

بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد لیستریا مونوسیژنوز در روند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی

رزاق محمودی^۱، علی احسانی^{۲*}، حسین تاجیک^۳، افشین آخوندزاده بستی^۴

۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
 ۲- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
 ۳- دانشیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه
 ۴- استاد، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
 *آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، تلفن: ۲۷۷۰۵۰۸ (۰۴۴۱)، نمابر: ۲۷۷۱۹۲۶ (۰۴۴۱)
 پست الکترونیک: a.ehsani@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۹

تاریخ تصویب: ۸۹/۴/۲۸

چکیده

مقدمه: نگهداری مواد غذایی در برگرفته روش‌هایی است که سلامت، بهداشت و ماندگاری بهینه غذا در آن تامین شود، در جهت تحقق این امر استفاده ترکیبی از محافظت‌کننده‌های زیستی، مانند اسانس‌های گیاهی و پروبیوتیک‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

هدف: این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات ضد میکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی علیه لیستریا مونوسیژنوز در پنیر سفید ایرانی طراحی و به اجرا گذارده شده است.

روش بررسی: اسانس گیاه مذکور به روش تقطیر با بخار آب استخراج و ترکیب آن با دستگاه گازکروماتوگرافی طیف سنج جرمی GC/MS تعیین شد. در ادامه رشد باکتری لیستریا مونوسیژنوز تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک (به تنهایی و توأم) در زمان‌های مختلف نگهداری پنیر مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان داد که اسانس پونه کوهی در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توأم با پروبیوتیک از بالاترین تاثیر بر رشد لیستریا مونوسیژنوز برخوردار بوده است. همچنین بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت از رشد لیستریا مونوسیژنوز و تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۰۱۵ درصد در تیمار توأم با پروبیوتیک بود.

نتیجه‌گیری: اثر سینرژیستی بین حالت‌های مختلف اسانس و پروبیوتیک در مقایسه با تیمار کنترل و تیمارهای دارای اسانس و فاقد پروبیوتیک کنترل، معنی‌دار بود که این بیانگر تاثیر مهار اسانس و باکتری پروبیوتیک بر روی لیستریا مونوسیژنوز بوده و در صورت به کارگیری توأم با پروبیوتیک می‌توان از غلظت‌های پایین‌تری از اسانس برای اثر مهار مشهود، استفاده کرد.

کلواژگان: پونه کوهی، لاکتوباسیلوس کازئی، لیستریا مونوسیژنوز، پنیر سفید ایرانی



مقدمه

سلامت غذا یک ضرورت اساسی از دیدگاه مصرف کننده و دست اندرکاران صنعت غذا می باشد، به ویژه آنکه گزارش موارد عفونت های حاصل از غذا رو به گسترش است [۱]. افزایش بیماری های غذایی، همراه با مشکلات اجتماعی و اقتصادی حاصل از آن، سبب انجام تحقیقات گسترده ای برای تولید غذای سالم و توسعه عوامل ضد میکروبی جدید شده است [۲]. لیستریا مونوسیٹوژنز (*Listeria Monocytogenes*) یک باکتری بیماریزای غذایی است که باعث مسمومیت می شود. مسمومیت های حاصل از این باکتری بیشتر در اثر مصرف شیر و فرآورده های آن به ویژه پنیر عارض می شود [۳، ۴]. ویژگی هایی همچون پراکندگی گسترده در محیط، توانایی رشد در دامنه وسیعی از pH، شرایط یخچال و تحمل مقادیر بالای نمک، این باکتری را به عنوان پاتوژن بسیار خطرناک در مواد غذایی مطرح نموده است. توجه به سلامت برخی نگاهدارنده های شیمیایی و عکس العمل منفی مصرف کنندگان به نگاهدارنده های شیمیایی، باعث افزایش تمایل به ترکیبات طبیعی گردیده است. خصوصیات ضد میکروبی اسانس های (Essential Oils) گیاهی علیه طیف وسیعی از میکروب ها، شامل باکتری ها، مخمرها و کپک ها به اثبات رسیده است [۳، ۲]. گیاه پونه کوهی (*Mentha longifolia* L.) از اعضاء خانواده *Laminacea* بوده و به صورت یک گیاه چند ساله می باشد. این جنس شامل بیش از ۲۵ گونه است و به صورت وحشی در مناطق مرطوب نواحی مرکزی و جنوب اروپا، جنوب غربی آسیا و شمال آفریقا می روید. ساقه های این گیاه به صورت چند ساله و بر افراشته بوده، که در مراحل نهایی بلوغ گیاه به طول ۱/۵ متر می رسد. برگ های آن به صورت ساده، و چسبیده (بدون پایه) به ساقه، به طول ۹۹ میلی متر و عرض ۲۲ میلی متر می باشد. همچنین این گیاه واجد گل های کوچک (به طول ۳ میلی متر) به رنگ سفید متمایل به ارغوانی روشن می باشد. از قسمت های مختلف این گیاه در ترکیب ادویه جات تجاری به عنوان طعم دهنده در غذا استفاده می شود. خصوصیات درمانی این گیاه در برطرف کردن اختلالات گوارشی، استفراغ، بی اشتها،

کولیت اولسراتیو و اختلالات کبدی به اثبات رسیده است. همچنین خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی گونه های متعدد این گیاه به خوبی مشخص شده است [۵، ۶]. پروبیوتیک ها، میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر کافی دارای اثرات مفید سلامتی می باشند، باکتری های اسید لاکتیک و بیفیدوباکترها معمول ترین پروبیوتیک هایی هستند که در فرآورده های لبنی مورد استفاده قرار می گیرند [۷]. تاثیرات مطلوب فراوان باکتری های پروبیوتیک در بهبود تعادل میکروفلور دستگاه گوارش، تقویت سیستم دفاعی موکوسی علیه پاتوژن ها، افزایش پاسخ های ایمنی، کاهش کلسترول خون و فعالیت ضد سرطانی و ضد میکروبی شان، سبب افزایش کاربرد آنها در دسته ای از مواد غذایی موسوم به غذاهای عملگر شده و مقبولیت مصرف غذاهای پروبیوتیکی در سراسر جهان را افزایش داده است [۸]. اغلب تحقیقات در زمینه اثر ضد میکروبی اسانس ها در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و بدین ترتیب مطالب کمی پیرامون تاثیر آنها در مدل های غذایی، گزارش شده است [۲]. لزوم به کارگیری غلظت های بالاتر اسانس در غذا در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نشان دهنده پیچیده بودن شرایط رشد در غذا بوده که می تواند اثرات محافظتی روی سلول های میکروبی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی داشته باشد، این امر از یک طرف به دلیل تاثیرات نامطلوب ارگانولپتیکی در غذا و از سوی دیگر به علت اقتصادی نبودن استفاده از یک نگاهدارنده به تنهایی در مقایر زیاد، موجب محدود شدن کاربرد اسانس های گیاهی به تنهایی در مواد غذایی شده است [۹، ۱۰]. با توجه به عدم کفایت باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک علیه باکتری های گرم منفی و مخمرها، موارد استفاده آنها نیز به تنهایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی دارای محدودیت می باشد [۱۱]. استفاده توام از اسانس های گیاهی و پروبیوتیک ها جهت بهبود عملکرد خصوصیات ضد میکروبی آنها پیشنهاد شده است [۱۲]. هدف از این مطالعه بررسی رشد باکتری لیستریا مونوسیٹوژنز در پنیر سفید ایرانی تحت تاثیر غلظت های مختلف اسانس پونه کوهی و باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در طی زمان های مختلف تولید و نگهداری و رسیدن



آماده سازی و محاسبه میزان تلقیح باکتری لیستریا مونوسیژنوز

در این مطالعه باکتری لیستریا مونوسیژنوز ATCC 19118 تهیه شده از بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری مذکور دو مرتبه متوالی در محیط BHI Broth (Brain Heart Infusion Broth) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. سپس جهت تهیه میزان تلقیح باکتری لازم (10^3 CFU/ml)، مقادیر مختلفی از کشت مرحله دوم انتخاب و به کووت های حاوی ۵ میلی لیتر BHI Broth منتقل شده و با استفاده از خواندن جذب نوری کووت های مذکور (در طول موج ۶۰۰ نانومتر) و شمارش باکتریایی به کمک کشت سطحی، کووت حاوی تعداد مناسب باکتری جهت تلقیح به نمونه های شیر مشخص شد [۱۳].

آماده سازی و محاسبه میزان تلقیح باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی

در این مطالعه باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 3939 تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، به عنوان پروبیوتیک استفاده شد. محتویات آمپول لیوفلیزه حاوی باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط استریل به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت مایع MRS منتقل و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس به ارلن حاوی ۹۵ میلی لیتر از محیط کشت فوق منتقل و تحت شرایط ذکر شده در بالا، انکوبه شد. این عمل ۲ تا ۳ بار تکرار شد تا تعداد باکتری ها به مقدار لازم ($10^9 - 10^8$ cfu/ml) برسد. سپس سلول های میکروبی توسط سانتریفوژ یخچال دار با دور ۱۵۰۰ گرم و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برداشت شد. باکتری های برداشت شده دو بار با آب پپتون ۰/۱ درصد استریل شستشو داده شد و جهت تلقیح در شیر مورد استفاده قرار گرفت [۱۴].

مواد و روش ها

طراحی آزمایش

این مطالعه شامل ارزیابی اثر غلظت های مختلف اسانس پونه کوهی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی به تنهایی و در تیمار توأم بر روی باکتری بیماری زای مهم با منشا غذایی، *Listeria monocytogenes* در روند تهیه، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی می باشد.

تهیه اسانس و آنالیز آن

گیاه پونه کوهی پس از جمع آوری توسط گروه گیاه شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی از نظر صحت نام علمی تایید شد. چون اسانس گیاه در مقایسه با پودر و عصاره خاصیت ضد میکروبی بیشتری دارد، اقدام به تهیه اسانس این گیاه به روش تقطیر با بخار آب گردید. آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) انجام شد. دستگاه GC/MS از نوع Agilent 6890 با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS با برنامه دمایی ستون در ابتدا به صورت ۵۰ درجه سانتی گراد با توقف ۵ دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. شناساگر EI با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی گراد بود. پس از تهیه اسانس تا زمان به کارگیری آن، در شیشه های استریل و تیره رنگ در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.



آماده سازی استارتر جهت تلقیح در شیر

در این مطالعه از استارتر پنیر Chr. Hansen R 704 (استارتر مزوفیل شامل لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه کرمورس و لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه دی استیلاکتیس تهیه شده از شرکت کریستین هانس دانمارک) استفاده شد.

تولید پنیر سفید ایرانی

برای تهیه پنیر سفید، شیر تازه و کامل گاو که در دمای ۶۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ درجه پاستوریزه شده بود، استفاده شد. قبل از شروع به انجام مراحل مختلف پنیرسازی، دمای شیر را به ۳۵ درجه سانتی گراد رسانده و در هریک از ظروف استریل مخصوص تهیه پنیر مقدار ۵ لیتر از شیر ریخته شد. سپس باکتری لیستریا مونوسیتوزنز با دوز مورد نظر (10^3 cfu/ml) به نمونه های شیر آماده شده تلقیح شد. پس از آن، استارتر به مقدار ۰/۵ درصد (حجمی/حجمی) و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی به میزان 10^9 - 10^8 cfu/ml همزمان به نمونه های شیر اضافه شدند، و پس از گذشت نیم ساعت مقدار ۰/۰۲ درصد (وزن به حجم) از کلرور کلسیم ($CaCl_2$) اضافه شد. نهایتاً پس از آنکه pH شیر به ۵/۶ رسید، رنت (Rennet) به مقدار ۰/۰۰۱ درصد (وزن به حجم) پس از حل نمودن آن در آب مقطر استریل به شیر افزوده شده و در همین زمان اسانس پونه کوهی نیز در غلظت های (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) اضافه شد. به منظور کارایی بهتر رنت، دمای شیر در مدت زمان تشکیل لخته در حدود ۳۵ درجه سانتی گراد حفظ شد. پس از گذشت مدت زمان یک ساعت، لخته تشکیل شده به قطعات ۱ - ۲ سانتی متر مکعبی برش داده شده و جهت آبگیری به مدت شش ساعت تحت فشار وزنه استریل قرار گرفت. سپس قطعات لخته آبگیری شده در آب نمک ۲۰ درصد (وزن به حجم) استریل به مدت ۸ ساعت قرار گرفت. بعد از آن، نمونه های پنیر ضمن انتقال به آب نمک ۸ درصد استریل، تا ۱۵ روز در دمای ۱۴ - ۱۲ درجه سانتی گراد و پس از طی دوره رسیدن اولیه جهت دوره رسیدن نهایی نمونه ها به مدت ۴۵ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به منظور شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوزنز از محیط آگار انتخابی لیستریا (پالکام) *Listeria* (PALCAM) Selective Agar به روش کشت سطحی (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و نگهداری به مدت ۲۴ الی ۴۸) و در آزمایش های شیمیایی نیز اندازه گیری pH توسط دستگاه pH متر دیجیتال (ساخت کارخانه Metrohm Herisua سوئیس)، در طی مراحل زیر صورت گرفت.

- ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح لیستریا مونوسیتوزنز در شیر)، نمونه برداری از لخته تشکیل شده در ساعت ۱/۵ و ۷، نمونه برداری از پنیر در روزهای ۷، ۱۵ (متعاقب اتمام دوره رسیدن اولیه پنیر در انبار سبز با دمای ۱۶ - ۱۴ درجه سانتی گراد)، ۳۰، ۴۵ و ۶۰.

آماده سازی نمونه های پنیر جهت شمارش باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی

ابتدا یک قطعه پنیر پس از خارج ساختن از آب نمک و خشک شدن نسبی سطح آن با اسکالپل به قطعات کوچک تر تقسیم و به یک فلاسک شیشه ای استریل منتقل شد. سپس تحت شرایط استریل ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر را در کیسه های استریل مخصوص دستگاه استوماکر قرار داده و با افزودن ۹۰ میلی لیتر محلول استریل سترات سدیم و قرار دادن در دستگاه استوماکر (Bag mixer) به مدت دو دقیقه همگن سازی انجام شد. تهیه رقت های سریالی از طریق افزودن یک میلی لیتر از محتویات استریل کیسه های دستگاه استوماکر به لوله های حاوی ۹ میلی لیتر آب پپتونه یک دهم درصد استریل صورت گرفت. جهت شمارش باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی، از روش پورپلیت و با انتقال یک میلی لیتر از رقت های تهیه شده به محیط کشت MRS آگار و گرمخانه گذاری ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد [۱۴].

ارزیابی حسی

برای ارزیابی ویژگی های حسی ناشی از افزودن اسانس پونه کوهی و پروبیوتیک به پنیر سفید ایرانی از تست پذیرش حسی استفاده شد. برای این منظور پنیر سفید آماده شده با



نرم افزار SPSS17 انجام شد. نتایج معنی دار در $p < 0/05$ مدنظر قرار گرفت.

نتایج

نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس پونه کوهی استفاده شده در این مطالعه با استفاده از GC/MS در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. در این میان پولگون (Pulegone) با ۳۱/۵۴ درصد و سینولئون (1,8- Cineole) با ۱۵/۸۹ درصد بیشترین ترکیبات موجود در اسانس بودند. نتایج حاصل از ارزیابی خصوصیات ارگانولپتیکی پنیر در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس در ترکیب با پروبیوتیک بهترین تیمار از لحاظ خصوصیات حسی بود. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH پنیر در مراحل مختلف تهیه و نگهداری آن نشان دهنده فقدان تاثیر اسانس پونه کوهی بود (جدول شماره ۳). به گونه ای که تغییرات pH در طی تولید پنیرها تحت تاثیر غلظت های مختلف اسانس پونه کوهی (صفر، ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) در دوره های زمانی مشابه، اختلاف آماری معنی داری را نشان نداد ($p < 0/05$).

غلظت های مختلف اسانس و پروبیوتیک به هفت قسمت (هر قسمت شامل ۵۰۰ گرم پنیر در ظروف سفید و تمیز) تقسیم شد. ارزیابی حسی به وسیله یک پانل هفت نفره که عمدتاً از کارکنان و اعضای گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه بودند، صورت پذیرفت. بعد از اتمام ارزیابی هر تیمار، و قبل از ارزیابی تیمار جدید جهت شستشوی دهان از آب استفاده شد. اعضای پانل معیار خود از ارزیابی حسی پنیر سفید حاوی اسانس و پروبیوتیک را با استفاده از یک مقیاس حسی ۹ نمره ای (9-point hedonic scale) 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 نهایتاً نمره ۱ فوق العاده بد، لحاظ شد [۱۵].

تحلیل آماری: کلیه آزمایش ها در سه تکرار انجام شد. اثر اسانس به تنهایی و تداخل اسانس با پروبیوتیک بر روی شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز توسط آنالیز واریانس (ANOVA) انجام گرفت. تفاوت در بررسی های ارگانولپتیکی مورد نظر با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و least significant difference procedure (LSD) صورت گرفت، لازم به ذکر است تمام تحلیل های آماری با استفاده از

جدول شماره ۱- نتایج آنالیز اسانس پونه کوهی مورد بررسی با استفاده از GC/MS

ترکیب	شاخص بازداری	درصد
α - Pinene	۹۳۹	۱/۸۶
2- β - Pinene	۹۸۰	۳/۰۷
1,8- Cineole	۱۰۳۱	۱۵/۸۹
P- Mentha- 3,8- Diene	۱۰۶۸	۰/۵۴
Iso pentyl 2- Menthyl Butanoate	۱۰۹۹	۰/۹۱
P- Menth- 3- En- 8- ol	۱۱۴۹	۷
Menthofuran	۱۱۶۳	۱۱/۸
Cis- Iso Pulegone	۱۱۷۵	۹/۷۴
Borneol	۱۱۹۰	۱/۰۱
(Neo- Iso) Dihydrocarveol	۱۲۲۰	۱/۷۸
Pulegone	۱۲۴۵	۳۱/۵۴
2- Cyclohexan- 1- one	۱۳۴۲	۳/۰۸
1- Decene	۱۳۵۰	۱/۵۸
Spathulenol	۱۵۷۵	۰/۵۲
Caryophyllene oxide	۱۵۸۰	۱/۶۰
مجموع		۹۲/۰۲



جدول شماره ۲- میزان میانگین پذیرش حسی پنیر سفید حاوی غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی و پروبیوتیک

EO ($\mu\text{l } 100 \text{ ml}^{-1}$)	Probiotic ($10^6 - 10^9 \text{ cfu/ml}^{-1}$)	Mean rating $\pm$ SD
۰	-	$8/00 \pm 0/00^a$
۵	-	$7/12 \pm 0/14^a$
۱۵	-	$7/68 \pm 0/21^a$
۳۰	-	$7/05 \pm 0/42^b$
۴۵	-	$4/96 \pm 0/33^d$
۶۰	-	$3/02 \pm 0/41^e$
۰	+	$8/25 \pm 0/11^a$
۵	+	$7/29 \pm 0/25^a$
۱۵	+	$7/89 \pm 0/32^c$
۳۰	+	$7/14 \pm 0/42^e$
۴۵	+	$5/23 \pm 0/28^d$
۶۰	+	$3/43 \pm 0/19^e$

(-): فاقد پروبیوتیک، +: واجد پروبیوتیک

جدول شماره ۳- تغییرات میزان pH در طی مراحل مختلف تولید و نگهداری در پنیر سفید ایرانی. A: دارای پروبیوتیک، B: فاقد پروبیوتیک، ۱: بدون اسانس، ۲: غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس، ۳: غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس، ۴: غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس

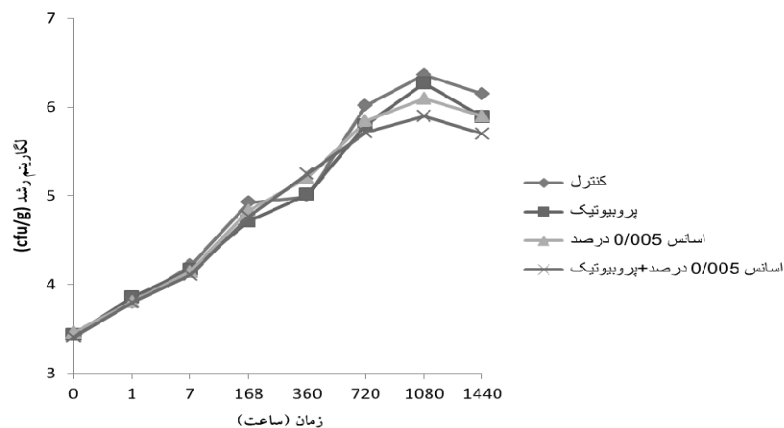
نمونه	ساعت ۰	ساعت ۱	ساعت ۷	ساعت ۱۶۸	ساعت ۳۶۰	ساعت ۷۲۰	ساعت ۱۰۸۰	ساعت ۱۴۴۰
A _۱	۶/۷۷	۶/۶	۵/۵۶	۵/۲۷	۵	۴/۸۵	۴/۸۱	۴/۸۰
A _۲	۶/۷۷	۶/۶۲	۵/۶۱	۵/۲۱	۴/۹۶	۴/۸۳	۴/۸۰	۴/۷۶
A _۳	۶/۷۷	۶/۶۱	۵/۵۶	۵/۱۷	۴/۹۱	۴/۸۰	۴/۷۵	۴/۷۳
A _۴	۶/۷۷	۶/۶۳	۵/۵۵	۵/۱	۴/۹۰	۴/۷۷	۴/۷۱	۴/۶۹
B _۱	۶/۷۷	۶/۵۸	۵/۶۵	۵/۲۸	۴/۹۹	۴/۸۵	۴/۸۹	۴/۸۳
B _۲	۶/۷۷	۶/۶۰	۵/۶۳	۵/۲۰	۴/۹۷	۴/۸۰	۴/۸۳	۴/۸۱
B _۳	۶/۷۷	۶/۵۹	۵/۶۰	۵/۱۹	۴/۹۰	۴/۸۰	۴/۸۰	۴/۷۴
B _۴	۶/۷۷	۶/۶۳	۵/۵۷	۵/۰۸	۴/۸۶	۴/۷۷	۴/۷۴	۴/۷

لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با نمونه کنترل و نمونه‌های دارای اسانس فاقد پروبیوتیک، معنی دار می‌باشد. بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت رشد لیستریا مونوسیژنز و نیز از نظر تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۰۱۵ درصد در تیمار توام با باکتری پروبیوتیک بود. همچنین افزایش غلظت اسانس، بر کاهش لگاریتم تعداد باکتری به طور معنی‌داری موثر بود ($p < 0/05$).

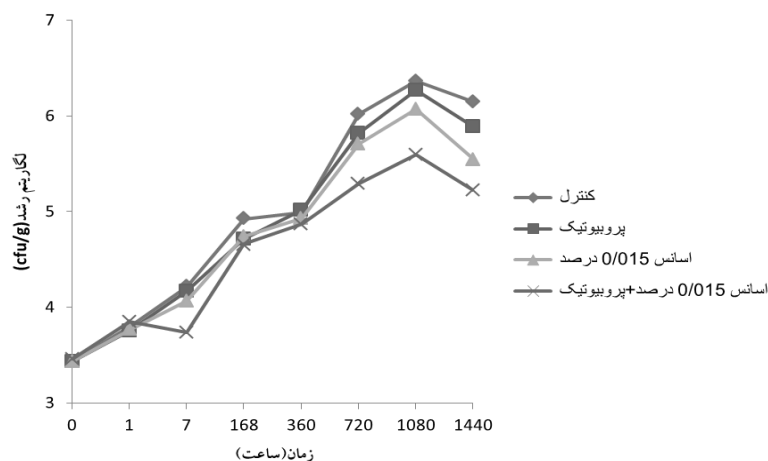
ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی در کلیه تیمارها در پایان مرحله رسیدن پنیر سفید ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمامی موارد شمارش باکتری پروبیوتیک مذکور بیش از 10^6 cfu/g پنیر بود.

نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری لیستریا مونوسیژنز در طی مراحل مختلف تولید و نگهداری پنیر تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در نمودارهای شماره ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر اسانس مذکور در غلظت‌های مختلف و پروبیوتیک هر کدام به تنهایی در ممانعت از رشد این باکتری در مقایسه با تیمار کنترل معنی‌دار بود. نمودارهای شماره ۲ و ۳ نشان داد که اسانس مذکور در دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک از بالاترین تاثیر بر رشد لیستریا مونوسیژنز برخوردار بود، به عبارت دیگر اثر سینرژیستی بین غلظت‌های مختلف اسانس (به ویژه دو غلظت ۰/۰۱۵ و ۰/۰۳ درصد) و باکتری پروبیوتیک

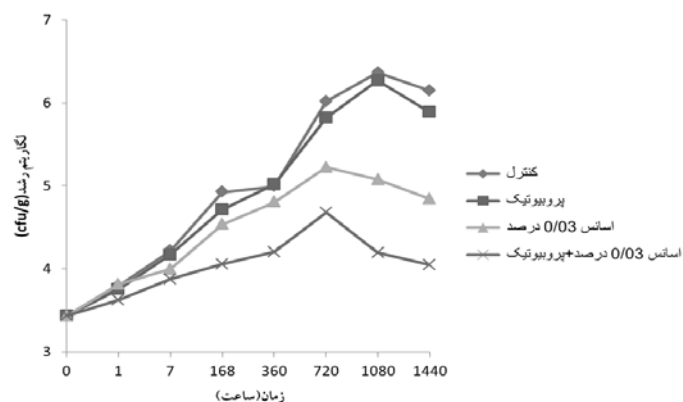




نمودار شماره ۱- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۰۵ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۰۵ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



نمودار شماره ۲- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۱۵ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



نمودار شماره ۳- لگاریتم رشد لیستریا در نمونه‌های کنترل، پروبیوتیک، غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس و پروبیوتیک با اسانس ۰/۰۳ درصد پنیر در طی زمان تولید و نگهداری



بحث

افزایش بیماری‌ها و مسمومیت‌های ناشی از غذا به همراه مشکلات اقتصادی و اجتماعی حاصل از آن سبب گسترش مطالعات در زمینه تولید غذای سالم و به کارگیری ترکیبات ضد میکروبی جدید شده است [۲]. اسانس‌های حاصل از گیاهان و باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک (به ویژه گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها) واجد اثرات ضد میکروبی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند در جهت کنترل و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد منتقله از مواد غذایی به جای نگاهدارنده‌های شیمیایی و سنتتیک مورد استفاده قرار گیرند [۲، ۱۶]. اسانس حاصل از گونه‌های مختلف گیاه *M. lonifolia* علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی قابل مقایسه با داروهای استاندارد می‌باشد [۵]. اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی برخی از اجزای اسانس گونه‌های مختلف *M. lonifolia* (شامل *pulegon*، *piperitenon oxide* و *cis-piperitone epoxide*) در بسیاری از مطالعات گزارش شده است [۱۷، ۱۸]. در مطالعه حاضر نیز بالاترین ترکیب موجود در اسانس پونه کوهی مورد استفاده *pulegon* بوده که اثرات ضد میکروبی آن در مطالعات قبلی گزارش شده است. توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین در زمینه کنترل میکروارگانیسم‌های نامطلوب در پنیر به خوبی مشخص شده است [۱۹]. وازکونز و همکاران (۲۰۰۵) فعالیت ضد میکروبی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی را مرتبط با تولید باکتریوسین گزارش نمودند [۲۰]. در این مطالعه نیز اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی علیه لیستریا مونوسیتوژنز مشهود بود. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH پنیر در مراحل مختلف تهیه و نگهداری آن در این مطالعه نشان‌دهنده فقدان تاثیر اسانس پونه کوهی بود. به عبارت دیگر غلظت‌های مختلف پونه کوهی تاثیر معنی‌داری بر رشد و فعالیت پروبیوتیک و باکتری‌های مولد اسید لاکتیک موجود در استارتر به کار رفته در این مطالعه نداشت. زایکا و همکاران (۱۹۸۳) نیز در مطالعه مشابهی هیچ‌گونه اثر مهاري در غلظت‌های مختلف اسانس پونه

کوهی (۲۰۰-۴۰ ppm) بر باکتری‌های مولد اسید لاکتیک نظیر لاکتوباسیلوس پلانناروم و پدیکوکوس اسیدولاکتیس در محیط کشت مایع مشاهده نمودند [۲۱]. مواد غذایی عملگر (Functional foods) باید حداقل دارای 10^6 cfu/g باکتری پروبیوتیک باشند تا بتوانند اثرات مفید سلامتی را در مصرف‌کننده ایجاد نمایند [۲۲]. در این مطالعه نیز در پایان دوره رسیدن پنیر سفید، شمار باکتری پروبیوتیک مذکور بالاتر از این میزان بوده و پنیر سفید ایرانی می‌تواند به عنوان یک مدل غذایی مناسب حامل باکتری‌های پروبیوتیک مطرح باشد. در مطالعه صورت گرفته توسط منون و همکاران (۲۰۰۱) اثر ضد لیستریایی روغن میخک در مدل‌های غذایی گوشت و پنیر در دو درجه حرارت ۳۰ و ۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت ۱ درصد اسانس میخک سبب جلوگیری از رشد لیستریا مونوسیتوژنز در هر دو درجه حرارت در هر دو مدل غذایی می‌شود. چنین بیان شد که اسانس میخک می‌تواند به عنوان یک محافظت‌کننده طبیعی در گوشت و پنیر مورد استفاده قرار گیرد [۲۳]. فعالیت ضد میکروبی چند اسانس گیاهی علیه *E. coli* O157:H7 توسط بورت و ریندرس (۲۰۰۳) ارزیابی شد. آنها نشان دادند که اسانس‌های پونه کوهی و آویشن در محیط براث اثر ممانعت‌کنندگی بالایی در طیف وسیعی از دما روی *E. coli* O157:H7 دارند [۲۴]. اسمیت و همکاران (۲۰۰۱) اثرات ضد میکروبی اسانس‌های برگ بو، میخک، دارچین و آویشن را به عنوان محافظت‌کننده‌های طبیعی غذایی در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد در پنیرهای نرم با چربی کم و زیاد علیه لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا انتریتیدیس در دو دمای ۴ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد در طی ۱۴ روز مورد مطالعه قرار دادند. هر چهار اسانس طبیعی در غلظت ۱ درصد در پنیر با چربی کم باعث کاهش لیستریا مونوسیتوژنز تا کمتر از یک کلنی در هر گرم شدند. در مقابل در پنیر با چربی زیاد اسانس میخک تنها اسانسی بود که باعث کاهش مشابه شد [۲]. در مطالعه صورت گرفته توسط عباسی‌فر و همکاران (۲۰۰۹) اثر اسانس آویشن شیرازی و استارتر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز در طول مدت تهیه، رسیدن و نگهداری



دماهای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که افزایش pH باعث کاهش تأثیر هر دو ماده شد. در ضمن تأثیر هر دو ماده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود [۲۶]. در این مطالعه، غلظت ۰/۰۳ درصد اسانس پونه کوهی از بالاترین تأثیر ممانعت‌کنندگی بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برخوردار بود، به گونه‌ای که در تیمار توام با پروبیوتیک به طور سینرژیک از بالاترین اثر ضد میکروبی برخوردار بودند، زیرا باکتری‌های پروبیوتیک نیز قادرند با تولید باکتریوسین‌ها و افزایش اسیدیته و رقابت میکروبی تا حدودی از رشد بسیاری از باکتری‌های پاتوژن جلوگیری نمایند. بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت رشد لیستریا مونوسیتوژنز و نیز از نظر تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۱۵ درصد در تیمار توام با باکتری پروبیوتیک بود. بنابراین با کاربرد توام ترکیبات محافظت‌کننده زیستی مختلف به ویژه اسانس‌های گیاهی و پروبیوتیک‌ها، می‌توان از غلظت‌های پائین‌تری از اسانس‌ها جهت کنترل و ممانعت از رشد ارگانیسم‌های پاتوژن و عامل فساد در مواد غذایی جهت کاهش هزینه‌های اقتصادی و اثرات نامطلوب غلظت‌های بالاتر اسانس‌ها بر خصوصیات ارگانولپتیکی مواد غذایی بهره جست.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و از همکاری آقایان پروفیسور سید مهدی رضوی روحانی، دکتر امیر تکه‌چی و دکتر محمدرضا پژوهی تشکر و قدردانی می‌شود.

پنیر سفید ایرانی ارزیابی شد، علاوه بر مقاومت باکتری‌های استارتر به اسانس مذکور، رشد باکتری‌های پاتوژن مذکور در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۰۵ درصد اسانس، و استارتر و در تیمارهای توام تحت تأثیر قرار گرفت، بنابراین اثرات سینرژیستی بین اسانس مذکور و استارتر مشاهده شد [۲۵]. آركوز و همکاران (۲۰۰۵) اثر ترکیبی تیمار با فشار بالا و باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین را بر روی بقای لیستریا مونوسیتوژنز در لگاریتم ۴/۸ cfu/mL همراه با استارتر تجاری و یکی از هفت سویه BP-LAB (Bacteriocin Producing-Lactic Acid Bacteria) در پنیر حاصل از شیر خام بررسی کردند. در روز سوم شمار لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر کنترل (بدون BP-LAB و تیمار با HP) به $\log \text{cfu/g}$ ۷/۰۳، در پنیرهای حاوی BP-LAB به $\log \text{cfu/g}$ ۶/۰۶ - ۶/۰۷، در یک پنیر فاقد BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa (Mega Pascal Atmospheric) تیمار شده بود به $\log \text{cfu/g}$ ۶/۱۳، در نمونه دیگر با فشار ۵۰۰ MPa به $\log \text{cfu/g}$ ۲/۰۱، در پنیرهای حاوی BP-LAB که در روز دوم با فشار ۳۰۰ MPa تیمار شده بودند به $\log \text{cfu/g}$ ۳/۸۳ - ۵/۴۳ و در نمونه‌های مشابهی که با فشار ۵۰۰ MPa تیمار شدند به $\log \text{cfu/g}$ ۱/۱۸ یا کمتر رسید [۱۰]. در مطالعه انجام شده توسط بوریندر و همکاران (۲۰۰۱) اثر سینرژیک عصاره آلی سیر و نیسین به صورت تغییرات حداقل غلظت نگهدارنده بر روی ۶ سویه لیستریا مونوسیتوژنز در یک مدل محیط کشت مایع Triptose phosphate broth بررسی شد و یک تأثیر سینرژیک ضدباکتریایی بر روی سویه‌های لیستریا در هنگام استفاده این دو ماده با هم مشاهده شد. علاوه بر این، تأثیر سایر فاکتورهای رشدی از قبیل pH و

منابع

1. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M and Bruni R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 2005; 91: 621

- 32.

2. Smith P, Stewart J and Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18: 463 - 70.



3. Griffiths MV. *Listeria monocytogenes*: its important in the dairy industry. *J. of the Sci. Food and Agric.* 1989; 47: 133 - 58.
4. Bille J. Epidemiology of human *listeriosis* in Europe, with special to the swiss outbreak. In A. J. Miller, J. Miller, J. L. Smith and G. A. Somkuti (Eds.), *Foodborn listeriosis*. pp: 31-39. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
5. Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A and Ozkan H. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha Longifolia* L. ssp. *Food Chem.* 2007; 103: 1449 - 56.
6. Codd LE. The genus *Mentha*. Flora of Southern Africa. 1985; 28 (4): 107 - 11.
7. Phillip SM, Kailasapathy K and Tran L. Viability of comrcial probiotic cultures (*L. aciduphillus*, *Bifidobacterium spp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. *Int. J. of Food Microbiol.* 2006; 108: 276 - 80.
8. Ong L, Henriksson A and Shah NP. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 446 - 56.
9. Zhang CY, Yam kl and Chikindas ML. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released in to a broth system. *Int. J. of Food Microbiol.* 2004; 90: 22 - 25.
10. Arques JL, Rodriquez E, Gaya P, Medina M and Nunez M. Effect of combinations of high pressure treatment and bacteriocin producing lactic acid bacteria on survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 2005; 15: 898 - 900.
11. Powell MN, Armynot AM, Vinas M and DeBuochberg SM. Interactions between pairs of bacteriocins from *Lactic acid bacteria*. *J. Food Prot.* 1998; 61: 1210 - 2.
12. Amuna MB, Abusha ST and Jeevaratnam K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocin fro *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiol.* 2005; 22: 449 - 54.
13. Basti AA, Misaghi A and Khaschabi D. Growth response and modelling of the effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil, pH and temperature on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT.* 2007; 40 (6): 973 - 81.
14. Krasaekoopt W, Bhandari B and Deeth H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 2004; 14 (8): 737 - 43.
15. Meilgaard M.C, Civille G.V, Carr B.T. Sensory evalution techniques. 2nd edition. Crc prees, inc. bocaration, florida. 1991, pp: 123 - 30.
16. Burt S. Essential: their antibacterial propertied application in foods-a review. *Int. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223 - 53.
17. Karaman I, Sahin F, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M and Adiguzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol exetracts of *Juniperus* L. *J. Ethnopharmacol.* 2003; 85: 231 - 5.
18. Sahin F, Karaman I, Gulluce M, Ogutcu H, Sengul M, Adiguzel A, et al. Evaluation of antimicrobial activities *Satureja hortensis* L. *J. of Ethnopharmacol.* 2002; 14 (2): 141 - 6.
19. Bernardez PF, Amado IR, Castro LP and Guerra NP. Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 in whey. *Int. Dairy J.* 2008; 18: 1057 - 65.
20. Vazquez JA, Gonzalez MP and Murado MA. Stimulation of bacteriocin production by dialyzed culture media from different lactic acid bacteria. *Current Microbiol.* 2005; 50: 208 - 11.
21. Zaika LL, Kissinger JC and Wasserman AE. Inhibition of Lactic Acid Bacteria by Herbs. *J. of Food Sci.* 1983; 48: 1445 - 9.
22. Kasimoglu A, Goncuoglu M and Akgun S.



Probiotic With cheese *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.* 2004; 14: 1067 - 73.

23. MenonVK and Grag SR. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocitogens* in meat and cheese. *Food Microbiol.* 2001; 18: 647 - 70.

24. Burt S A and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *J. Appl. Microbiol.* 2003; 36: 162 - 7.

25. Abbasifar A, Basti AA, Karim G, Bokaie S, Abbasifar R, Villa AA, Misaghi A, Jamshidi AH,

Gandomi H and Javan AJ. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and starter culture on *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and storage of white brined cheese. *Milchwissenschaft.* 2009; 64 (4): 438 - 42.

26. Bhurinder S, Bernadette F, Martin R. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *J. of Food Microbiol.* 2001; 18: 133 - 9.



The Antimicrobial Activity of *Mentha longifolia* L. Essential Oil and *Lactobacillus casei* on Growth of *Listeria monocytogenes* During the Manufacture, Ripening, and Storage of Iranian white Cheese

Mahmoudi R (Ph.D. Student)¹, Ehsani A (Ph.D.)^{1*}, Tajik H (Ph.D.)¹, Akhondzade Basti A (Ph.D.)²

1- Department of Food Hygiene & Aquatics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

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

*Corresponding author: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Iran. P.O.Box: 571531177

Tel: +98 - 441 - 2770508, Fax: +98 - 441 - 2771926

E-mail: a.ehsani@urmia.ac.ir

Abstract

Background: Food preservation includes procedures to assure higher level of food safety, hygiene and stability. To achieve this goal, the use of combination biopreservatives, such as Essential oils and Probiotics, has gained increased attention.

Objective: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese.

Methods: The essential oil of this plant was prepared by steam distillation and analyzed by GC/MS method. The inhibitory effect of different concentrations of this essential oil and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes* were determined by the method of viable colony count on the selective media in different interval of production and storage of Iranian white cheese.

Results: The results showed that 0.03 and 0.015 % of this essential oil when used in combination with *Lactobacillus casei* had the highest inhibitory effect on the growth of *Listeria monocytogenes*. Furthermore, 0.015% of this essential oil combined with *Lactobacillus casei* had not only inhibitory effect on growth of *Listeria monocytogenes* but also maintained optimum taste quality of the cheese.

Conclusion: The effects of used concentrations of *Mentha longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* showed significantly higher antibacterial activity compared to the control and treatments containing essential oil without probiotic bacteria. This reveals inhibitory effect of essential oil of *Mentha longifolia* L. and *Lactobacillus casei* against *Listeria monocytogenes*. It was concluded that lower concentrations of *Mentha longifolia* L. essential oil could be used for inhibitory activity combined with probiotic bacteria.

Keywords: *Mentha longifolia* L., *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, Iranian White Cheese

