Archive of SID

بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضدمیکروبی روغن فرار گیاه رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوزیم، علیه لیستریا مونوسیتوژنز

دکتر سید سیاوش ساعی دهکردی*
دکتر حسین تاجیک**
دکتر مهران مرادی***
دکتر افشین جعفری دهکردی****
سارا قاسمی*****

* دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، استادیار دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام
** دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشیار دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
*** دانشجوی دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی
**** دکترای بیماری‌های داخلی دام‌ها، استادیار دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی
***** کارشناس ارشد علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، انستیتو تغذیه و علوم غذایی

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۷/۵
تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۸/۲۵

مؤلف مسؤول: سید سیاوش ساعی دهکردی
پست الکترونیک: smazdak@yahoo.com

چکیده:

مقدمه و هدف: رزماری از خانواده نعناع و لیزوزیم به عنوان عامل ضد باکتری طبیعی در میکروب‌شناسی غذا مورد توجه می‌باشند. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات و بررسی اثرات ضدلیستریایی روغن فرار رزماری به تنهایی و به صورت ترکیب بالیزوزیم جهت ارتقای اثرات ضدلیستریایی دو ماده مذکور و استفاده از نتایج حاصل از این بررسی به منظور تعمیم در مدل‌های غذایی و تبدیل این روش‌های آزمایشگاهی به روش کاربردی در خط تولید مواد غذایی در آینده صورت پذیرفت.

مواد وروش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه ارومیه انجام شد. پس از شناسایی گیاه رزماری، روغن فرار به روش تقطیر با آب استخراج و ترکیبات آن با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی شناسایی گردید. فعالیت ضد باکتریایی روغن فرار علیه لیستریا مونوسیتوژنز به تنهایی و به صورت ترکیبی با لیزوزیم در pH های ۵، ۶ و۷ به روش رقت‌سازی میکروبراث بر اساس تعیین حداقل غلظت بازدارنده در سه بار، تکرار و محاسبه میانگین ارزیابی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ۹۸/۰۵ درصد ترکیبات روغن رزماری شناسایی گردید. ترکیبات اصلی شامل؛ آلفا- پینن، ۱ و ۸- سینئول، وربنون، کامفر، بورنئول، ۳ــ اکتانون، کامفن و لینالول بود. ممانعت از رشد روغن رزماری علیه باکتری در pH=۵ بارزتر و حداقل غلظت ممانعت کننده برابر با ۲۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت ممانعت کننده در pH=۵ برابر ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و درpH=۷ ممانعتی دیده نشد. لیزوزیم تیمار شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در pH مذکور، حداقل غلظت بازدارنده را به ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تقلیل داد.

نتیجه‌گیری: روغن رزماری با ترکیب شیمیایی شناخته شده به تنهایی و به طور ترکیبی با لیزوزیم معمولی و تیمار شده علیه لیستریا مونوسیتوژنز ممانعت کننده می‌باشد. ترکیب لیزوزیم و به خصوص لیزوزیم تیمارشده با روغن رزماری، اثر ضد لیستریایی را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: روغن فرار رزماری، لیزوزیم ، لیستریا مونوسیتوژنز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باتوجه به این که هنوزهم بیماری‌های دارای خاستگاه غذایی در برخی از کشورهای در حال توسعه به عنوان یک موضوع نگران کننده مطرح هستند و با در نظر گرفتن اقبال جهانی به استفاده از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی مطمئن‌تر در مقایسه با نگهدارنده‌های شیمیایی، تمرکز به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی که عموماً به عنوان سالم و بی‌خطر[1] شناخته می شوند، ضروری به نظر می‌رسد(۱).

روغن‌های فرار(اسانس) موادی با ویژگی‌های ضد اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضدویروسی و دافع حشرات و آفات محسوب می‌گردند(۲).

گیاه رزماری از خانواده نعناع، گیاهی متراکم، همیشه سبز و سخت، پایا و آروماتیک، دارای ۹۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر ارتفاع و برگ‌های کوچک نوک تیز (۴-۲ سانتی‌متر)، چسبناک و پرزدار است. کلمه رزماری از واژه لاتین رزمارینوسبه به معنی ژاله دریا[2] مشتق شده است. هم‌چنین از آن به عنوان آنتوس[3] نیز یاد می‌شود که در یونان باستان به معنی گل برتر بوده است و خاطر بخور خوشبوی آن تحت عنوان لیبانوتیس[4] نیز نامیده شده است. رزماری را می‌توان به صورت یک محصول مزرعه‌ای تولید کرد. گیاه در خاک‌های با زهکشی مناسب با pH حدود ۶/۵ تا ۷ و تحت شرایط آب و هوای گرم و آفتابی رشد می‌کند(۳). گیاه به آب و هوای دارای ابرناکی بالا و یخبندان حساس است و واریته‌های مقاوم به یخبندان آن وجود ندارد(۴). روغن فرار رزماری معمولاً از طریق تقطیر با آب[5] یا با بخار[6] حاصل می‌گردد، هر چند استخراج با حلال فوق بحرانی[7] با استفاده از دی‌اکسیدکربن هم در عمل دارای کاربرد است(۶ و ۵).

روغن فرار رزماری را می‌توان به عنوان تثبیت‌کننده چربی‌ها، روغن‌ها و غذاهای حاوی چربی و کره در برابر اکسیداسیون و تند شدگی و در گوشت‌های تخمیری به کار گرفت (۹ــ ۷). فعالیت ضدمیکروبی روغن فرار رزماری علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها مثل؛ استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای و پسودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است (۱۰).

لیزوزیم به عنوان یک آنزیم توانایی لیز نمودن سلول‌های باکتریایی را داراست(۱۱) و به طور کلی باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه لیپوپروتئین- لیپوپلی‌ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی آنها در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری در برابر آن دارند(۱۳و۱۲). لیزوزیم در محصولات غذایی ویژه مانند پنیرهای سخت برای ممانعت از تورم دیررس و به عنوان نگهدارنده در محصولات دریایی، سبزیجات،

1-Generally Recognized as Safe
2-Sea dew
3-Antos
4-Libanotis
5-Hydrodistilation
6-Steam Distillation
7-Super Critical Solvent Extraction

www.SID.ir

Archive of SID

میوه‌جات و نیز به عنوان جزیی از اجزای تشکیل دهنده محصولات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۴) .

هدف از مطالعه حاضر شناسایی ترکیبات موجود در روغن فرار گیاه رزماری و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر روی لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان یکی از خطرناک‌ترین باکتری‌ها با خاستگاه غذایی بود. در این مطالعه روغن فرار گیاه به تنهایی و در ترکیب با آنزیم لیزوزیم به عنوان یک نگهدارنده غذایی دارای خاستگاه طبیعی، تحت شرایط گوناگون pH، جهت یافتن یک ترکیب ضد باکتریایی مؤثر از دو ماده یاد شده و جایگزینی ترکیب مذکور به جای تیمارهای تخریب‌گر حرارتی و نگهدارنده‌های زیان‌آور شیمیایی در غذا مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه ارومیه انجام شد. گیاه رزماری از بازار گیاهان دارویی شهرکرد تهیه و در هر باریوم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی وبا نام علمی رزمارینوس افیکینالیس[۱] تأیید گردید.

قسمت‌های هوایی خشک شده گیاه آسیاب گردید و به منظور استخراج روغن فرار گیاه از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استفاده گردید. روغن فرار حاصل بی‌رنگ یا با رنگ بسیار ملایم با بوی منحصر به فرد گیاه بود. پس از استخراج اسانس از سولفات سدیم بدون آب برای آب‌گیری آن استفاده شد و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری گردید.

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی[۲] استفاده گردید. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات با استفاده از برنامه کتابخانه نرم‌افزاری وایلی[۳] دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی صورت پذیرفت(۱۵).

از روغن فرار به دست آمده از گیاه رزماری غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. به منظور افزایش حلالیت و پخش یکنواخت ذرات روغن فرار در محیط کشت براث، از دی‌متیل‌سولفوکساید[۴] با غلظت حجمی ۵ درصد به عنوان کمک حلال استفاده گردید(۱۶) .

برای تهیه محلول لیزوزیم ابتدا محلولی از فسفات پتاسیم ۶۶ میلی‌مولار با pH برابر۶/۲۴ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. برای تنظیم pH از محلول هیدروکسید پتاسیم استفاده شد. سپس غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میکروگرم پودر لیزوزیم به ازای میلی‌لیتر در حجم نهایی هر چاهک(۱۸۰میکرولیتر) تهیه گردیدند. لازم به ذکر است که پس از تهیه پنج محلول ذخیره با غلظت‌های

1-Rosmarinus Officinalis L
2-Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)
3-WILEY
4-DMSO

www.SID.ir

Archive of SID

فوق‌الذکر، هر یک به وسیله میکروفیلترهای ۰/۲۲میکرومتری پالوده و استریل شدند.

برای تهیه لیزوزیم تیمار شده به وسیله حرارت از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده به داخل لوله‌های درب‌دار اضافه گردید. سپس هر یک از لوله‌های مذکور در حمام آب گرم در دماهای ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سپری شدن این زمان بلافاصله در کنار یخ سرد و به منظور جدا ساختن مواد نامحلول تجمع یافته حاصل از حرارت دادن، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. محلول‌های رویی[1] جداسازی شدند و به وسیله لوله دیالیز در یک ارتباط دو طرفه با آب دیونیزه، دیالیز و سپس به وسیله لیوفیلایزر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به صورت پودر لیوفیلیزه درآمد و غلظت‌های مربوطه با حل نمودن مجدد پودر مذکور در محلول فسفات پتاسیم ۶۶ میلی مولار با pH برابر ۶/۲۴ تهیه و دوباره به وسیله میکروفیلترهای۰/۲۲ میکرومتری، استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و یک کلونی از باکتری مزبور در ۱۰سی‌سی محیط آب‌گوشت مقوی قلب و مغز تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. دانسیته نوری با استفاده از طیف‌سنج در طول موج ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از رقیق‌سازی کشت ۲۰ ساعته در عدد ۰/۱۵ (تعداد تقریبی 10^6 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) تنظیم و در مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

برای تعیین حداقل غلظت‌های ممانعت‌کننده[2] و کشنده[3] از روش رقت‌سازی میکروبراث استفاده گردید(۱۷). برای انجام آزمایش از میکروتیترپلیت‌های کشت بافتی استریل ۹۶ چاهکی استفاده گردید. بدین ترتیب در هر سری تست، حجم نهایی هر چاهک پس از تهیه رقت‌های دو برابر از ماده ضد باکتری روغن فرار رزماری یا لیزوزیم(معمولی و حرارت دیده) معادل ۱۸۰ میکرولیتر شامل؛ محیط آب‌گوشت مقوی قلب و مغز به اضافه ماده ضد باکتری بود که پس از آن باکتری مورد نظر با دوز تقریبی 10^6 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه می‌گردید. در مورد حالت ترکیبی پس از تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده محلول ضدباکتری لیزوزیم (معمولی و حرارت دیده) و محلول ضدباکتری رزماری در مرحله قبل و به طور جداگانه، هر دو غلظت مربوط به حداقل غلظت‌های ممانعت کننده محاسبه شده، به نسبت مساوی در داخل یک چاهک واحد تهیه و ترکیب شده و سپس رقت‌سازی دو برابر انجام گرفت تا پس از گرمخانه گذاری حداقل غلظت‌های ممانعت کننده حالت ترکیبی حاصل گردد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه ترموشیکرمیکروپلیت گرمخانه‌گذاری گردید و پس از

1-Supernatants
2-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
3-Minimum Bactericidal Concentration(MBC)

www.SID.ir

Archive of SID

آن حداقل غلظت ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود (در مقایسه با کنترل) به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده و چاهک ما قبل آن به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید. برای تأیید نتایج مشاهده شده ۵۰ میکرولیتراز هر چاهک شفاف بر روی محیط جامد مغذی قلب و مغز اضافه و نتایج بر اساس شمارش کلنی تأیید گردید. آزمایش‌های مربوط به هر مرحله سه مرتبه تکرار شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [1] و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه[2] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در نتیجه آنالیز ترکیبات روغن فرار رزماری مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ۹۸/۰۵ درصد ترکیبات شناسایی شدند. در بین ترکیبات تشکیل دهنده روغن فرار رزماری، بیشترین مقدار مربوط به آلفا-پینن(۱۴/۰۶ درصد)، ۱ و ۸ - سینئول(۱۳/۶۲ درصد)، وربنون(۱۱/۲ درصد)، کامفر(۱۰/۵۱ درصد)، بورنئول(۷/۳ درصد)، ۳- اکتانون (۷/۲ درصد)، کامفن(۵/۴۶ درصد) و لینالول(۵/۰۷ درصد) بود. از این میان بیشترین درصد ترکیبات مربوط به دسته مونوترپن‌های اکسیژنه(۳۰/۱۲ درصد) و هیدروکربن‌های مونوترپنی(۲۸/۴۲ درصد) بود و سایر ترکیبات از لحاظ درصدی درمقادیر کمتری موجود بودند.

کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده و حداقل غلظت کشنده روغن فرار رزماری علیه لیستریامونوسیتوژنز به ترتیب ۲۲۵ و ۴۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در pH=۵ حاصل گردید و به موازات افزایش pH ممانعت کنندگی کاهش یافت. کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده لیزوزیم معمولی علیه لیستریامونوسیتوژنز، ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر درpH=۵ حاصل شد، ولی در pH=۷ ممانعتی مشاهده نگردید(جدول ۱). کمترین مقادیر مربوط به حداقل غلظت ممانعت کنندگی لیزوزیم تیمار شده با حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب معادل ۱۲۸۰و ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید.

در مرحله بعد به منظور یافتن بهترین pH برای عملکرد ضدمیکروبی لیزوزیم تیمار شده با حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، آزمایش در pH های ۵ و ۶ انجام شد که کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده ، ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، درتیمار ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۵ حاصل گردید (جدول۲). مرحله آخر اثرات ترکیبی روغن فرار رزماری با لیزوزیم معمولی و تیمار شده با حرارت بررسی و بیشترین کاهش در مقادیر مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده دروضعیت حاصل از

1-Statistical Package for Social Sciences
2-One way ANOVA with Dunnett's post test

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیب لیزوزیم تیمار شده در ۸۰ درجه سانتی‌گراد با روغن فرار رزماری در pH=۵ علیه لیستریا مونوسیتوژنز به دست آمد(جدول۳).

بحث و نتیجه گیری

ترکیب عوامل ضدمیکروبی به منظور توانمندتر ساختن آنها و کاهش دوز ممانعت کننده فرم ترکیبی در مقایسه با اثر هر یک ازآنها به صورت مجزا علیه میکروارگانیسم‌ها، مصداقی از اصل هاردل[1] یا اصل ایجاد موانع رشد و تکثیر باکتری می‌باشد. بنابراین هنوز هم به روش‌های جدید برای کاهش یا حذف باکتری‌های بیماری‌زا با خاستگاه غذایی و تا حد امکان ترکیب روش‌های جدید با روش‌های موجود نیاز است(۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضد میکروبی روغن فرار گیاهی رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوریم علیه لیستریامونوسیتوژنز بود.

جدول۱: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) روغن فرار رزماری و لیزوزیم معمولی علیه باکتری لیستریامونوسیتوژنز درpH مختلف

pH	تیمار	رزماری	لیزوزیم معمولی	
	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده
۵	۲۲۵	٤۵۰	٦٤۰	۱۲۸۰
٦	۳۰۰	٦۰۰	۱۲۸۰	>۱۲۸۰
۷	>٦۰۰	*	>۱۲۸۰	*

* اندازه گیری نشد

جدول ۲: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) لیزوزیم تیمار شده در حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در pH مختلف

pH	تیمار	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۸۰ درجه سانتی‌گراد	
	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده
۵	٦٤۰	۱۲۸۰	۱٦۰	۳۲۰
٦	۱۲۸۰	>۱۲۸۰	۳۲۰	٦٤۰

جدول۴: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) روغن فرار رزماری و لیزوزیم معمولی و تیمارشده در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در ترکیب با یکدیگر علیه باکتری لیستریامونوسیتوژنز در pH=۵

متغیر	تیمار	ترکیب رزماری و لیزوزیم معمولی	ترکیب رزماری و لیزوزیم حرارت دیده	
	لیزوزیم	رزماری	لیزوزیم حرارت دیده	رزماری
ممانعت کننده	۸۰	۱۵۰	۲۰	۵۰
کشنده	۱٦۰	۳۰۰	٤۰	۱۰۰

1-Hurdle Technology

www.SID.ir

Archive of SID

در بررسی اخیر۹۸/۰۵ درصد ترکیبات روغن فرار رزماری شناسایی گردید که تفاوت‌هایی هم از لحاظ نوع ترکیبات و هم از نظر درصد آنها، با سایر بررسی‌های انجام شده دارد و این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از مکان جمع‌آوری گیاه و فاکتورهای دیگر از قبیل فنولوژی و قسمت مورد استفاده گیاه باشد (۱۸ و ۳).

بر اساس گزارش پاراکاسا رائو و همکاران[1] (۱۹۹۹)، ترکیب ابتدایی حاصل از تقطیر به طور عمده شامل؛ آلفا- توجن، آلفا- پینن، بتا- پینن و ۱ و۸ - سینئول می‌باشد، هرچند کامفر و بورنیل استات در مراحل پایانی تقطیر حاصل می‌گردند و ترکیب شیمیایی روغن فرار رزماری شامل؛ ۸ و۱- سینئول (۳۰ تا۴۰ درصد)، کامفر (۱۵ تا ۲۵ درصد)، بورنئول (۱۶ تا ۲۰ درصد)، بورنیل استات (حداکثرتا ۷ درصد)، آلفا- پینن (۲۵ درصد) و سایر ترکیبات مثل؛ کامفن، میرسن، آلفا- فلاندرن، آلفا- ترپینن، پارا- سیمن، ترپینن -۴- ال، کاریوفیلن و تیمول می‌باشند(۱۹) .

پینتوره و همکاران[2](۲۰۰۲)، ۵۸ ترکیب حاصل از روغن فرار رزماری مربوط به مناطق ساردینیا و کورسیکا در ایتالیا را بر اساس نتایج گاز کروماتوگرافی شاخص بازداری[3] گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای کربن[4] گزارش نمودند(۱۰). در مطالعه‌ای بر روی روغن فرار رزماری مراکشی نه تنها وجود سه تیپ شیمیایی[5] گوناگون رزماری بلکه وجود ۹۱ ترکیب شناسایی شده بر اساس مطالعه‌های گازکروماتوگرافی و گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی گزارش گردید(۲۰).

در مطالعه حاضر، اثر ضدمیکروبی روغن رزماری بیانگر اثر مهاری قابل قبول بر روی لیستریامونوسیتوژنز است و همان طور که نتایج نشان می‌دهد با کاهش pH اثر مذکور به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بر اساس گزارش رضوی‌روحانی و گریفیت[6](۱۹۹۶)، کاهش pH موجب ممانعت برخی از باکتری‌های گرم مثبت به وسیله لیزوزیم می‌گردد(۲۱)، به عنوان مثال در تحقیقی با کاهش pH به ۵/۵، ممانعت از رشد لیستریامونوسیتوژنز بهبود یافته است(۲۲). واسرشتی حرارتی[7] می‌تواند سبب تقویت اثر ضدباکتریایی لیزوزیم گردد. ابراهیم و همکاران(۱۹۹۶) بر مؤثر بودن فرم دیمری حاصل از دیمریزاسیون لیزوزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۲ علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اشاره نموده‌اند (۲۳). هر چند واسرشتی حرارتی موجب اختلال در فعالیت آنزیمی لیزوزیم می‌گردد، ولیکن فعالیت ضدمیکروبی باقی مانده و عملکرد مربوط به از هم گسیختگی غشا[8] به وسیله لیزوزیم واسرشت شده

1-Prakasa Ruo et al
2-Pintore et al
3-Gas chromatography retention index
4-Carbon nuclear magnetic resonance
5-Chemotype
6-Razavi-Rohani & Griffths
7-Heat-Denaturation
8-Membrane-disrupting activity

www.SID.ir

Archive of SID

با حرارت، سلول‌های باکتریایی و قارچی را متأثر می‌نماید و به نظر می‌رسد ناحیه سی ــ ترمینال آمفیفاتیک[1] در اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی آن دخیل باشد(۲۴) .

در تحقیق حاضر لیزوزیم به عنوان یک ماده ضدباکتری طبیعی به شکل معمولی و تیمار شده با حرارت علیه باکتری مورد آزمایش به کار گرفته شد و نتایج نشان داد با کاهش pH به ۵ و نیز تیمار حرارتی خصوصاً ۸۰ درجه سانتی‌گراد اثر مهاری قوی‌تری بروز می‌دهد.

روی آوردن به مواد خارق‌العاده موجود در طبیعت و پیروی از ایده مصرف‌گرایی سبز[2] و البته تمهید شرایطی برای به‌کارگیری کمترین میزان مواد آنتی‌باکتریال با بیشترین اثر (به دلیل عوارض احتمالی ناشی ازدوزهای بالا شامل؛ تحریک پوستی، مشکلات احتمالی در زنان آبستن و شیرده یا افراد مبتلا به فشارخون بالا و بی‌خوابی ناشی از ترکیبات رزماری و جایگزین نمودن حالات ترکیبی از مواد ضد میکروب دارای خاستگاه طبیعی مانند لیزوزیم و رزماری به جای نگهدارنده‌های غذایی بسیار زیان‌بار شیمیایی یا فرآوری‌های تخریب‌گر حرارتی برای افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی امری بدیهی و ضروری به نظر می‌رسد(۳). البته لازم به ذکر است به دلیل وجود محدودیت‌های ارگانولپتیک و هم‌چنین فرار بودن اسانس‌های گیاهی، کاهش دوز مورد نیاز با ایجاد فرمول‌های ترکیبی از چند ماده ضدمیکروبی طبیعی و استفاده از فیلم‌های حاوی این مواد ضد میکروبی که آزادسازی تدریجی مواد یاد شده به سمت ماده غذایی را باعث می‌شوند، محدودیت‌های کاربردی این گونه مواد را به حداقل می رساند. در مجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که روغن فرار رزماری ترکیبی مؤثر علیه لیستریا مونوسیتوژنز بوده و استفاده همزمان به صورت ترکیب با لیزوزیم هم از دوز تیمار لیزوزیم به تنهایی، می‌کاهد و هم یک فرمول ترکیبی جدید با تأثیر ضدلیستریایی قابل توجه را ایجاد می‌نماید. هم‌چنین به کارگیری روغن فرار رزماری و لیزوزیم تیمار شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در pH ۵ از بالاترین اثر ضد لیستریایی برخوردار می‌باشد.

تقدیر و تشکر

هزینه انجام این طرح از محل اعتبار پژوهانه ریاست دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تأمین گردیده است. لازم است مراتب سپاس‌گزاری خود را از راهنمایی‌های دکتر سیدمهدی رضوی روحانی استاد میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه ارومیه ابراز نماییم.

1-Amphiphatic C-terminal Domain
2-Natural Green Image

www.SID.ir

Archive of SID

Chemical Composition and Antibacterial Effects of Rosmarinus Officinalis L Essential Oil with Lysozyme on Listeria monocytogenes

Saei Dehkordi SS[*], Tajik H[**], Moradi M[***], Jafari Dehkordi A[****], Ghasemi S[*****].

*Assistant Professor of Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
**Associate Professor of Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
***PhD Student Majoring Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
****Assistant Professor of Animal Internal Medicine, Department of Clinical Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
***** MSc Majoring Food Science, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Shaheed Beheshti Medical University, Tehran, Iran.

Received:27/09/2009
Accepted:16/11/2009

Corresponding Author: Saei Dehkordi SS
Email: **smazdak@yahoo.com**

ABSTRACT:

Introduction & Objective: *Rosmarinus officinali*s L. as a member of the Lamiaceae family and lysozyme as a natural antibacterial agent is important in food microbiology, because of its characteristics**.** The aim of the present study was to determine the chemical composition and anti-listerial activity of *Rosmarinus officinali*s essential oil (REO) alone and in combination with lysozyme for enhancement of anti-listerial activity of both substances.

Materials & Methods: *Rosmarinus officinali*s L. was purchased from a local grocery store at Shahrekord and was identified by the Institute of Medicinal Plants, ACECR. The air-dried aerial parts were subjected to hydrodistillation using a Clevenger apparatus to obtain essential oil and yielded oil was analyzed by GC/MS. Antibacterial activity (on basis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of REO was studied separately and in combination with unheated lysozyme (L) and heat-treated lysozyme (HTL) on *Listeria monocytogenes* at different pH (5, 6 and 7) by a micro-broth dilution assay. The collected data were analyzed by SPSS software.

Results: In the current study, 98.05% of constituents of the essential oil were identified. The major components were α-pinene (14.06%), 1,8-cineole (13.62%), verbenone (11.2%), camphor (10.51%), borneol (7.3%), 3-octanone (7.02%), camphene (5.46%) and linalool (5.07%). The inhibitory action of REO was stronger at lower pH especially 5 (MIC=225 µg/mL). Inhibition by L at pH 5 was 640 µg/mL but no inhibition was seen at pH 7. HTL resulted in more effective inhibition than L, especially at pH 5 and heat-treatment 80˚C (MIC: 160 µg/mL).

Conclusion: Combination of L + REO and particularly HTL + REO was led to enhancement of bacterial inhibition. It was concluded that REO by the identified chemical composition was effective alone or in combination with L or HTL on *Listeria monocytogenes* as a food-borne pathogen.

Keywords: Rosmarinus officinalis essential oil, Lysozyme, Listeria Monocytogenes

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES:

1.Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. Food Control 2007; 18: 646 - 9.

2.Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 2003; 10: 813- 29.

3.Peter KV. Handbook of Herbs and Spices. 2nd ed. CRC Press LLC: USA; 2004; 360.

4.Domokos J, Hethely E, Palinkas J, Szirmai S, Tulok MH. Essential oil of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) of Hungarian origin. Journal of Essential Oil Research 1997; 9: 41–5.

5.Bicchi C, Binello A, Rubiolo P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (R. officinalis L.) with different methods of extraction and analysis. Phytochemical Analysis 2000; 11: 236–42.

6.Coehlo LAF, Oliveira JV, Pinto JC. Modelling and simulation of supercritical fluid extraction of rosemary essential oil. Ciencia e Technologia de Alimentos 1997; 17: 446–8.

7.Pokorny J, Rebolva Z, Janitz W. Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils. Czech Journal of Food Sciences 1998; 16: 227–34.

8.Zegarska Z, Amarowicz R, Karamac M, Rafalowski R. Antioxidative effect of rosemary ethanolic extract on butter. Milchwissenschaft 1996; 51: 195–8.

9.Korimova L, Mate D, Turek P. The evaluation of raw fermented meat products stabilized with vitamin E and rosemary. Folio Veterinaria 1998; 42: 178–81.

10.Pintore G, Usai M, Bradesi P, Julino C, Boatto Tomi F, Chessa M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of R. officinalis L. oils from Sardinia and Corsica. Flavour and Fragrance Journal 2002; 17: 15–9.

11.Scaman C, Nakai S, Aminlari M. Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cystein on the level of maillard-based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan and mannan. Food Chemistry 2006; 99: 368-80.

12.Nattress FM, Baker LP. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. International Journal of Food Microbiology 2003; 85: 259-67.

13.Vannini L, Lanciotti R, Guerzoni ME. Interaction between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. International Journal of Food Microbiology 2004; 94: 123-35.

14.Nakimbugwe D, Masschalck B, Anim G, Michiels CW. Inactivation of gram-negative bacteria in milk and bannana juice by hen egg white and lambada lysozyme under high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology 2006; 112: 19-25.

15.Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured: Carol Stream IL; USA ; 1989; 469.

16.Basti AA, Misaghi A, Khaschabi D. Growth responses and modeling of Zataria multiflora Boiss. Essential oil, pH and temperature on Salmonella yphimurium and Staphylococcus aureus. LWT-Food Science and Technology 2007; 40: 973-81.

17.Davidson PM, Sophos JN, Branen IL. Antimicrobials in food. 3rd ed. CRC Press: New York; 2005; 706.

18.Porte A, Godot RLDE, Lopes D, Koketso M, Goncalves SL, Torquilho HS. Essential oil of Rosmarinus officinalis (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Essential Oil Research 2000; 12: 577–80.

19.Prakasa Rao EVS, Gopinatj CT, Ganesha RAO RS, Ramesh S. Agronomic and distillation studies on rosemary (Rosmarinus officinalis L.) in a semi arid tropical environment. Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants 1999; 6: 25–30.

20.Elamrani A, Zrira S, Benjilali B, Berrada M. A study of Moroccan rosemary oils. Journal of Essential Oil Research 2000; 12: 487–95.

www.SID.ir

Archive of SID

21.Razavi-Rohani SM, Griffiths MW. The effect of lysozyme and butylated hydroxyanizole on spoilage and pathogenic bacteria associated with food. Journal of Food Safety 1996; 16: 59-74.
22.Johansen C, Gram L, Meyer AS. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection 1994; 57: 561-6.
23.Ibrahim HR, Higashiguchi S, Juneja LR, Kim M, Yamamoto TA. phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1996; 44:1416-23.
24.Düring K, Mahn P, Brinkmann, O, Ggieffers W. The non enzymatic microbicidal activity of lysozymes. Federation of European Biochemical Societies Letters FEBS Letters 1999; 449: 93-100.

www.SID.ir