷ <sup>b</sup>	۴/۲۲±۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱/۵۱±۰/۰۷ <sup>c</sup>

a, b, c: در هر ستون میانگین هایی که فاقد حروف مشترک می باشند، تفاوت معنی داری با هم دارند ( $P<0/05$ ).

با ۷۱/۴۱، ۱۳/۲ و ۱/۷۳ درصد بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس را به خود اختصاص داده اند. جدول ۱- نتایج آنالیز اسانس نعناع مورد مطالعه با استفاده از GC/MS

نام ترکیب (نعناع)	اندیس بازداری	درصد
Limonene	۶۱۰	۱۳/۲
$\beta$ -bourbonene	۹۹۶	۱/۷۳
Cis-Dihydrocarveol	۷۳۶	۱/۳۹
terpinene	۵۶۶	۰/۲۳
Terpene -4-ol	۷۱۵	۰/۸۶
Trans-Caryophyllene	۱۰۵۶	۱/۴۹
Menthone	۷۰۹	۱/۰۸
Carvone	۷۸۹	۷۱/۴۱
Menthol	۷۱۱	۰/۹۶
Dihydrocarvylacetate	۹۰۱	۰/۴۹
Trans-caroveol	۷۷۰	۰/۳۱
Alpha-amorphene	۱۰۶۲	۰/۱۹
Dihydrocarvone	۷۵۱	۰/۴۳
Gamma-amorphene	۱۰۵۱	۰/۲۳
dihydrocarveol	۷۳۳	۰/۲۱
Total		۹۴/۲۱

نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر متقابل طول دوره رسیدن و غلظت های اسانس بر روی تعداد باکتری /شیریشیا کولای *O157:H7* معنی دار می باشد ( $P<0/05$ ). در جدول شماره دو اثر ضد میکروبی

جدول ۳- مقایسه میانگین (Mean±SD) لگاریتم تعداد/شیریشیا کولای O157:H7 با دز تلقیحی CFU/mL<sup>۵</sup> در پنیرهای سنتی لبقوان حاوی مقادیر مختلف اسانس نعناع در زمان های مختلف دوره رسیدن

غلظت اسانس	تعداد تکرار	دوره رسیدن (روز)		
		صفر	۳۰	۶۰
صفر	۳	۶/۶۹±۰/۰۱ <sup>a</sup>	۶/۳۷±۰/۳۰ <sup>a</sup>	۵/۲۳±۰/۳۰ <sup>a</sup>
۱۰۰	۳	۶/۷۴±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۶/۲۰±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۴/۷۴±۰/۱۲ <sup>b</sup>
۲۰۰	۳	۶/۷۰±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۶/۱۰±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۴/۳۷±۰/۳۵ <sup>b</sup>

a, b: در هر ستون میانگین هایی که فاقد حروف مشترک می باشند، تفاوت معنی داری با هم دارند (P<0/05).

## بحث

مطابق جدول یک، نتایج حاصل از آنالیز اسانس نعناع نشان می دهد که کارون، لیمونن و  $\beta$  بوربونن به ترتیب با ۷۱/۴۱، ۱۳/۲ و ۱/۷۳ درصد بیشترین ترکیبات شیمیایی این اسانس را به خود اختصاص داده اند. ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع به بیش از ۲۰ نوع می رسد که مهمترین آن ها منتول (Menthol) می باشد. بیشترین مقدار منتول در اسانس استخراج شده از برگ های جوان وجود دارد. اسانس گل ها مقدار کمی منتول دارد و مهمترین ترکیب آن را منتوفوران (Menthofuran) تشکیل می دهد. از مواد دیگر اسانس نعناع می توان از منتون (Menthone)، پیپریتون (Pepperitone)، پولگون (Pulegone) (بیشتر در برگ های جوان)، لیمونن، پینن (Pinene)، سابینن (Sabinene)، کارون، سینئول (Cineol) و منتیل استات (Menthyl acetate) نام برد. البته در گونه های مختلف ترکیب اجزاء اسانس متفاوت است و روش خشک کردن نیز بر درصد اجزاء اسانس موثر است (امید بیگی، ۱۳۹۲؛ Asekkun et al., 2007).

با توجه به نگرانی مصرف کنندگان و متولیان بهداشتی در مورد استفاده از نگهدارنده های شیمیایی و مضرات آن ها، در سال های اخیر تولیدکنندگان مواد غذایی به استفاده از نگهدارنده های طبیعی در مواد غذایی توجه ویژه ای پیدا نموده اند. لذا بررسی های مختلفی در ارتباط با اثر اسانس ها و عصاره های گیاهی مختلف بر روی پاتوژن های مختلف غذایی در محیط کشت و غذا انجام

گرفته است (عباسی فر، ۱۳۸۶). نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس گیاه نعناع، تعداد باکتری های/شیریشیا کولای O157:H7 را در گروه های تیمار نسبت به گروه های شاهد به طور معنی داری کاهش داده است (P<0/05). تاثیر عصاره گیاهان بر/شیریشیا کولای را به افزایش ویژگی آب گریزی ترکیبات سطحی سلول های باکتری نسبت می دهند زیرا به این ترتیب از اتصال باکتری به سلول های میزبان جلوگیری می شود (Turi et al., 1997).

مطابق جداول دو و سه، اسانس نعناع در دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm در نودمین روز دوره رسیدن باعث کاهش میانگین لگاریتم تعداد/شیریشیا کولای O157:H7 در پنیر سنتی لبقوان می شود. اثرات ضد میکروبی نعناع روی برخی از عوامل عفونی باکتریایی، ویروسی و قارچی مورد بررسی محققان قرار گرفته است. نیریز نقدهی و همکاران (۱۳۸۸)، خواص ضد باکتریایی اسانس نعناع و پونه کوهی را بر روی باسیلوس سرئوس و/شیریشیا کولای O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی به روش حداقل غلظت مهارکنندگی بررسی کردند و نشان دادند که اسانس نعناع، به صورت کامل می تواند رشد این دو عامل بیماریزا را مهار کند (نیریز نقدهی و همکاران، ۱۳۸۸). پادمینی و همکاران (۲۰۱۰)، با بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره نعناع به روش آگار ژل دیفیوژن، اثر چشمگیر نعناع را بر ضد باکتری های سالمونلا تایفی و پseudomonas آئروژینوزا گزارش کردند (Padmini et al., 2010). از مجموع مطالعاتی که در

آرئوس مشاهده شد، در حالیکه اسانس نعناع قوی ترین مهار کننده ضد میکروبی بود و موجب کاهش معنی داری در شمارش جمعیت باکتریایی، باکتری‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک در مقایسه با گروه کنترل شد، که از نظر اثر ضد میکروبی اسانس نعناع با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد (Foda et al., 2009).

تأثیر ضد میکروبی نعناع، ترخون، زیره، پونه و آویشن بر باکتری /شیریشیا کولای در پنیر سفید ایرانی را کریم و بنیادیان (۱۳۸۳) مورد بررسی قرار دادند که نتایج این مطالعه نشانگر بالاترین اثر ضد میکروبی تلقیح شده در پنیر در روغن فرار گیاه آویشن بود، روغن های فرار گیاهان نعناع، زیره و پونه اثر تقریباً یکسانی بر باکتری تلقیح شده نشان دادند و کمترین اثر را روغن فرار گیاه ترخون نسبت به سایرین از خود نشان داد (کریم و بنیادیان، ۱۳۸۳). در بررسی دیگری سلیم (۲۰۱۱) تأثیر اسانس گیاه نعناع با غلظت های ۰/۱، ۰/۵، و ۱ درصد علیه /شیریشیا کولای O157:H7 مورد مطالعه قرار داد که باکتری مورد نظر با غلظت (۱۰<sup>۳</sup>CFU/g) در پنیر سفید نرم (فتا) تلقیح شده و در دمای هفت درجه سانتی گراد به مدت ۱۴ روز نگهداری گردید که اسانس نعناع با غلظت های فوق الذکر تأثیری بر روی /شیریشیا کولای O157:H7 نشان نداد (Selim, 2011). بنیادیان و کریم (۱۳۸۴)، تأثیر اسانس های فرار برخی گیاهان (پونه، نعناع، ترخان، زیره و آویشن) را بر روی باکتری- های /شیریشیا کولای و /استافیلوکوکوس آرئوس، در محیط کشت مایع مطالعه کردند. نتایج این مطالعه نشانگر این بود که بیشترین تأثیر را روغن فرار آویشن بر روی این دو باکتری داراست و کمترین اثر در ارتباط با گیاه ترخان مشاهده شد و اسانس های فرار گیاهان نعناع، پونه و زیره تأثیر متوسطی بر روی باکتری های مورد مطالعه از خود نشان دادند (بنیادیان و کریم، ۱۳۸۴).

ارتباط با اثرهای ضد باکتری نعناع صورت گرفته است، می توان استنباط نمود که ترکیب هایی چون کارون، لیمونن و پولگون، در این گیاه دارای اثر مشخص ضد باکتریایی هستند (Agrawal et al., 2002; Naigre et al., 1996). فلامین و همکاران (1999) نیز، اثر ضد باکتریایی لیمونن، منتول، پولگون و منتون بر باکتری- های چون سالمونلا و لیستریا را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که پولگون دارای بیشترین اثر روی سالمونلاست (Flamin et al., 1999). به طور کلی اثرات ضد باکتریایی عصاره و اسانس نعناع بر میکروارگانیسم های مختلف به غلظت نعناع، ترکیب ماده غذایی، درجه حرارت نگهداری ماده غذایی و سرشت و طبیعت ارگانیسم بستگی دارد (Imai et al., 2001). متابولیت های فنلی موجود در گیاهانی چون نعناع توانایی این را دارند که یک هیدروژن از گروه هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک خود رها کرده و باعث اکسیداسیون رادیکال های آزاد چربی-ها و دیگر بیومولکول های غشاء سلولی و تخریب آن شوند و به این صورت خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد- التهابی خود را اعمال می کنند (Strycharz, and Shetty, 2002). با توجه اینکه ترکیباتی مثل کارون، لیمونن، منتون و منتول مطابق جدول یک در آنالیز اسانس نعناع مورد مطالعه وجود دارد، لذا اثر ضد باکتریایی اسانس نعناع می تواند در ارتباط با این ترکیبات باشد.

در مطالعه ای فودا و همکاران (۲۰۰۹)، تأثیر نعناع را به صورت عصاره آبی، عصاره الکلی و اسانس بر علیه دوازده جنس از باکتری ها از جمله /شیریشیا کولای، کپک ها و مخمرها در پنیر سفید مورد بررسی قرار دادند، که عصاره آبی نعناع بر روی هیچ یک از جنس های مورد مطالعه، اثر مهاری نشان نداد. به وسیله عصاره الکلی نعناع اثر ملایمی بر علیه باکتری های گرم مثبت مثل باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس

۲. بنياديان، مجتبی و کریم، گیتی. (۱۳۸۴). تأثیر روغنهای فرار گیاهی بر روی جمعیت فارچی پنیر سفید صنعتی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۲، شماره ۳، صفحه ۸-۱.

۳. پورعلی بهزاد، محمد و میرزایی، حمید. (۱۳۹۰). مطالعه میزان آلودگی پنیرهای سنتی عرضه شده در بازار تبریز به کلیفرم ها و اشریشیا کولای بیماریزا. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره ۳، پیاپی ۳، صفحه ۸۰-۷۱.

۴. زرگری، علی. (۱۳۷۹). گیاهان دارویی. جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحه ۱۵۴-۱.

۵. صادقی، احسان، آخوندزاده بستی، افشین، میثاقی، علی، زهرایی صالحی، تقی و بهلولی اسکویی، سمیه. (۱۳۸۹). ارزیابی آثار اسانس زیره سبز و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر رشد استافیلوکوک اورئوس در پنیر سفید ایرانی. فصلنامه گیاهان دارویی، سال نهم، دوره ۹، شماره ۳۴، صفحه ۱۴۱-۱۳۱.

۶. عباسی فر، آرش، آخوندزاده بستی، افشین، کریم، گیتی، میثاقی، علی، بکایی، سعید، گندمی، حسن، جلی جوان، اشکان، حامدی، حسن و ساری، عباسعلی. (۱۳۸۶). ارزیابی اثر آویشن شیرازی بر رفتار استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر فتا. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۲۵، صفحه ۱۱۵-۱۰۵.

۷. کریم، گیتی و بنياديان، مجتبی. (۱۳۸۳). مطالعه تأثیر ضد میکروبی روغن های فرار برخی گیاهان بر باکتری E.coli در پنیر سفید ایرانی. مجله علوم و صنایع غذایی، شماره ۱، صفحه ۲۸-۲۱.

۸. محمدی، خسرو، کریم، گیتی، حنیفیان، شهرام، تاری نژاد، علی رضا و قاسم نژاد، رضا. (۱۳۹۰). مطالعه تأثیر اسانس گیاه آویشن شیرازی بر باکتری 7 *Escherichia coli* O157:H در پنیر سفید آب نمکی طی فرآیند تولید و نگهداری. مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۱، شماره ۲، صفحه ۷۸-۶۹.

همانطوری که در جداول دو و سه مشاهده می شود میزان کاهش تعداد باکتری/اشریشیا کولای O157:H7 در ابتدای دوره رسیدن کم بوده و هرچه به انتهای دوره رسیدن نزدیک می شود افزایش می یابد و این درحالی است که با عنایت به فرار بودن اسانس ها انتظار می رود که مقدار اسانس در طول دوره رسیدن کاهش یابد. به نظر می رسد افزایش شیب کاهش باکتری/اشریشیا کولای O157:H7 در انتهای دوره رسیدن مربوط به اثر ترکیبی و هم افزایی عوامل مختلف مثل افزایش pH (میرزایی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰؛ Mirzaei et al., 2008)، افزایش غلظت نمک (میرزایی و علیقلی نژاد، ۱۳۹۰)، تجمع و انباشته شدن متابولیت ها و باکتریوسین های ضد میکروبی مختلف تولید شده توسط فلور میکروبی طبیعی موجود در طول دوره رسیدن پنیر (Mirzaei, 2011) و حضور اسانس نعناع باشد. مثلا با افزایش غلظت نمک خاصیت آب گریزی غشای خارجی باکتری افزایش و حلالیت پروتئین های آن کاهش می یابد که این امر نفوذ اسانس نعناع به داخل غشای باکتری را افزایش می دهد (Rivas et al., 2010؛ Ultee and Smid, 2001).

### نتیجه گیری کلی

در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که اسانس گیاه نعناع دارای اثر مهاری و کشندگی بر باکتری اشریشیا کولای O157:H7 در پنیر سنتی ليقوان می باشند که با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm، بدون اثرات نامطلوب روی ویژگی های حسی می تواند به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در پنیرهای سنتی ليقوان مورد استفاده قرار گیرند.

### منابع

۱. امید بیگی، رضا. (۱۳۹۲). تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد دوم، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، صفحه ۱۸۷-۱۷۰.



- microbiological examination of foods. 4<sup>th</sup> edition, American Public Health Association, Washington, DC, pp. 331-341.
16. Flamin, G., Cioni, P.L., Pleio, R., Morlli, I. and Panizzi, L. 1999. Antimicrobial activity of essential oil of *Calamintha nepta* and its constituent pulegon against bacteria and fungi. *Phytotherapy Res.* 13: 349-351.
17. Foda, M.I., El-Sayed, M.A., El-Moghazy, M.M., Hassan, A.A. and Rasmy, N.M. 2009. Antimicrobial activity of dried spearmint and its extracts for use as white cheese preservatives. *Alex. J Food Sci & Technol.* 6: 39-48.
18. Imai, H., Osawa, K., Yasuda, H., Hamashima, H., Arai, T. and Sasatsu, M. 2001. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth on pathogenic bacteria. *Microbios J.* 106: 31-39.
19. Jay, J.M., Loessner M.J. and Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7<sup>th</sup> edition, Springer, USA, pp. 637-657.
20. Mirzaei, H. 2011. Microbiological changes in lighvan cheese throughout its manufacture and ripening. *African J Microbiol Res.* 5: 1609-1614.
21. Mirzaei, H., Ghiasi, A. and Karim, G. 2008. The microbiological and chemical quality of traditional Lighvan cheese (white cheese in brine) produced in Tabriz, Iran. *J animal vet advan.* 7: 1594-1599.
22. Naigre, R., Kalck, P., Paques, C., Roux, I. nad Michel, G. 1996. Comparison of the antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *J Plant Med.* 62: 275-277.
23. Padmini, E., Valarmathi, A. and Usha, R.M. 2010. Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of *Mentha spicata* and *Camellia sinensis*. *Asian J Exp Biol Sci.* 1: 772-81.
24. Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S. and Duffy, G. 2010. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model
۹. مشتاقی، حمداله و بنیادیان، مجتبی. (۱۳۸۷). اثرات ضد لیستریایی عصاره روغنی نعناع (*Mentha spicata* L.) در یک مدل غذایی. فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۴، شماره ۳، صفحه ۳۲۶-۳۳۲.
۱۰. میرزائی، حمید و علیقلی نژاد، علی. (۱۳۹۰). مطالعه تغییرات ویژگیهای شیمیایی پنیر ليقوان در طول مراحل تولید و دوره رسیدن. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ۲، صفحه ۱۱۶۸-۱۱۶۱.
۱۱. نیریز نقدهی، مسلم، رضوی روحانی، سید مهدی، کریم، گیتی، رضویلر، ودود، زینالی، امیر و دلشاد، رضا. (۱۳۸۸). مطالعه اثرات توأم مونولورین و اسانسهای پونه (*Mentha pulegium* L.) و نعناع (*Mentha spicata* L.) روی باسیلوس سرئوس و اشیریشیاکولا O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی. مجله آسیب شناسی درمانگاهی دامپزشکی، دوره ۳، ۴(۱۲)، صفحه ۶۶۶-۶۵۷.
12. Agrawal, k.k., Khanjua, S.P.S., Ateeque, A., Santha Kumar, T.R., Gupta, V.K. and Kumar, S. 2002. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Athum sowa*. *Flavour and Fragrance J.* 17: 59-63.
13. Asekkun, O.T., Grierson, D.S. and Afolaya, A.J. 2007. Effect of drying methods on the quality and quality of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chem.* 10: 995-998.
14. Crim, S.M., Iwamoto, M., Huang, J.Y., Griffin, P.M. and Gilliss, D. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food-foodborne diseases active surveillance network, 10U.S. Sites, 2006-2013. *Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC)*. 63(15): 328-332.
15. Downes, F.P. and Itō, K. 2001. *Compendium of methods for the*

response to polymeric dye R-478 and *Agrobacterium rhizogenes*. *Process Biochem.* 37: 805-812.

28. Turi, M., Koljalgs, S. and Milelsaar, M. 1997. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *E. coli* strains of different origin. *APMIS*, 105:956-962.

29. Ultee, A. and Smid, E.J. 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol.* 3:373-378.

broth and rumen systems by carvacrol and thymol. *Int J Food Microbiol.* 139: 70-78.

25. Selim, S. 2011. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and *Escherichia Coli* O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Braz J Microbiol.* 42: 187-196.

26. . Sheeladevi, A. and Ramanathan, N. 2012. Antibacterial activity of plant essential oils against food borne bacteria. *Int J Pharma & Biol Arch.* 3: 1106-1109.

27. Strycharz, S. and Shetty, K. 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of *Mentha pulegium* in

## Effect of essential oil of *Mentha spicata* on the survival of the *Escherichia coli O157:H7* during ripening of traditional Lighvan cheese

Bafandeh Zنده M<sup>1</sup>, Razavilar V<sup>1\*</sup>, Mirzaei H<sup>2</sup>, Mohammadi Kh<sup>2</sup>

1. Department of Food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author: V.razavi@ut.ac.ir

Received: 27 August 2019

Accepted: 26 November 2019

### Abstract

Vegetable essential oils and their components have anti-bacterial known effects. The aim of this study was to evaluate different concentrations of essential oils of *Mentha spicata* on the survival rate of *Escherichia coli O157: H7* in traditional Lighvan cheese during ripening. Essential oils were extracted using the Kelevenger apparatus, and they were analyzed by GC/MS. To determine the necessary oil concentration in terms of the organoleptic, sensory evaluation was conducted by a test panel. Cheese samples prepared with the help of local manufacturers based in the village of Lighvan in triplicates, including zero and 100 and 200 ppm from essential oils of *Mentha spicata* and doses of  $10^3$  and  $10^5$  CFU/mL from the *E. coli O157: H7* bacterium. The numbers of the *E. coli O157: H7* bacteria were analyzed during the days 0, 30, 60, and 90 of the ripening period. *Mentha spicata* essential oils had considerable antimicrobial effects against *E. coli O157: H7*. Using the vital oils caused a decrease in the numbers of *E. coli O157: H7* bacteria in the 90th days of ripening ( $P < 0.05$ ). Using from *Mentha spicata* at a concentration of 200 ppm can reduce the survival of *E. coli O157: H7* in Lighvan cheese. Therefore, it can be argued that the studied essential oil can be used as a natural preservative traditional Lighvan cheese but should be used in concentrations such that do not have any adverse effects on the flavor of food.

**Keywords:** *Mentha spicata* essential oil, *E. coli O157: H7*, Traditional Lighvan cheese.