مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال پانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹، صفحات ۱۲۰-۱۱۳

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

بهرام فتحی آچاچلوئی[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: bahram1356@yahoo.com، b_fathi@uma.ac.ir
۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت وکنترل موادغذایی، 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 اسانس‌ها در نگهداری مواد غذایی، نه تنها به عنوان مواد ضدمیکروبی طبیعی بلکه به عنوان جایگزینی مناسب برای نگهدارنده های سنتتیک و مضر، مورد توجه بسیاری از محققین قرارگرفته است. این تحقیق با هدف استخراج و شناسایی ترکیبات اسانس انیسون و نیز تعیین خصوصیات ضد میکروبی اسانس انیسون بر روی چهار پاتوژن غذایی‌گرم منفی و گرم مثبت، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از استخراج اسانس انیسون توسط دستگاه کلونجر با روش تقطیر با بخار آب، به منظور شناسایی ترکیبات اسانس استخراج‌شده از دستگاه GC/MS استفاده شد. همچنین میزان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) با استفاده از محیط کشت BHI به روش میکرودایلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، بر روی میکروارگانیسم‌های *باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلای O157:H7 و سالمونلا تیفی موریوم*، تعیین گردید.

یافته‌ها: 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 باکتری‌های *باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی* 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 ضدمیکروبی مناسب می‌تواند 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

امروزه بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به پاتوژن های غذایی یک مسئله مهم در صنعت غذا به شمار می‌رود. تأثیر عمل ضد میکروبی اسانس‌های گیاهان دارویی در مدل‌های غذایی و همچنین در داخل مواد غذایی توسط بسیاری از محققین درگذشته مورد بررسی و تحقیق قرارگرفته است (۳-۱).

با توجه به اینکه ترکیبات ضد میکروبی بدست آمده از گیاهان با مکانیسم های متفاوت از آنتی بیوتیک ها بر باکتری‌ها 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 آنتی‌بیوتیک‌ها مهم می باشد (۴). اسانس‌ها ترکیبات روغنی گیاهی هستند که از بخش‌های مختلف گیاهان مثل شاخه، گل، غنچه، برگ، جوانه، پوست، ریشه، میوه به‌وسیله روش‌های مختلفی از قبیل استفاده از بخارآب داغ، استخراج‌شده و مخلوط ترکیبات شیمیایی آلی فرار می‌باشند. این مایعات

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

روغنی بودار به علت تبخیر در مجاورت هوا در دمای طبیعی محیط روغن‌های فرار یا روغن اسانسی نامیده می‌شوند (۵). به‌طورکلی مکانیسم‌های مختلف از اثر اسانس‌ها بر روی سلول‌های باکتریایی گزارش‌شده است، اختلال در ساختمان دیواره سلولی و آسیب رساندن به غشای سیتوپلاسمی و میتوکندریایی (۶)، آسیب رساندن به پروتئین‌های غشا و اتصال به RNA و DNA (۷) ، همین‌طور 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 می‌باشد. به‌طورکلی هرچه مقادیر مواد فنولی که مسئول خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها می‌باشند، بالاتر باشد، خواص ضد باکتریایی آن‌ها علیه میکروارگانیسم‌ها بیشتر خواهد شد (۹).

گیاه انیسون بانام علمی *Pimpinella anisum L.* از خانواده *Umbelliferae* می‌باشد. انیسون گیاهی است علفی، یک‌ساله، با گل‌های سفید که بخش عمده مورداستفاده دانه‌های آن است که سبزرنگ، گلابی‌شکل و کوچک می‌باشد که در ترکیه، ایران، هند، مصر و همچنین کشورهای اروپایی مانند اسپانیا، ایتالیا و آلمان و همچنین آمریکای جنوبی رشد می‌کند (۱۰، ۳). محققین گزارش نموده‌اند ترکیبات اصلی اسانس این گیاه شامل *anothole* به‌عنوان عامل فعال اصلی و همچنین دارای ترکیبات *eugenol, methylchavicol, anisaldehyde* و *estragole* می‌باشد (۱۱). همچنین گزارش‌شده است، بوی اصلی این گیاه که از چندین کشور اروپایی جمع‌آوری‌شده بود، ناشی از ترکیب *trans-anethole* موجود در اسانس آن می‌باشد که معمولاً حدود ۷۵ الی ۹۵ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌گردد. همچنین سایر ترکیبات نظیر γ-himachalene، *trans*-pseudoisoeugenyl2-methylbutyrate و *p*-anisaldehyde در ترکیبات اسانس روغنی این گیاه با حداکثر بازده روغنی ۵/۴ درصد، یافت شد(۱۲). گزارش‌های متنوعی در رابطه با قدرت ضدمیکروبی این اسانس علیه باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد وجود دارد. محققین گزارش نمودند این اسانس دارای خواص ضدمیکروبی علیه برخی میکروارگانیسم‌ها نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا، کاندیدا آلبیکانس، استرپتوکوکوس پیوژنس، انتروکوکوس فکالیس، میکروکوکوس لوتئوس، سالمونلا تیفی* می‌باشد (۱۰،۱۳). با توجه به شناسایی میزان ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس انیسون استخراج شده مشخص شده است که میزان *trans-anethole* ، meta-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 اسانس‌های گیاهی در داخل مواد غذایی به‌عنوان یک ماده ایمن (Generally Recognized As Safe) شناخته‌شده است (۱۵، ۵) ، ولی با این‌حال استفاده از این اسانس‌ها 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) اسانس‌ها که توسط اکثر محققان به‌عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها بیان‌شده و نشانگر حداقل غلظتی است که موجب بازداشتن و یا کاهش قابلیت زنده ماندن میکروب‌های تلقیح شده می‌شود، به‌منظور استفاده از غلظت مؤثر این اسانس‌ها و بررسی عدم تاثیر نامطلوب روی خصوصیات حسی ناشی از آنها در غلظت های موثر، از آزمایش‌های برون تنی (*in vitro*) استفاده می‌نمایند (۱۷، ۵). در این مطالعه، اسانس دانه انیسون با هدف استخراج به‌وسیله دستگاه کلونجر(Clevenger)، شناسایی ترکیبات اسانس انیسون و نیز تعیین خصوصیات ضد میکروبی، حداقل غلظت بازدارنده رشد این اسانس بر روی باکتری‌های پاتوژن غذایی با روش میکرودایلوشن بررسی گردید.

• مواد و روش‌ها

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 آبگیری توسط سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و سپس آبگیری توسط اضافه کردن مقداری سدیم سولفات بدون آب و سانتریفیوژ مجدد در همان شرایط، قابل‌استفاده گردید (۱۸).

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

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 میلی‌لیتر در دقیقه و برنامه دمایی آون 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 ۱۸ساعت 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 دمای۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین 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 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 ۰/۱mg/ml کلرامفنیکل) و همچنین جهت کنترل آسپتیک بودن روش کار، خانه‌های حاوی محیط کشت استریل همراه با DMSO نیز وجود داشت (۲۲). تمامی نتایج به‌صورت میانگین و نتایج شمارش میکروبی به‌صورتLog CFU/ml بیان گردید.

تهیه میزان تلقیح باکتری: جهت تهیه میزان تلقیح باکتری، از کشت دوم مقادیر مختلفی به داخل لوله‌ی کووتی که حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز است، منتقل شد تا جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به دست آید. سپس با انتقال۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی داخل کووت، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد رقت‌های متوالی تا ۶ - تهیه گردید. از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های BHI آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت ها 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 ۰/۱(۰/۱=OD_{600}) محاسبه گردید. پس از تعیین غلظت هرکدام از باکتری‌ها در سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری ۰/۱، با استفاده از لوله‌های حاوی مقادیر مشخصی از آب پپتونه ۰/۱ درصد، غلظت هرکدام از باکتری‌ها در میزان 1×10^{7} CFU/ml، استاندارد شد(۲۱).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد به روش میکرودایلوشن: غلظت‌های متوالی اسانس (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 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 ۰/۱mg/ml کلرامفنیکل) و همچنین جهت کنترل آسپتیک بودن روش کار، خانه‌های حاوی محیط کشت استریل همراه با DMSO نیز وجود داشت (۲۲). تمامی نتایج به‌صورت میانگین و نتایج شمارش میکروبی به‌صورتLog CFU/ml بیان گردید.

• یافته‌ها

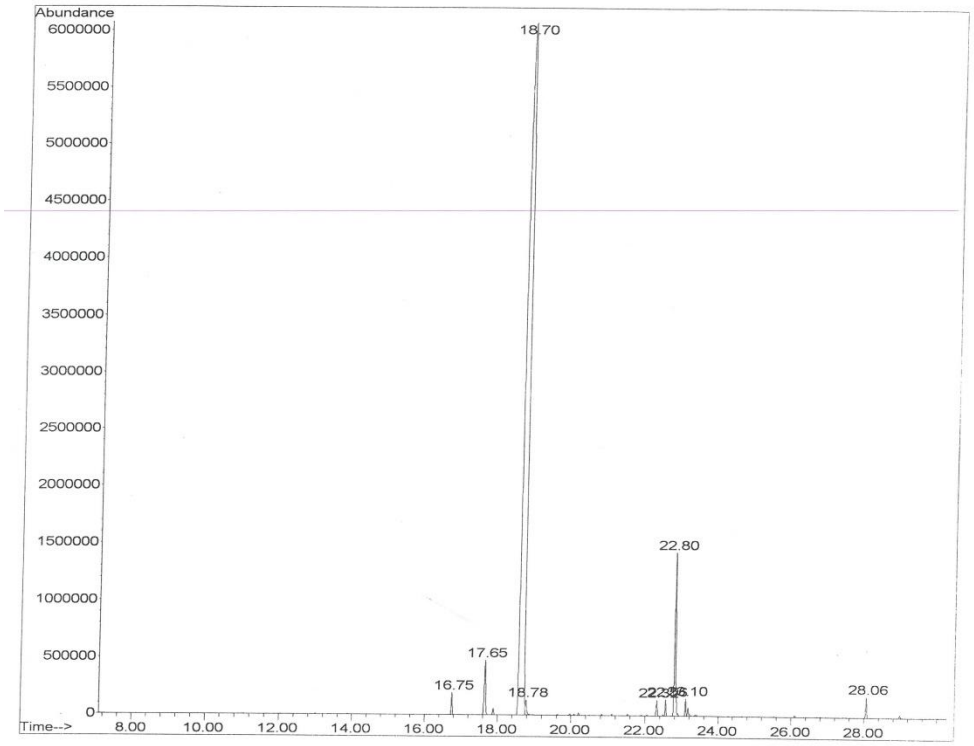
شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دانه انیسون: بعد از شناسایی ترکیبات اسانس، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنج جرمی، ۷ نوع ترکیب ارگانیک مختلف در آن شناسایی گردید که در مجموع ۹۸/۶۴ درصد کل آن را تشکیل می‌داد. در بین ترکیبات شناسایی‌شده، trans-anethole (۸۷/۴۷٪)، gamma-himachalene (۶/۴۶ ٪) و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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

جدول۱. شناسایی میزان ترکیبات شیمیایی مختلف موجود در اسانس انیسون
(به روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی)

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

*در مقایسه با n-آلکان‌ها در ستون DB-1



شکل۱ . کروماتوگرام ترکیبات اسانس انیسون در دستگاه GC

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس:
میزان باکتری‌ها در جذب نوری ۰/۱ (OD_{600}=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 موریوم و همچنین اشرشیا کلی O157:H7* در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر با جذب نوری ۰/۱، به ترتیب برابر با Log CFU/ml $۲/۷\times۱۰^{۷}$، $۴/۴\times۱۰^{۷}$، $۲/۱\times۱۰^{۷}$ و $۱/۴\times۱۰^{۷}$ بود. همچنین مشاهده گردید که حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس انیسون برای باکتری‌های گرم مثبت *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۰/۰۵ و ۰/۰۶ 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 موریوم* و *اشرشیا کلی* O157:H7 ممانعت کند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس انیسون

میکروارگانیسم‌ها	اسانس انیسون (درصد وزنی-وزنی)	تعداد باکتری‌ها OD_{600}=۰/۱ (CFU/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۰۶	۲/۷×۱۰^{۷}
باسیلوس سرئوس	۰/۰۵	۴/۴×۱۰^{۷}
سالمونلا تیفی موریوم	۰/۲	۲/۱×۱۰^{۷}
اشرشیا کلی O157:H7	۰/۲۵	۱/۴×۱۰^{۷}

• بحث

امروزه به دلیل مشخص شدن تأثیر سوء مواد ضدمیکروبی 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 قرارگرفته، می‌تواند مانع از افزایش انتقال بیماری‌های ناشی از غذا و کنترل آنها، گردد که به‌نوبه خود استفاده از این مواد ضدمیکروبی طبیعی، باعث کاهش عواقب استفاده از مواد ضدمیکروبی شیمیایی و سنتتیک، می‌گردد.

در رابطه با خصوصیات ضدمیکروبی اسانس انیسون، در تحقیقات انجام‌گرفته گزارش‌های محدودی در این رابطه وجود دارد، مثلاً Gülçin و همکاران، در مطالعه خود به بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی بذرهای گیاه انیسون علیه ۱۰ میکروارگانیسم گرم مثبت و گرم منفی ازجمله *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 میکروارگانیسم‌های 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)، انتروباکترآئروژینوزا (۸ میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اورئوس (۹ میلی‌متر)، استرپتوکوکوس پنومونیه (۱۱ میلی‌متر)، میکروکوکوس لوتئوس (۹میلی‌متر)، استافیلوکوکوس اپیدرمیس (۸ میلی‌متر) و کاندیدا آلبیکانس (۸ میلی‌متر) و نتایج هاله عدم رشد در اطراف میکروارگانیسم‌های موردمطالعه در رابطه با اثر عصاره الکلی عبارتند از: سودوموناس آئروژینوزا (۷ میلی‌متر)، اشرشیا کلی (۷ میلی‌متر)، پروتئوس میرابیلیس (۹ میلی‌متر)، سیتروباکتر (۸ میلی‌متر)، انتروباکترآئروژینوزا (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 ضدمیکروبی عصاره متانولی و اسانس بذرهای انیسون را علیه میکروارگانیسم‌های 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 ایی بین ۱۵/۶-۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر را برای آن مشخص نموده است (۱۰). همچنین Abdel-Reheem، اثر ضدمیکروبی اسانس بذرهای گیاه انیسون علیه میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی ازجمله 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 ۴-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش نموده است (۱۳). احتمال می رود حضور ترکیبات فنلی موجود در اسانس انیسون به عنوان اصلی ترین 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 هم افزایی با ترکیبات اصلی) تشکیل دهنده اسانس انیسون، به عنوان مسئول اصلی خاصیت ضد میکروبی این اسانس ذکر گردیده است (۱۰، ۵، ۳). همچنین ترکیبات شناسایی‌شده اسانس انیسون در تحقیقات گذشته به صورت های مختلفی گزارش شده است، Orav و همکاران،گزارش نمودند ترکیب اصلی تمامی نمونه‌های مورد مطالعه اسانس گیاه انیسون جمع آوری شده از کشورهای مختلف اروپایی، شامل*trans-anethole* به میزان ۷۵ الی ۹۵ درصد و سایر ترکیبات به صورت-γ himachalene، *trans*-pseudoisoeugenyl 2-methylbutyrate و *p*-anisaldehyde بود (۱۲) و همچنین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

Ullah و همکاران، *trans-anethole* (۸۲/۱ درصد) و γ-*himachalene* (۷ درصد) را به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس این گیاه گزارش نمودند (۲۳). Abdel-Reheem ترکیبات اصلی متشکله اسانس انیسون را به‌صورت زیر گزارش نموده است که ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده آن شامل موارد زیر می‌باشد: trans-anethole (82/1%), cis-anethole (8/5%), estragole (methylchavicol) (5/2%), linalool (3/2%), aterpineol (5/1%), methyl eugenol (3/1%) (۱۳). می‌توان گفت اختلافات بسیاری در ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده اسانس این گیاه وجود ندارد، ولی به‌طورکلی وجود اختلافات را می‌توان این‌گونه مطرح نمود، اختلافاتی که بین بازده و ترکیبات متشکله اسانس‌های حاصله از تحقیقات مختلف و همچنین قدرت ضدمیکروبی 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 تشکیل‌دهنده 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. ازجمله عوامل مهمی که در میزان مواد مؤثره گیاهان نقش دارد و می‌بایستی در هنگام جمع‌آوری گیاهان به‌ویژه دارویی و معطر موردتوجه 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 خشک‌کردن و نحوه انجام عمل اسانس‌گیری نیز باشد (۳۱-۲۴).

همچنین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از قدرت ضدمیکروبی 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. ازجمله دلایل این امر را 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 (۳۴-۳۲).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه مشخص شد اسانس انیسون دارای خصوصیات ضدمیکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی بیماریزای غذایی (Food Borne) است، و با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد و همچنین می‌تواند به‌عنوان 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 درنهایت موجب افزایش ایمنی مواد غذایی می‌گردد.

• References

1.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.

2.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.

3.Gülçin I, Oktay M, Kireçci E, Küfrevioğlu ÖI. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts. Food Chemistry 2003; 83(3), 371–82.

4. Eloff J.N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. Journal of Ethnophaemacology, 1999; 67(3):355-360.

5.Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 2004; 94(3), 223–53.

6.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.

7.Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Molecules 2012; 17(4), 3989–4006.

8. Ultee A, Bennik 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.

9. Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

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-Shtayeh 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, Vrchotová N, Tříska 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 Microbiology1997; 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]

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: H7and Salmonella typhimurium*

Fathi-Achachlouei B[1], Babolanimogadam N*[2], Zahedi Y[3]

*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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-03-21]