

شناسایی ترکیبات اسانس انیسون (*Pimpinella anisum L.*) و بررسی اثر آن بر روی برخی از پاتوژن های غذایی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلاهی O157:H7 و سالمونلا تیفی موریوم، در شرایط آزمایشگاهی

بهرام فتحی آچالوئی^۱، نیما بابلانی مقدم^۲، یونس زاهدی^۳

۱- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
پست الکترونیکی: b_fathi@uma.ac.ir ، bahram1356@yahoo.com

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: امروزه استفاده از اسانس ها در نگهداری مواد غذایی، نه تنها به عنوان مواد ضد میکروبی طبیعی بلکه به عنوان جایگزینی مناسب برای نگهدارنده های سنتتیک و مضر، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. این تحقیق با هدف استخراج و شناسایی ترکیبات اسانس انیسون و نیز تعیین خصوصیات ضد میکروبی اسانس انیسون بر روی چهار پاتوژن غذایی گرم منفی و گرم مثبت، انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه پس از استخراج اسانس انیسون توسط دستگاه کلونجر با روش تقطیر با بخار آب، به منظور شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده از دستگاه GC/MS استفاده شد. همچنین میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) با استفاده از محیط کشت BHI به روش میکرودايلوشن در پلیت های ۹۶ خانه ای، بر روی میکروارگانیسم های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلاهی O157:H7 و سالمونلا تیفی موریوم، تعیین گردید.

یافته ها: در بین ترکیبات شناسایی شده اسانس، trans-anethole (۸۷/۴۷٪)، gamma-himachalene (۶/۴۶٪) و meta-anisaldehyde (۲/۴۸٪)، ترکیبات اصلی اسانس انیسون بودند. همچنین میزان MIC برای باکتری های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلاهی O157:H7 به ترتیب برابر با ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۲ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر حداقل میزان غلظت بازدارنده رشد بودند.

نتیجه گیری: ترکیب اصلی فرار موجود در اسانس انیسون trans-anethole (۸۷/۴۷٪) بود. اسانس انیسون با دارا بودن قدرت ضد میکروبی مناسب می تواند با کنترل رشد پاتوژن های غذایی باعث افزایش ایمنی مواد غذایی گردد.

واژگان کلیدی: اسانس انیسون، شناسایی ترکیبات اسانس، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، پاتوژن مواد غذایی

• مقدمه

باکتری ها اثر می کنند و این مسئله در درمان عفونت های ناشی از سویه های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است و در نگهداری مواد غذایی نیز به جای استفاده از آنتی بیوتیک ها مهم می باشد (۴). اسانس ها ترکیبات روغنی گیاهی هستند که از بخش های مختلف گیاهان مثل شاخه، گل، غنچه، برگ، جوانه، پوست، ریشه، میوه به وسیله روش های مختلفی از قبیل استفاده از بخار آب داغ، استخراج شده و مخلوط ترکیبات شیمیایی آلی فرار می باشند. این مایعات

امروزه بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به پاتوژن های غذایی یک مسئله مهم در صنعت غذا به شمار می رود. تأثیر عمل ضد میکروبی اسانس های گیاهان دارویی در مدل های غذایی و همچنین در داخل مواد غذایی توسط بسیاری از محققین در گذشته مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است (۱-۳).

با توجه به اینکه ترکیبات ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان با مکانیسم های متفاوت از آنتی بیوتیک ها بر

anisaldehyde و γ -himachalene بیشترین میزان را در بین ترکیبات اسانس موجود داشتند که احتمالاً دلیل خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این اسانس مربوط به این ترکیبات باشد. همچنین در صنعت غذایی دانه های انیسون به عنوان عوامل طعم دهنده و معطر بکار گرفته شده است. همچنین نتایج تحقیقات محدودی در مورد خاصیت ضد میکروبی اسانس انیسون بویژه در نگهداری برگر مرغ گزارش شده است (۱۴).

با وجود این که استفاده از اسانس های گیاهی در داخل مواد غذایی به عنوان یک ماده ایمن (Generally Recognized As Safe) شناخته شده است (۱۵، ۵)، ولی با این حال استفاده از این اسانس ها اغلب به دلیل ایجاد برخی تأثیرات نامطلوب حسی محدود شده است (۱۶). بنابراین، نیاز به فهم دقیق از حداقل میزان غلظت بازدارنده رشد (MIC) (Minimum Inhibitory Concentrations) اسانس ها که توسط اکثر محققان به عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها بیان شده و نشانگر حداقل غلظتی است که موجب بازداشتن و یا کاهش قابلیت زنده ماندن میکروب های تلقیح شده می شود، به منظور استفاده از غلظت مؤثر این اسانس ها و بررسی عدم تاثیر نامطلوب روی خصوصیات حسی ناشی از آنها در غلظت های موثر، از آزمایش های برون تنی (*in vitro*) استفاده می نمایند (۱۷، ۵). در این مطالعه، اسانس دانه انیسون با هدف استخراج به وسیله دستگاه کلونجر (Clevenger)، شناسایی ترکیبات اسانس انیسون و نیز تعیین خصوصیات ضد میکروبی، حداقل غلظت بازدارنده رشد این اسانس بر روی باکتری های پاتوژن غذایی با روش میکروداپلوشن بررسی گردید.

• مواد و روش ها

تهیه دانه گیاه انیسون و اسانس گیری: دانه گیاه انیسون در اواخر فصل بهار از اطراف شهرستان بندرعباس (استان هرمزگان) تهیه و پس از شناسایی و تأیید توسط متخصصین دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران به مدت دو روز در دمای اتاق و در سایه، خشک گردید. اسانس گیری توسط دستگاه کلونجر، با روش تقطیر با بخار آب، انجام گرفت (۱۳). اسانس به دست آمده بعد از آگیری توسط سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و سپس آگیری توسط اضافه کردن مقداری سدیم سولفات بدون آب و سانتریفیوژ مجدد در همان شرایط، قابل استفاده گردید (۱۸).

شناسایی ترکیبات اسانس: به منظور شناسایی ترکیبات اسانس، حجم ۱ میکرو لیتر از اسانس انیسون استخراج شده به

روغنی بودار به علت تبخیر در مجاورت هوا در دمای طبیعی محیط روغن های فرار یا روغن اسانسی نامیده می شوند (۵). به طور کلی مکانیسم های مختلف از اثر اسانس ها بر روی سلول های باکتریایی گزارش شده است، اختلال در ساختمان دیواره سلولی و آسیب رساندن به غشای سیتوپلاسمی و میتوکندریایی (۶)، آسیب رساندن به پروتئین های غشا و اتصال به RNA و DNA (۷)، همین طور ایجاد انعقاد در سیتوپلاسم، خروج محتویات سلولی به خارج و اختلال در سیستم تبادل پروتون (هیدروژن) (۸)، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی و انعقاد محتویات سلولی می باشد. به طور کلی هرچه مقادیر مواد فنولی که مسئول خواص ضد باکتریایی اسانس ها می باشند، بالاتر باشد، خواص ضد باکتریایی آن ها علیه میکروارگانیسم ها بیشتر خواهد شد (۹).

گیاه انیسون بانام علمی *Pimpinella anisum L.* از خانواده *Umbelliferae* می باشد. انیسون گیاهی است علفی، یک ساله، با گل های سفید که بخش عمده مورداستفاده دانه های آن است که سبزرنگ، گلابی شکل و کوچک می باشد که در ترکیه، ایران، هند، مصر و همچنین کشورهای اروپایی مانند اسپانیا، ایتالیا و آلمان و همچنین آمریکای جنوبی رشد می کند (۱۰، ۳). محققین گزارش نموده اند ترکیبات اصلی اسانس این گیاه شامل *anethole* به عنوان عامل فعال اصلی و همچنین دارای ترکیبات *eugenol*، *methylchavicol*، *anisaldehyde* و *estragole* می باشد (۱۱). همچنین گزارش شده است، بوی اصلی این گیاه که از چندین کشور اروپایی جمع آوری شده بود، ناشی از ترکیب *trans-anethole* موجود در اسانس آن می باشد که معمولاً حدود ۷۵ الی ۹۵ درصد ترکیبات اسانس را شامل می گردد. همچنین سایر ترکیبات نظیر γ -himachalene، *trans-pseudoisoeugenyl-2-methylbutyrate* و *p-anisaldehyde* در ترکیبات اسانس روغنی این گیاه با حداکثر بازده روغنی ۵/۴ درصد، یافت شد (۱۲). گزارش های متنوعی در رابطه با قدرت ضد میکروبی این اسانس علیه باکتری های پاتوژن و عامل فساد وجود دارد. محققین گزارش نمودند این اسانس دارای خواص ضد میکروبی علیه برخی میکروارگانیسم ها نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کاندیدا آلبیکانس*، *استرپتوکوکوس پیوستنس*، *اتروکوکوس فکالیس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *سالمونلا تیفی* می باشد (۱۳، ۱۰). با توجه به شناسایی میزان ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس انیسون استخراج شده مشخص شده است که میزان *trans-anethole*، *meta-*

به پلیت‌های BHI آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند و پس از این مدت، تعداد باکتری شمارش شد و از این طریق تعداد باکتری در کووت حاوی سوسپانسیون باکتری با جذب نوری معادل $(OD_{600}=0.1)$ محاسبه گردید. پس از تعیین غلظت هر کدام از باکتری‌ها در سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۱، با استفاده از لوله‌های حاوی مقادیر مشخصی از آب پپتونه ۰/۱ درصد، غلظت هر کدام از باکتری‌ها در میزان 1×10^7 CFU/ml استاندارد شد (۲۱).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکروداپلوشن: غلظت‌های متوالی اسانس (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، ۰/۱) الی ۰/۴ درصد) در محیط آبگوشت قلب و مغز حاوی ۵ درصد DMSO تهیه گردید. در این روش از پلیت‌های ۹۶ خانه با چاهک ته گرد و با حجم ۳۰۰ میکرولیتر (ساخت شرکت اکستراژن آمریکا) استفاده شد و حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) طبق روش Radaelli و همکاران (۲۰۱۶) انجام گرفت (۲۲). لازم به ذکر است کل آزمایش تعیین MIC سه بار تکرار شده است و همچنین خانه‌های کنترل منفی (محیط کشت استریل حاوی اسانس و DMSO) و کنترل مثبت (خانه‌های حاوی 0.1 mg/ml کلرامفنیکل) و همچنین جهت کنترل آسپتیک بودن روش کار، خانه‌های حاوی محیط کشت استریل همراه با DMSO نیز وجود داشت (۲۲). تمامی نتایج به صورت میانگین و نتایج شمارش میکروبی به صورت $\log \text{ CFU/ml}$ بیان گردید.

• یافته‌ها

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه انیسون: بعد از شناسایی ترکیبات اسانس، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی، ۷ نوع ترکیب ارگانیک مختلف در آن شناسایی گردید که در مجموع ۹۸/۶۴ درصد کل آن را تشکیل می‌داد. در بین ترکیبات شناسایی شده، trans-anethole (۸۷/۴۷٪)، gamma-himachalene (۶/۴۶٪) و meta-anisaldehyde (۲/۴۸٪)، ترکیبات اصلی اسانس انیسون بودند. ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس انیسون، در جدول ۱ مشاهده می‌گردد. همچنین کروماتوگرام GC ترکیبات اسانس انیسون در شکل ۱ آورده شده است.

دستگاه GC/MS تزریق شد. مدل دستگاه GC، Hewlett Packard (HP) 6890، درجه حرارت محل تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس، نوع ستون استفاده شده HP-1MS (60 m*۰/۲۵ mm) گاز حامل شامل هلیوم با سرعت جریان گازی ۱ میلی لیتر در دقیقه و برنامه دمایی آن دستگاه GC از ۶۰ درجه سلسیوس شروع و با نرخ ۷ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۲۳۰ درجه سلسیوس رسیده و ۳ دقیقه در این دما نگه داشته شد و همچنین طیف سنج جرمی مدل HP-5973 با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت به کارگرفته شد. اندازه گیری و شناسایی ترکیبات اسانس توسط دستگاه GC/MS طبق روش ذکر شده Adams (۲۰۰۷) انجام گرفت (۱۹).

باکتری‌های مورد مطالعه: در این مطالعه از دو باکتری بیماریزای غذایی (Food Borne) گرم مثبت شامل باسیلوس سرئوس (ATCC:11778) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC:65138) و دو باکتری بیماریزای غذایی گرم منفی شامل اشرشیا کلای O157:H7 (ATCC:25922) و سالمونلا تیفی موریوم (ATCC:14028) استفاده شد. میکروارگانیسم‌های مورد نظر از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهیه گردید.

ابتدا کشت لیوفیلیزه باکتری به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط آبگوشت قلب و مغز کشت داده شد. سپس کشت دومی از کشت اول داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط گردید و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتری در لوله‌های اپندورف استریل در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۲۰).

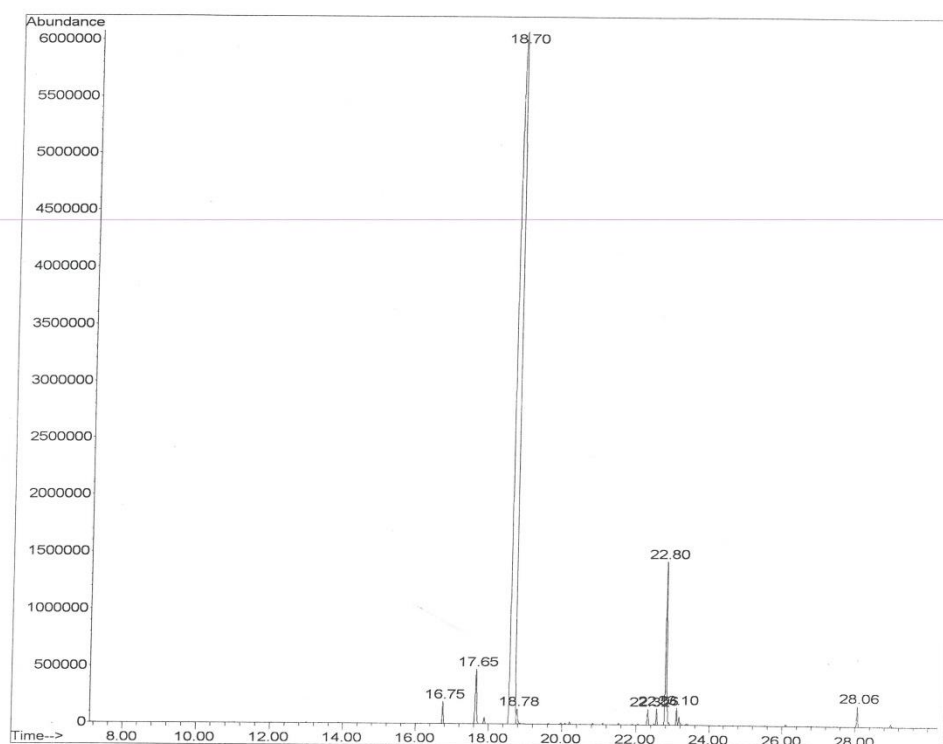
طراحی آزمایش: غلظت‌های متوالی اسانس انیسون (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۷، ۰/۰۸، ۰/۰۹، الی ۰/۴ درصد) در محیط کشت آزمایشگاهی جهت تعیین MIC به روش میکروداپلوشن بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه تهیه شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری: جهت تهیه میزان تلقیح باکتری، از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله‌ی کووتی که حاوی ۴ میلی لیتر آبگوشت قلب و مغز است، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا ۶- تهیه گردید. از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت

جدول ۱. شناسایی میزان ترکیبات شیمیایی مختلف موجود در اسانس انیسون
(به روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی)

میزان (%)	اندیس بازداری آدامز*	ترکیب
۲/۴۸	۱۱۹۶	meta-anisaldehyde
۸۷/۴۷	۱۲۵۲	trans-anethole
۰/۶۶	۱۲۳۸	trans-ocimene
۰/۵۸	۱۴۷۹	Murolene
۰/۵۰	۱۴۸۰	Curcumene-ar
۶/۴۶	۱۴۸۱	gamma-himachalene
۰/۴۹	۱۵۰۵	beta-biabolene
۹۸/۶۴		مجموع

*در مقایسه با n-آلکانها در ستون DB-1



شکل ۱. کروماتوگرام ترکیبات اسانس انیسون در دستگاه GC

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس: میزان باکتری‌ها در جذب نوری ۰/۱ (OD₆₀₀=۰/۱) و همچنین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس انیسون در جدول ۲ آورده شده است. همانطوری که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، نتایج شمارش باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد تعداد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موربوم و همچنین اشرشیا کلی O157:H7 در طول موج ۶۰۰ نانومتر با جذب نوری ۰/۱، به ترتیب برابر با Log CFU/

۲/۴×۱۰^۷، ۲/۷×۱۰^۷، ۴/۴×۱۰^۷ و ۲/۱×۱۰^۷ و ۱/۴×۱۰^۷ بود. همچنین مشاهده گردید که حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس انیسون برای باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر با ۰/۰۶ و ۰/۰۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. این در حالی بود که غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از اسانس انیسون توانست از رشد باکتری‌های سالمونلا تیفی موربوم و اشرشیا کلی O157:H7 ممانعت کند.

www.SID.ir

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس انیسون

میکروارگانیزم‌ها	اسانس انیسون (درصد وزنی- وزنی)	تعداد باکتری‌ها $OD_{600}=0.1$ (CFU/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۰۶	2.7×10^7
باسیلوس سرئوس	۰/۰۵	4.4×10^7
سالمونلا تیفی موریوم	۰/۲	2.1×10^7
اشرشیا کلی O157:H7	۰/۲۵	1.4×10^7

• بحث

امروزه به دلیل مشخص شدن تأثیر سوء مواد ضد میکروبی معمول در صنعت غذا نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین به دنبال یافتن راه‌های جایگزین مناسبی برای این مواد هستند و بدون شک استفاده از اسانس‌ها که امروزه مورد استقبال بسیاری از محققین این امر قرار گرفته، می‌تواند مانع از افزایش انتقال بیماری‌های ناشی از غذا و کنترل آنها، گردد که به نوبه خود استفاده از این مواد ضد میکروبی طبیعی، باعث کاهش عواقب استفاده از مواد ضد میکروبی شیمیایی و سنتتیک، می‌گردد.

در رابطه با خصوصیات ضد میکروبی اسانس انیسون، در تحقیقات انجام گرفته گزارش‌های محدودی در این رابطه وجود دارد، مثلاً Güllün و همکاران، در مطالعه خود به بررسی اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی بذرهای گیاه انیسون علیه ۱۰ میکروارگانیزم گرم مثبت و گرم منفی از جمله سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی، پروتئوس میرابیلیس، سیتروباکتر، انتروباکتر آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، میکروکوکوس لوتئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و کاندیدا آلبیکانس به روش دیسک دیفوزیون پرداختند. بر اساس نتایج هاله عدم رشد در اطراف میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه در رابطه با اثر عصاره آبی عبارتند از: سودوموناس آئروژینوزا (۰ میلی‌متر)، اشرشیا کلی (۰ میلی‌متر)، پروتئوس میرابیلیس (۹ میلی‌متر)، سیتروباکتر (۷ میلی‌متر)، انتروباکتر آئروژینوزا (۸ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اورئوس (۹ میلی‌متر)، استرپتوکوکوس پنومونیه (۱۱ میلی‌متر)، میکروکوکوس لوتئوس (۹ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس (۸ میلی‌متر) و کاندیدا آلبیکانس (۸ میلی‌متر) و نتایج هاله عدم رشد در اطراف میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه در رابطه با اثر عصاره الکلی عبارتند از: سودوموناس آئروژینوزا (۷ میلی‌متر)، اشرشیا کلی (۷ میلی‌متر)، پروتئوس میرابیلیس (۹ میلی‌متر)، سیتروباکتر (۸ میلی‌متر)، انتروباکتر آئروژینوزا (۸ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اورئوس (۹ میلی‌متر)، استرپتوکوکوس پنومونیه (۸ میلی‌متر)، میکروکوکوس لوتئوس (۱۰ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس (۹ میلی‌متر) و

کاندیدا آلبیکانس (۰ میلی‌متر) (۳). Al-Bayati، اثر ضد میکروبی عصاره متانولی و اسانس بذرهای انیسون را علیه میکروارگانیزم‌های سالمونلا تیفی، سالمونلا تیفی موریوم، پروتئوس میرابیلیس، پروتئوس ولگاریس، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس را با روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) گزارش نموده است و محدوده آبی بین ۱۵/۶-۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای آن مشخص نموده است (۱۰). همچنین Abdel-Reheem، اثر ضد میکروبی اسانس بذرهای گیاه انیسون علیه میکروارگانیزم‌های گرم مثبت و گرم منفی از جمله استافیلوکوکوس اورئوس (۱۵ میلی‌متر)، اشرشیا کلی (۱۵ میلی‌متر)، سودوموناس آئروژینوزا (۱۰ میلی‌متر)، کاندیدا آلبیکانس (۱۰ میلی‌متر)، استرپتوکوکوس پیوژنس (۱۲ میلی‌متر)، انتروکوکوس فکالیس (۱۶ میلی‌متر)، میکروکوکوس لوتئوس (۱۴ میلی‌متر)، سالمونلا تیفی (۱۷ میلی‌متر) به روش دیسک دیفوزیون و میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد ۲-۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده است (۱۳). احتمال می‌رود حضور ترکیبات فنلی موجود در اسانس انیسون به عنوان اصلی‌ترین عامل ضد میکروبی این اسانس باشد که در تمامی مطالعات گذشته، حضور *trans-anethole* به عنوان ترکیب اصلی همراه با سایر ترکیبات جزئی (با ایجاد اثر سینرژیستی و هم‌افزایی با ترکیبات اصلی) تشکیل دهنده اسانس انیسون، به عنوان مسئول اصلی خاصیت ضد میکروبی این اسانس ذکر گردیده است (۱۰، ۵، ۳). همچنین ترکیبات شناسایی شده اسانس انیسون در تحقیقات گذشته به صورت‌های مختلفی گزارش شده است، Orav و همکاران، گزارش نمودند ترکیب اصلی تمامی نمونه‌های مورد مطالعه اسانس گیاه انیسون جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف اروپایی، شامل *trans-anethole* به میزان ۷۵ الی ۹۵ درصد و سایر ترکیبات به صورت *trans-pseudoisoeugenyl 2-himachalene* و *methylbutyrate* و *p-anisaldehyde* (۱۲) و همچنین

همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از قدرت ضد میکروبی اسانس انیسون، مشاهده گردید که اسانس دارای قدرت بازدارندگی رشد بسیار زیادی بر روی باکتری‌های گرم مثبت مورد آزمون (باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) داشته و این اسانس دارای خاصیت بازدارندگی نسبتاً ضعیفی (نیاز به غلظت بالاتری از اسانس جهت جلوگیری از رشد) در برابر باکتری گرم منفی *سالمونلا تیفی* موریوم و *شرشیاکلای O157:H7* دارد. از جمله دلایل این امر می‌توان به تفاوت ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیان نمود. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است، اما دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با وجود ضخامت کم‌تر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد. همچنین دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای غشاء خارجی، است که سطح خارجی دیواره را می‌پوشاند. مجموعه این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌شود (۳۲-۳۴).

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص شد اسانس انیسون دارای خصوصیات ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زای غذایی (Food Borne) است، و با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد و همچنین می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده در مواد غذایی استفاده گردد تا علاوه بر ایجاد عطر و طعم در مواد غذایی از رشد و تکثیر باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی جلوگیری به عمل آورد که در نهایت موجب افزایش ایمنی مواد غذایی می‌گردد.

Ullah و همکاران، *trans-anethole* (۸۲/۱ درصد) و *himachalene* (۷ درصد) را به عنوان ترکیبات اصلی اسانس این گیاه گزارش نمودند (۲۳). Abdel-Reheem ترکیبات اصلی متشکله اسانس انیسون را به صورت زیر گزارش نموده است که ترکیبات اصلی تشکیل دهنده آن شامل موارد زیر می‌باشد: *trans-anethole* (82/1%), *cis-anethole* (8/5%), *estragole* (*methylchavicol*) (5/2%), *linalool* (3/2%), *terpineol* (5/1%), *methyl eugenol* (3/1%) (۱۳). می‌توان گفت اختلافات بسیاری در ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس این گیاه وجود ندارد، ولی به طور کلی وجود اختلافات را می‌توان این گونه مطرح نمود، اختلافاتی که بین بازده و ترکیبات متشکله اسانس‌های حاصله از تحقیقات مختلف و همچنین قدرت ضد میکروبی آنها با نتایج یکدیگر و نتایج این تحقیق وجود دارد که از دلایل آن می‌توان گفت ترکیب اسانس در مناطق مختلف اکولوژیکی یکسان نیست. همچنین مواد تشکیل دهنده اندام‌های یک گیاه در زمان‌های مختلف بسیار متفاوت می‌باشد و باید در زمان مناسب اندامی که دارای بیشترین میزان ماده مؤثره است را جمع‌آوری کرد. از جمله عوامل مهمی که در میزان مواد مؤثره گیاهان نقش دارد و می‌بایستی در هنگام جمع‌آوری گیاهان به ویژه دارویی و معطر مورد توجه قرار گیرند، زمان برداشت مناسب است که می‌توان دلایل ناشی از این اختلافات را وابسته به ژنتیک گیاه، وابسته به نوع کشت و زمان آن، محل و خاک کاشت شده، میزان آبیاری، میزان نور، ارتفاع از سطح دریا و غیره دانست. همچنین می‌تواند ناشی از زمان برداشت، نوع خشک کردن و نحوه انجام عمل اسانس‌گیری نیز باشد (۳۱-۲۴).

• References

- Skandamis PN, Nychas GJ. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology 2000; 66(4),1646-53.
- Koutsoumanis, Tassou, Taoukis, Nychas. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology* 1998; 84(6), 981-7.
- Gülçin I, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu ÖI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 2003; 83(3), 371-82.
- Eloff J.N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999; 67(3):355-360.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94(3), 223-53.
- Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International* 2011; 44(9), 3057-64.
- Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 2012; 17(4), 3989-4006.
- Ultee A, Bennis MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*. American Society for Microbiology (ASM) 2002; 68(4),1561-8.
- Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debever J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei*

- and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 2004; 21(1), 33–42.
10. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 116(3), 403–6.
 11. Ciftci M, Güler T, Dalkiliç B, Nihat Ertas O. The effect of anise oil (*Pimpinella anisum* L.) on broiler performance. *International Journal of Poultry Science* 2005; 4(11), 851–5.
 12. Orav A, Raal A, Arak E. Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. *Natural product research*. 2008; 22(3), 227–32.
 13. Abdel-Reheem MAT, Oraby MM. Anti-microbial, cytotoxicity, and necrotic ripostes of *Pimpinella anisum* essential oil. *Annals of Agricultural Sciences. Faculty of Agriculture, Ain Shams University*; 2015; 60(2), 335–40.
 14. Mahdavi V, Hosseini SE, Sharifan A. Effect of edible chitosan film enriched with anise (*Pimpinella anisum* L.) essential oil on shelf life and quality of the chicken burger. *Food Science and Nutrition*, 2018;6(2):269–279
 15. Ghabraie M, Vu KD, Tata L, Salmieri S, Lacroix M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology* 2016; 66, 332–9.
 16. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91(3), 453–62.
 17. Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer MJ, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of applied microbiology* 1998; 84(3), 368–76.
 18. Khalili G, Mazloomifar A, Larijani K, Tehrani MS, Azar PA. Solvent-free microwave extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. and *Melissa officinalis* L. *Industrial Crops and Products* 2018; 119, 214–7.
 19. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation; 2007.
 20. Moreira MR, Ponce A., del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology* 2005; 38(5), 565–70.
 21. Knezevic P, Aleksic Sabo V, Simin N, Lesjak M, Mimica-Dukic N. A colorimetric broth microdilution method for assessment of *Helicobacter pylori* sensitivity to antimicrobial agents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2018; 152, 271–8.
 22. Radaelli M, da Silva BP, Weidlich L, Hoehne L, Flach A, da Costa LAMA, et al. Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology* 2016; 47(2), 424–30.
 23. Ullah H, Mahmood A, Honermeier B. Essential oil and composition of anise (*Pimpinella anisum* L.) with varying seed rates and row spacing. *Pakistan Journal of Botany* 2014; 46(5), 1859–64.
 24. Hendawy SF, El Gendy AG, Omer EA, Pistelli L, Pistelli L. Growth, Yield and Chemical Composition of Essential Oil of *Mentha piperita* var. *multimentha* Grown Under Different Agro-ecological Locations in Egypt. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2018; 21(1), 23–39.
 25. Dehghani Mashkani MR, Larijani K, Mehrafarin A, Naghdi Badi H. Changes in the essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. under different drying methods. *Industrial Crops and Products* 2018; 112, 389–95.
 26. Abdel-Hameed ESS, Salman MS, Fadl MA, Elkhateeb A, Hassan MM. Chemical Composition and Biological Activity of *Mentha longifolia* L. Essential Oil Growing in Taif, KSA Extracted by Hydrodistillation, Solvent Free Microwave and Microwave Hydrodistillation. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 2018; 21(1), 1–14.
 27. Ali-Shtayah MS, Jamous RM, Abu-Zaitoun SY, Akkawi RJ, Kalbouneh SR, Dudai N, et al. Secondary treated effluent irrigation did not impact chemical composition, and enzyme inhibition activities of essential oils from *Origanum syriacum* var. *syriacum*. *Industrial Crops and Products* 2018; 111, 775–86.
 28. Pavela R, Žabka M, Vrchtová N, Tříška J. Effect of foliar nutrition on the essential oil yield of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Industrial Crops and Products* 2018; 112, 762–5.
 29. Askary M, Behdani MA, Parsa S, Mahmoodi S, Jamialahmadi M. Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products* 2018; 111, 336–44.
 30. Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *Food Chemistry* 2006; 101(3), 995–8.
 31. Naghdi Badi H, Yazdani D, Ali SM, Nazari F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crops and Products* 2004; 19(3), 231–6.
 32. Ouattara B, Simard RE, Holley RA, Piette GJ-P, Bégin A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 1997; 37(2–3), 155–62.
 33. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MRR. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry* 2010; 120(3), 765–70.
 34. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2007; 18(5), 414–20.

Identification of Anise (*Pimpinella anisum L.*) Essential Oil Compounds and Investigation of its Effect on Some Foodborne Pathogens: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157: H7* and *Salmonella typhimurium*

Fathi-Achachlouei B^{*1}, Babolanimogadam N², Zahedi Y³

1- *Corresponding author: Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. Email: bahram1356@yahoo.com, b_fathi@uma.ac.ir

2- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

3- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Received 8 Jul, 2020

Accepted 7 Oct, 2019

Background and Objectives: Nowadays, use of essential oils in food preservation is popular by researchers not only as antimicrobial agents but also as replacements for synthetic harmful preservatives. Objectives of this study were extraction and identification of Anise essential oil (AEO) compounds as well as assessment of the oil antimicrobial properties on four Gram-negative and Gram-positive foodborne pathogens.

Materials & Methods: After extraction of AEO using Clevenger apparatus and water distillation method, GC/MS was used to identify extracted essential oil compounds. Furthermore, the oil minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated for *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157:H7* and *Salmonella typhimurium* using microdilution of BHI media in 96-well plates.

Results: Trans-anethole (87.47%), gamma-himachalene (6.46%) and meta-anisaldehyde (2.48%) were the major components of AEO. Moreover, MIC for *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* and *E. coli O157:H7* included 0.05, 0.06, 0.2 and 0.25 µg/ml, respectively.

Conclusion: In this study, the major volatile component of AEO was trans-anethole (87.47%). The AEO with an appropriate antimicrobial activity can increase food safety by controlling growth of food pathogens.

Keywords: Anise essential oil, Identification of essential oil compounds, Minimum inhibitory concentration (MIC), food pathogen