

## بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زنیان و نایسین بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده بر پنیر موزارلا (پنیر پیتزا) و تغییر پارامترهای شیمیایی و حسی آن

نیوشا غیبی<sup>۱</sup>، بهار محمدی<sup>۱</sup>، نرگس ولایتی<sup>۱</sup>، آنا عبدالشاهی<sup>۲</sup>، نبی شریعتی<sup>۳</sup>

۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات ایمنی مواد غذایی (نمک)، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- نویسنده مسئول: گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. پست الکترونیکی: nshariatifar@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۲۵

### چکیده

**سابقه و هدف:** یکی از محصولات لبنی پرمصرف، پنیر موزارلا است که احتمال رشد پاتوژن‌های غذایی مانند لیستریا مونوسیتوژنز در آن زیاد و روش‌های نگهداری آن دارای اهمیت فراوان است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زنیان و نایسین بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده بر پنیر موزارلا و تغییر پارامترهای شیمیایی و حسی آن است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه پس از آماده سازی اسانس زنیان و نایسین، آزمون میکروبی (شامل ارزیابی میکروبی لیستریا مونوسیتوژنز)، آزمون شیمیایی (شامل pH) و ارزیابی حسی (شامل آزمون ظاهر، بافت، رنگ، عطر و پذیرش کلی) انجام شدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که اسانس زنیان و نایسین موجب کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های پنیر تیمار شده (نسبت به نمونه شاهد) شده است. در روزهای ۱۱-۳ نگهداری، میزان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه پنیر تیمار شده (نسبت به نمونه شاهد) اختلاف معنی‌داری داشت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین میزان رشد باکتری در روز ۱۱ و مربوط به تیمار حاوی اسانس زنیان ۲٪ بود ( $8/32 \text{ Log CFU/g}$ ). نتایج حاصل از ارزیابی pH نشان داد که غلظت‌های اسانس زنیان و نایسین در طی دوره نگهداری تأثیر معنی‌داری بر pH نداشتند. در بررسی خواص حسی بالاترین امتیاز در تمام روزها مربوط به اسانس زنیان ۲٪ بود و اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد داشت.

**نتیجه‌گیری:** در نهایت می‌توان گفت اگرچه از نظر میزان کاهش بار میکروبی و تغییرات pH، تیمارها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، اما با در نظر گرفتن خواص حسی می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از اسانس زنیان ۲٪ می‌تواند گزینه مناسبی جهت ارتقاء ایمنی پنیر موزارلا و حفظ خواص حسی آن باشد.

**واژگان کلیدی:** آزمون pH، ارزیابی حسی، آزمون میکروبی، پاتوژن غذایی، افزایش ماندگاری غذا

### پیام‌های اصلی

- اثر ضد میکروبی اسانس زنیان و نایسین بر باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده بر پنیر موزارلا و تغییر پارامترهای میکروبی، شیمیایی و حسی آن بررسی شد.
- نتایج نشان داد که اسانس زنیان و نایسین موجب کاهش تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های پنیر تیمار شده (نسبت به نمونه شاهد) شده است.
- نتایج حاصل از ارزیابی pH نشان داد که غلظت‌های اسانس زنیان و نایسین در طی دوره نگهداری تأثیر معنی‌داری بر pH نداشتند.
- در بررسی خواص حسی بالاترین امتیاز در تمام روزها مربوط به اسانس زنیان ۲٪ بود و اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد داشت.

## ● مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنز یکی از میکروارگانسیم‌های مهم مواد غذایی بویژه فراورده‌های لبنی است که دارای توانایی رشد در دماهای مختلف ( $4^{\circ}\text{C}$ – $45^{\circ}\text{C}$ )، در طیف وسیعی از pH و در مقادیر بالای نمک است (۱–۳). بیماری ناشی از باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (لیستریوزیس) ارتباط مستقیمی با مصرف مواد غذایی فرآوری شده و آماده، از جمله فرآورده‌های لبنی دارد (۱، ۴، ۵). لیستریوزیس می‌تواند منجر به عفونت سپتی سمی، مننژیت، پری ناتال، گاستروانتریت و سقط جنین در حیوان و انسان شود (۳، ۶، ۷) از این رو مطالعات متعددی در رابطه با شیوع لیستریا مونوسیتوژنز در محصولات لبنی از جمله انواع پنیر در جهان انجام گرفته است (۵، ۸–۱۰). اولین شیوع لیستریوزیس انسانی مرتبط با مصرف پنیر تازه در ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۸۵ بود و از آن زمان تاکنون چندین شیوع بیماری مرتبط با پنیر در سرتاسر جهان از جمله ایران به وقوع پیوسته است که تاکنون تلفات زیادی را سبب شده است (۱۱).

پنیر موزارلا یک پنیر نرم و تازه (عدم وجود مرحله رسیدن در این پنیر) از خانواده پنیرهای پاستافیلاتا (دلمه قابل ارتجاع) است که عمدتاً با شیر گاو یا گاومیش پاستوریزه و یا غیر پاستوریزه تهیه می‌شود (۱، ۱۲، ۱۳). طبق آمار رسمی ایران تعداد واحدهای فعال تولید پنیر موزارلا (پیتزا) در ایران تا آخر مهر سال ۱۴۰۱، ۹۹ واحد بوده است که در مجموع حدود ۶۶۳۹۶ تن، ظرفیت تولید این محصول می‌باشد (۱۴). آلودگی شیر به عوامل فاسدکننده و بیماری‌زا می‌تواند ناشی از ورم پستان دام، روش‌های غیر بهداشتی شیردوشی، تجهیزات شیردوشی غیر استریل و سایر آلودگی‌های ثانویه باشد (۴، ۱۵).

آلودگی در پنیر موزارلا می‌تواند در حین فرآیند و پس از آن رخ دهد و گفته می‌شود آلودگی ثانویه عامل اصلی آلودگی انواع پنیرها به لیستریا مونوسیتوژنز است (۱، ۱۶). این امر در مطالعه‌ای که توسط Greco و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام شد، مشاهده گردید (شیوع ۲۴/۴ درصد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای موزارلا از یک کارخانه لبنی واقع در منطقه Lazio، کشور ایتالیا، به علت آلودگی ثانویه مشاهده شد) (۱۷). همچنین چندین هشدار در رابطه با آلودگی پنیرهای موزارلا به لیستریا مونوسیتوژنز در سال‌های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۷ توسط سیستم هشدار سریع برای غذای انسان و غذای دام RASFF یا Rapid Alert System for Food and Feed که مربوط به بخش ایمنی غذایی اتحادیه اروپا می‌شود، صادر شده

است (۴). پنیر موزارلا با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی که دارد (رطوبت بالا، pH نزدیک خنثی و مقادیر کم نمک) می‌تواند محیط مطلوبی برای رشد و تکثیر لیستریا مونوسیتوژنز باشد (۱، ۴). با توجه به درک اهمیت این موضوع در سال‌های اخیر مطالعاتی در رابطه با راهکارهای کاهش لیستریا مونوسیتوژنز روی پنیر موزارلا انجام شده است که از جمله آن می‌توان به استفاده از استیک اسید و همچنین بسته‌بندی‌های حاوی روغن رزماری و آویشن، اشاره کرد که هرکدام از این روش‌ها به نوبه خود اثرات مثبتی را در کاهش این باکتری در پنیر موزارلا داشته‌اند (۱، ۱۳، ۱۸).

امروزه استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی و گیاهی مانند اسانس‌ها به دلیل اثرات آن‌ها برای افزایش کیفیت و ایمنی غذایی حائز اهمیت است (۱۹، ۲۰). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گیاهان معطر و دارویی سنتز می‌شوند. اسانس‌ها مایعات چربی دوست، فرار و در دمای محیط بی‌رنگ هستند (۲۱، ۲۲). این ترکیبات دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که به منظور کنترل رشد پاتوژن استفاده می‌شوند و دارای اثرات مهارکنندگی بیشتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند (۸). از جمله این اسانس‌های گیاهی می‌توان به اسانس زنیان اشاره کرد. زنیان که معمولاً به نام آجوان شناخته می‌شود، متعلق به خانواده چتریان و یکی از ادویه‌های دانه معطر است. منشأ آن خاور میانه، هند، ایران، افغانستان و مصر است (۲۳–۲۵). برخی از اثرات بیولوژیکی زنیان شامل ضد درد، ضد قارچ، ضد التهاب، ضد ویروسی، تب بر، آنتی‌فیالریال می‌باشد. ترکیب اصلی این اسانس تیمول است و علاوه بر آن دارای ایزوتیمول، کارون، گاما تریپنین، پارا سیمین و المول می‌باشد (۲۶–۲۸). دانه آجوان تلخ، تند است و به طور سنتی در درمان نفخ، سوء هاضمه آتونیک، اسهال، تومورهای شکمی، دردهای شکمی، انبوه، مشکلات برونش، کمبود اشتها، آسم و آموره استفاده می‌شوند (۲۴، ۲۵، ۲۷).

ترکیبات پپتیدی (مانند باکتریوسین) که توسط برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تولید می‌شود دارای خاصیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های موجود در محیط هستند (۲۹). نایسین نوعی از باکتریوسین‌ها است که توسط باکتری گرم مثبت لاکتوکوکوس لاکتیس تولید شده و می‌تواند روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت مانند لیستریا

## • مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

نیساپلین از شرکت SERVA (هایدلبرگ، نیویورک) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی و محیط کشت‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند که دارای درجه خلوص تحلیلی (یا بهتر) بودند.

### استخراج اسانس زنیان

گیاه زنیان در ابتدای دوره رویشی جمع آوری شده و اسانس دانه از طریق روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر گرفته شد، که به طور معمول جهت استخراج اسانس از اندام‌های خشک گیاه مانند دانه است. مقدار صدگرم دانه زنیان با ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر وارد بالن دستگاه کلونجر تمام شیشه ای شد و سپس روی حرارت (۱۰۰°C) قرار گرفت تا اسانس فرار بعد از ۴ ساعت اسانس گیری خارج شود. در نهایت اسانس‌ها در ظروف شیشه‌ای کدر جمع آوری شد و سپس توسط سولفات سدیم رطوبت زدایی شده و در درجه حرارت پایین (۴ درجه سانتیگراد) و در ویال‌های شیشه‌ای پلمپ شده نگهداری شدند (۳۵، ۳۶). در نهایت اسانس گیاه زنیان در دو غلظت ۱٪ و ۲٪ جهت تلقیح به پنیر، آماده‌سازی گردید.

### آماده‌سازی نایسین

یک میلی گرم نیساپلین (Nisapline) حاوی ۱۰۰۰ واحد بین‌المللی نایسین خالص است. محلول نایسین با حل نمودن ۰/۸ گرم از نیساپلین در ۱۰ میلی‌لیتر ۰/۰۲HCL نرمال به دست آمد. جهت رسیدن به غلظت‌های پایین‌تر از آب مقطر استریل استفاده شد (۳۷). در نهایت نایسین با دو غلظت ۱۰ میکروگرم بر گرم و ۲۰ میکروگرم بر گرم جهت تلقیح به پنیر، آماده‌سازی گردید.

### آماده‌سازی سوش لیستریا مونوسیتوزنز

سوش لیوفیلیزه لیستریا مونوسیتوزنز (MS12209) از گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهیه گردید. باکتری به محیط کشت BHI Broth با شماره کاتالوگ ۱۱۰۴۹۳ (Brain Heart Infusion broth، شرکت مرک آلمان) منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد و دو مرتبه تجدید کشت به طور متوالی انجام گردید. جهت تعیین میزان تلقیح باکتری، از کشت نهایی مقادیر مختلفی به سل‌های حاوی محیط استریل BHI Broth منتقل شد و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm و شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی، سلی که حاوی حدود ۱۰<sup>۳</sup> cfu/mL از باکتری بود، برای تلقیح به نمونه‌های پنیر موزارلا، مشخص گردید (۳۸).

مونوسیتوزنز و برخی از باکتری‌های گرم منفی، اثر بازدارندگی داشته باشد (۳۰). در سال ۱۹۸۸ FDA یا Food and Drug Administration آمریکا، نایسین را جزء ترکیبات در کل ایمن (GRAS یا Generally Recognized as Safe) معرفی کرد (۳۰). این ترکیب با توانایی ضد باکتریایی بالایی که در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا دارد، به طور گسترده‌ای در مواد غذایی مختلف از جمله لبنیات مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۰، ۳۱) و از نظر قانونی نیز کمیته شیر و فرآورده‌های شیری کدکس (Codex Committee on milk and milk products)، میزان ۱۲/۵ mg/Kg نایسین را برای استفاده در پنیرهای فرآوری شده به عنوان ماده افزودنی، مجاز اعلام کرده است (۳۱). Freitas و همکارانش در سال ۲۰۲۰ اثر فیلم زیست تخریب‌پذیر هیدروکسی‌پروپیل‌متیل‌سلولز همراه با نایسین Z (یکی از انواع طبیعی نایسین که در کنار نایسین A در صنعت و تحقیقات حوزه مواد غذایی بیش‌ترین مصرف را داشته و از نظر ساختاری تنها در اسید آمینه موقعیت ۲۷ با یکدیگر تفاوت دارند) را در میزان نگهداری پنیر موزارلا بررسی کردند و نتایج حاکی از آن بود که این نوع از فیلم می‌تواند یک ترکیب عالی جهت نگهداری پنیر موزارلا باشد (۲۹).

ارزیابی حسی فرآیندی است که در آن ویژگی‌های حسی یک محصول غذایی مانند طعم، بو، بافت و ظاهر توسط گروهی از داوران آموزش‌دیده یا مصرف‌کنندگان مورد بررسی و قضاوت قرار می‌گیرد. آزمون pH به اندازه‌گیری سطح اسیدیته یا قلیایی بودن یک ماده اشاره دارد که می‌تواند تأثیر زیادی بر روی کیفیت، ماندگاری و ویژگی‌های حسی محصولات غذایی داشته باشد. آزمون میکروبی لیستریا مونوسیتوزنز به شناسایی و شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوزنز در نمونه‌های غذایی می‌پردازد، زیرا این باکتری می‌تواند باعث بیماری‌های جدی در انسان شود و کنترل آن در محصولات غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است (۳۲-۳۴).

باتوجه به اثرات زیان‌آور نگهدارندهای شیمیایی و رواج ایده مصرف سبز، لزوم انجام پژوهشی در خصوص اثرات ضد میکروبی نگهدارندهای طبیعی بر رشد میکروارگانیسم‌های مهم غذایی در مدل‌های آزمایشگاهی و غذایی افزایش یافته است. لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دو ماده طبیعی اسانس زنیان (۱٪، ۲٪) و نایسین (۱۰ μg/g، ۲۰ μg/g) بر روی ویژگی‌های شیمیایی، حسی و میزان بار میکروبی لیستریا مونوسیتوزنز تلقیح شده روی پنیر موزارلا طی مدت زمان نگهداری ۱۱ روزه در دمای ۴°C بود.

## تهیه پنیر موزارلا

پنیرهای موزارلا به شکل رنده شده و داخل بسته‌بندی، از یک فروشگاه موجود در سطح شهر تهران تهیه گردید. تمامی بسته‌های پنیر از نظر یکسان بودن نشان تجاری کارخانه تولیدی، بهر تولیدی و بچ تولید یا تاریخ تولید (پنیرهایی تهیه شدند که از تاریخ تولید آن‌ها بیش از یک روز نگذشته بود) به صورت دقیق بررسی شدند (۱). در هنگام تهیه پنیر موزارلا به نام محصول دقت شد که به صورت دقیق "پنیر پیتزا" یا "پنیر موزارلا" روی آن ذکر شده باشد و از محصولات مشابه با اسامی مشابه مانند "تاپینگ پیتزا" و "پنیر پیتزای پروسس" نباشد (۳۹-۴۱). پنیرهای تهیه شده به سرعت به آزمایشگاه منتقل شدند و با همان بسته‌بندی تجاری تا شروع انجام آزمایش داخل یخچال در دمای °C ۴ نگهداری شدند.

## آماده‌سازی نمونه‌ها و تلقیح باکتری، اسانس زنیان و نایسین بر روی آن‌ها

در این مطالعه ابتدا از سطح بازار شهر تهران از یک برند پر مصرف پنیر به میزان مورد نیاز تهیه و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شد (سپس با استفاده از پنیر خریداری شده تعداد ۴۵ بسته پنیر ۶۰ گرمی تهیه شد (۹×۵) برای هر تیمار ۹ بسته ۶۰ گرمی = حجم نمونه ۴۵). جهت تهیه نمونه‌ها و عمل تلقیح، پنیرهای موزارلا از بسته‌بندی تجاری خود خارج و داخل ظروف استریل درب دار توزیع شدند (پنج تیمار مختلف برای آزمون تهیه شد: تیمار شاهد که فقط باکتری به آن تلقیح شده است، تیمار پنیر تلقیح شده با باکتری و اسانس یک درصد، تیمار پنیر تلقیح شده با باکتری و اسانس دو درصد، تیمار پنیر تلقیح شده با باکتری و نایسین ۱۰ میکروگرم در گرم، تیمار پنیر تلقیح شده با باکتری و نایسین ۲۰ میکروگرم در گرم). پنیرهای توزیع شده با دوز مورد نظر از سوسپانسیون میکروبی (۱۰<sup>۳</sup> cfu/mL)، تلقیح شدند (سوسپانسیون به طور یکنواخت روی سطح پنیرها ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه با اسپاتول استریل، پنیرها به طور یکنواخت مخلوط شدند) (۱، ۴۲). سپس اسانس زنیان با دو غلظت مورد نظر به طور یکنواخت روی دو نمونه جدا از پنیر ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه با اسپاتول استریل، پنیرها به طور یکنواخت مخلوط شدند. در رابطه با نایسین نیز به همین منوال با دو غلظت تهیه شده فرآیند تلقیح روی دو نمونه مجزا، انجام شد.

## آزمون‌ها

نمونه‌ها به مدت ۱۱ روز در دمای °C ۴ نگهداری شدند و آزمون‌های ارزیابی میکروبی، pH و حسی در روز صفر و یک و پس از آن یک روز در میان تا روز ۱۱ انجام گرفت. تمامی

نمونه‌ها در روزهای انجام آزمون، برای هر مشخصه مورد بررسی از جمله ارزیابی بار میکروبی و pH، در سه تکرار آزمون انجام شد و در مورد بررسی هریک از ویژگی‌های حسی از ده ارزیاب جهت نمره‌دهی استفاده شد.

## ارزیابی میکروبی لیستریا مونوسیتوژنز

برای تعیین تعداد باکتری رشد یافته در نمونه‌ها طبق استاندارد ملی ایران، به شماره ۲-۸۰۳۵، میکروبیولوژی زنجیره غذایی - روش جامع جستجو، شناسایی و شمارش لیستریا مونوسیتوژنز و گونه‌های لیستریا قسمت ۲: روش شمارش (۱۴۰۱)، انجام شد (۴۳). پس از توزین آزمون و تهیه سوسپانسیون و رقت‌های اعشاری توسط رقیق‌کننده، کشت سطحی روی محیط لیستریا آگار انجام شد و پلیت‌ها به مدت حدودی ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷، گرمخانه‌گذاری شدند. کلنی‌های آبی - سبز با هاله مات به عنوان لیستریا مونوسیتوژنز در نظر گرفته شدند و تعداد باکتری در هر گرم پنیر محاسبه گردید.

## ارزیابی pH

اندازه‌گیری pH طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، شیر و فراورده‌های آن - تعیین مقدار اسیدیته و pH - روش آزمون (۱۴۰۱) انجام شد (۴۴). دستگاه pH متر مورد استفاده مدل Metrohm 827 بود. پس از تنظیم الکتروود pH متر با محلول‌های بافر، الکتروود به گونه‌ای که حباب حساس آن به طور کامل داخل آزمون (°C ۲۰) قرار گیرد، به داخل پنیر فرو برده شد و عدد دستگاه حداقل پس از ۴۵ ثانیه از گذشت تماس الکتروود با آزمون، خوانده شد.

## آزمون حسی

این آزمون به صورت هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط ۱۰ ارزیاب (۵ مرد و ۵ زن، بین ۲۵ تا ۴۵ سال) انجام شد. آنها پنیرها را از نظر ظاهر و رنگ (۵ امتیاز)، بافت (۵ امتیاز)، بو (۵ امتیاز)، طعم (۵ امتیاز) و پذیرش کلی (۵ امتیاز) مورد بررسی قرار دادند. همچنین به اعضای گروه دستور داده شد که هرگونه نقص یا طعم ناخوشایند را گزارش کنند. لذا مقبولیت کلی نمونه‌های پنیر پیتزا بر اساس صفت اصلی ضریب اهمیت آنها برای ارزیابان و در مقایسه با نمونه‌های شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند (۴۵).

## تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از مدل آماری اندازه‌های تکرار شونده (Repeated Measures) استفاده شد. داده‌های حاصل با روش GLM و اندازه‌گیریهای تکرار تجزیه و تحلیل شدند. برای این کار از نسخه ۱۸ شده نرم افزار آماری SPSS استفاده شد. مدل آماری طرح به صورت زیر می‌باشد

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + E_{ai.k} + B_j + AB_{ij} + EB_{ijk}$$

مورد آزمایش اسانس زنیان با درصدهای متفاوت و نایسین و همچنین نمونه شاهد) به لحاظ تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تفاوت معنی‌داری وجود داشت. همچنین اثرات متقابل افزودنی و تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در طی زمان معنی‌دار بود. همچنین مقدار p-value حاصل شده از آزمون لوین (Levene's Test) تغییرات تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز موجود در پنیر موزارلا بیشتر از سطح معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) نبود (جدول ۳)

جدول ۲ نتایج تجزیه آماری به روش اندازه‌های تکراری (Repeated Measures) بیانگر اثرات بین افزودنی‌های مورد آزمایش (اسانس زنیان با درصدهای متفاوت و نایسین و همچنین نمونه شاهد) به لحاظ تغییرات pH و تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز (Log CFU/g) تلقیح شده روی نمونه‌های پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری را نشان می‌دهد.

در این رابطه،  $Y_{ijk}$  مشاهده مربوط به تیمار  $i$  و زمان اثر تیمار  $j$  در تکرار  $k$ ،  $\mu$  میانگین کل،  $A_i$  اثر تیمار  $i$ ،  $k.E_{ai}$  خطای اصلی (اثر تیمار  $i$  در تکرار  $k$ ) اثر زمان،  $AB_{ij}$  اثر متقابل تیمار  $i$  در زمان  $j$ ، و  $E_{bijk}$  خطای فرعی می‌باشد. جهت بررسی مقادیر کمی و معنی‌داری داده‌ها در پنج گروه و سه تکرار، با توجه به غیر نرمال بودن توزیع داده‌های آزمون‌های حسی از آزمون‌های آماری کروسکال والیس (Kruskal-Wallis test) و آزمون مقایسه‌های چندگانه دان (Dunn's test) استفاده شد. در ضمن سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## • یافته‌ها

جدول ۱ نشان دهنده تغییرات تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز موجود در پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری است. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری (Repeated Measures) در جدول ۲ نشان داده شده است. بین افزودنی‌های

**جدول ۱.** تغییرات میکروبی لیستریا مونوسیتوژنز (Log CFU/g) تلقیح شده روی نمونه‌های پنیر موزارلا تحت تیمارهای مختلف طی ۱۱ روز در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  (داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده‌اند)

تیمارها / زمان (روز)	۰	۱	۳	۵	۷	۹	۱۱
شاهد	$3/55 \pm 0/5$	$7/5 \pm 0/22$	$7/5 <$	$7/5 <$	$7/5 <$	$7/5 <$	$7/5 <$
اسانس ۱ درصد	$3/55 \pm 0/5$	$5/1 \pm 0/80$	$6/53 \pm 0/73$	$6/70 \pm 0/41$	$7/15 \pm 1/02$	$7/22 \pm 1/02$	$8/65 \pm 0/50$
اسانس ۲ درصد	$3/55 \pm 0/5$	$4/8 \pm 0/72$	$6/29 \pm 0/43$	$6/51 \pm 0/53$	$7/03 \pm 0/63$	$7/11 \pm 0/23$	$8/32 \pm 0/82$
نایسین ۱۰ میکروگرم بر گرم	$3/55 \pm 0/5$	$3/76 \pm 0/40$	$7/06 \pm 0/84$	$7/45 \pm 0/40$	$7/60 \pm 0/22$	$7/75 \pm 0/65$	$8/80 \pm 1/03$
نایسین ۲۰ میکروگرم بر گرم	$3/55 \pm 0/5$	$3/65 \pm 0/13$	$6/45 \pm 0/51$	$6/75 \pm 0/12$	$7/25 \pm 0/41$	$7/50 \pm 0/83$	$8/66 \pm 0/93$
p value	۱	۰/۰۰	۰/۰۱	۰/۰۱۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

**جدول ۲.** نتایج تجزیه آماری به روش اندازه‌های تکراری (Repeated Measures)

متغیر	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
لیستریا	۶۸/۶	۱	۶۸/۶	۱۹/۰۶	۰/۰۰۱
لیستریا* افزودنی	۲۴/۴	۱	۲۴/۴	۶/۷۸	۰/۰۲۳
Error	۴۳/۲	۱۲	۳/۶		
pH	۰/۲۴	۱	۰/۲۴۹	۰/۰۲۳	۰/۸۸۳
pH* افزودنی	۰/۱۳۴	۱	۰/۱۳۴	۰/۰۱۲	۰/۹۱۴
Error	۱۳۱/۴۸	۱۲	۱۰/۹۵		

**جدول ۳.** نتایج آزمون لون همگونی واریانس‌ها برای تغییرات pH و تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری

	F	df1	df2	Sig.
pH	۰/۱۸۹	۱	۱۲	۰/۶۷۲
لیستریا	۳/۴۶	۱	۱۲	۰/۰۸۷

### ارزیابی pH

جدول ۴ نشان دهنده تغییرات pH پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری است. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس اندازه‌های تکراری (Repeated Measures) در جدول (۲) نشان داده شده است. بین افزودنی‌های مورد آزمایش (سانس زنیان با درصد‌های متفاوت و نایسین و همچنین نمونه شاهد) به لحاظ تغییرات pH پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت همچنین اثرات متقابل افزودنی و تغییرات pH پنیر موزارلا در طی دوره نگهداری در طی زمان معنی‌دار نبود. همچنین مقدار p-value حاصل شده از آزمون لوین (Levene's Test) تغییرات pH در پنیر موزارلا بیشتر از سطح معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) نبود (جدول ۳).

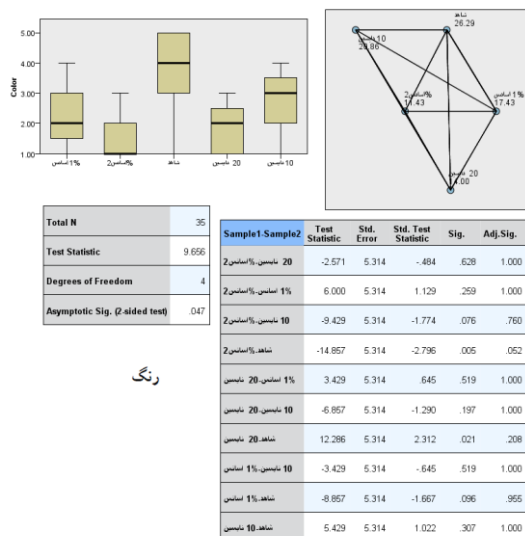
مقادیر pH در غلظت‌های مورد مطالعه اسانس زنیان و نایسین تا روز یازدهم تغییر معنی‌داری نداشت ( $p > 0.05$ ). اسانس ۱ و ۲ درصد زنیان و غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر گرم نایسین در مقایسه با گروه شاهد، تأثیر معنی‌داری بر pH نداشتند. در روز یازدهم نگهداری، کمترین pH مربوط به نایسین ۲۰ میکروگرم بر گرم (۴/۲۰) و بیشترین مقدار pH مربوط به گروه شاهد (۴/۵۵) بود. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و نایسین در طی دوره‌های مختلف تهیه و نگهداری نمونه‌های پنیر موزارلا بر میزان pH بدون تأثیر است. همچنین با افزایش طول دوره مداخله تا روز یازدهم، تأثیر معنی‌داری از اسانس زنیان و نایسین بر میزان pH نمونه‌ها مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

نتایج جدول ۱ نشان دهنده این است که در روز صفر تغییرات معنی‌داری بین اسانس زنیان با درصد‌های متفاوت و نایسین و همچنین نمونه شاهد دیده نشد ( $p > 0.05$ ). با توجه به اثرات متقابل افزودنی و تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز برای هر روز تجزیه تحلیل آماری جداگانه صورت گرفت. استفاده از اسانس زنیان و نایسین موجب کاهش رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نسبت به تغییرات نمونه شاهد شد به طوری که در روز ۱ پایین‌ترین میزان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز متعلق به نمونه حاوی نایسین ۲۰ میکروگرم بر گرم بود که میزان باکتری از ۳/۵۵ به ۳/۶۵ Log CFU/g مشاهده شد و پس از آن مربوط به نمونه حاوی نایسین ۱۰ میکروگرم بر گرم بود که از میزان ۳/۵۵ به ۳/۷۶ Log CFU/g مشاهده شد. همچنین در نمونه حاوی اسانس زنیان ۱٪ میزان باکتری از ۳/۵۵ به ۵/۱ و در نمونه حاوی اسانس زنیان ۲٪ از ۳/۵۵ به ۴/۸ را مشاهده شد و می‌توان گفت که علاوه بر کاهش تعداد باکتری در نمونه‌های پنیر تیمار شده (نسبت به نمونه شاهد)، در نمونه حاوی نایسین کاهش بیشتری را مشاهده شد. در روزهای ۱۱-۳ میزان باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه‌های پنیر تیمار شده (نسبت به نمونه شاهد) کمتر بود ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین میزان رشد باکتری در روز ۱۱ و مربوط به تیمار حاوی اسانس زنیان ۲٪ بود (۸/۳۲ Log CFU/g).

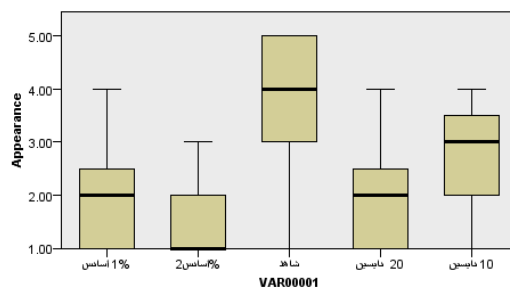
**جدول ۴.** تغییرات pH نمونه‌های پنیر موزارلا تلقیح شده با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تحت تیمارهای مختلف طی ۱۱ روز در دمای ۴ °C داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده اند)

تیمارها / زمان (روز)	۰	۱	۳	۵	۷	۹	۱۱
شاهد	۵/۹ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۸ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۶۴ $\pm$ ۰/۱۱	۴/۷۹ $\pm$ ۰/۱۲	۴/۶۲ $\pm$ ۰/۲۰	۴/۵۸ $\pm$ ۰/۱۶	۴/۵۵ $\pm$ ۰/۲۰
اسانس ۱ درصد	۵/۹ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۷۷ $\pm$ ۰/۱۰	۴/۵۰ $\pm$ ۰/۲۰	۴/۴۳ $\pm$ ۰/۱۹	۴/۴۰ $\pm$ ۰/۱۲	۴/۳۸ $\pm$ ۰/۱۵	۴/۳۰ $\pm$ ۰/۱۲
اسانس ۲ درصد	۵/۹ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۶۵ $\pm$ ۰/۱۰	۴/۴۹ $\pm$ ۰/۱۲	۴/۴۲ $\pm$ ۰/۱۱	۴/۳۳ $\pm$ ۰/۲۱	۴/۳۱ $\pm$ ۰/۱۴	۴/۲۷ $\pm$ ۰/۱۰
نایسین ۱۰ میکروگرم بر گرم	۵/۹ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۶۶ $\pm$ ۰/۲۲	۴/۵۲ $\pm$ ۰/۱۱	۴/۴۰ $\pm$ ۰/۱۴	۴/۴۱ $\pm$ ۰/۳۳	۴/۳۹ $\pm$ ۰/۲۳	۴/۴۳ $\pm$ ۰/۱۳
نایسین ۲۰ میکروگرم بر گرم	۵/۹ $\pm$ ۰/۱۲	۵/۶۴ $\pm$ ۰/۱۴	۴/۴۷ $\pm$ ۰/۴۲	۴/۳۸ $\pm$ ۰/۱۸	۴/۳۵ $\pm$ ۰/۱۳	۴/۳۰ $\pm$ ۰/۱۱	۴/۲۰ $\pm$ ۰/۱۴
P value	۱	۰/۶۴	۰/۵۱	۰/۶۱	۰/۴۱	۰/۳۲	۰/۴۰

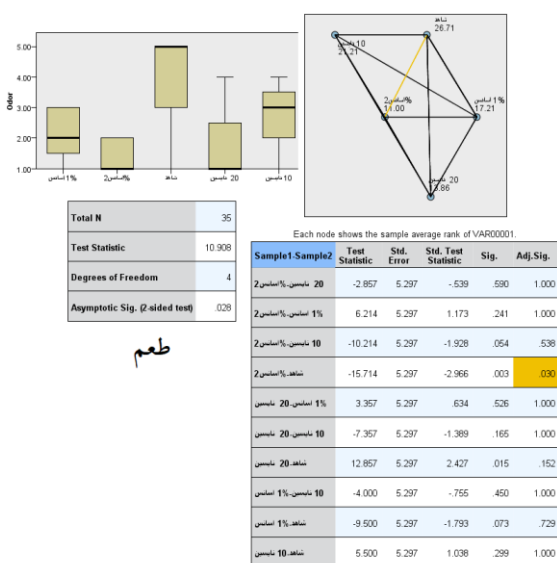
در هر ستون در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌داری می باشد



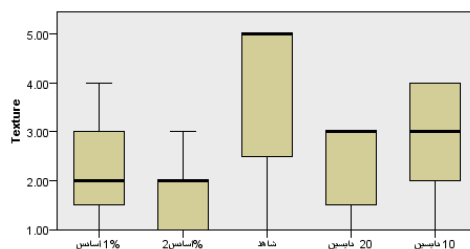
رنگ



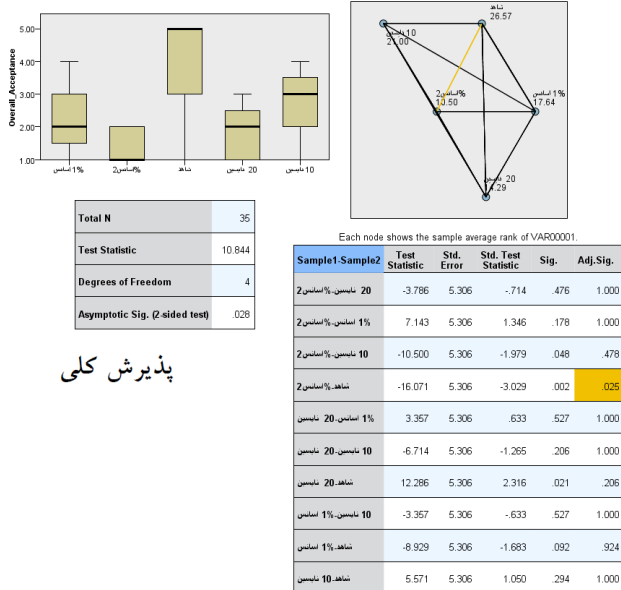
ظاهر



طعم



بافت



پذیرش کلی

شکل ۱. نتایج آنالیز آماری امتیاز ویژگی‌های حسی (ظاهر، طعم، بافت، رنگ و پذیرش کلی) نمونه‌های پنیر موزارلا تلقیح شده با باکتری لیستریا مونوسیتوزنز تحت تیمارهای مختلف طی ۱۱ روز در دمای ۴ °C در سطح ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار

## ارزیابی حسی

شکل ۱ نشان دهنده آزمون‌های حسی انجام شده است. با توجه به روند امتیازدهی در جدول مشاهده می‌شود که حضور اسانس زنیان و نایسین در غلظت‌های مختلف به طور معنی‌داری منجر به بروز ویژگی‌های حسی بهتر یا به عبارتی منجر به تعویق تغییرات نامطلوب ارگانولپتیکی در محصول طی دوره نگهداری در مقایسه با گروه شاهد شده است؛ به گونه‌ای که در روز یازده کم‌ترین امتیاز در تمام ویژگی‌های حسی مربوط به گروه شاهد بود. در این میان گروه تیمار شده با اسانس زنیان ۲ درصد کم‌ترین تغییرات ارگانولپتیک را در طی نگهداری در مقایسه با سایر گروه‌ها از خود نشان داد و در نهایت بیش‌ترین امتیازها را در ویژگی‌های ظاهری، بافت، عطر و پذیرش کلی در روز یازده از آن خود کرد. در مورد رنگ، دو گروه اسانس زنیان ۲ درصد و نایسین ۲۰ امتیازات مشابهی را در اکثر روزهای نگهداری و روز یازده داشتند. با توجه به این نتایج می‌توان گفت که اسانس زنیان ۲ درصد در میان تمام گروه‌ها بهترین ویژگی‌های حسی را در طول دوره نگهداری و روز یازده ارائه داده است.

## • بحث

### ارزیابی میکروبی

از دیر باز اثرات آنتی باکتریایی اسانس‌های گیاهی شناخته شده است و اخیراً توجه زیادی به سوی تأثیر مواد طبیعی بر روی باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد مواد غذایی معطوف شده است. در این راستا بررسی اثرات مواد طبیعی (اسانس زنیان و نایسین) بر روی باکتری غذازاد مانند لیستریا مونوسیتوژنز نشان دهنده تلاش محققان برای جایگزین نمودن نگه‌دارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی می‌باشد. اسانس‌ها گیاهی سبب نفوذ اسانس به غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری غشاء می‌شود و در نتیجه، باعث خروج یون‌ها و محتویات سلولی می‌شوند (۴۶). در مطالعه Hassanshahian و همکاران (۲۰۱۴) اثرات بازدارندگی اسانس زنیان علیه اشیشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. بالاترین مقدار MIC اسانس ۱۰۰ ppm در برابر اشیشیا کلی و بالاترین مقدار MIC برای *K.pneumoniae* 250ppm بود (۴۷). همچنین در مطالعه صادقی و همکاران (۲۰۲۰) اسانس موسیر ۱۰/۲ استفاده شده در پنیر سفید آبیکی در ۶۰ روز نگهداری اثر بازدارندگی روی لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد به این صورت که تعداد باکتری از ۱۹۰۵ cfu/ml به صفر رسید (۴۸). همچنین در مطالعه تهرانی و همکاران (۲۰۱۵) نتایج کشت برای بررسی اسانس نعنا فلفلی بر پنیر سفید شور ایرانی برای تراکم‌های مختلف ۰/۰۳، ۰/۱۵ و ۰/۰۷۵ درصد اسانس نعناع حاکی از

افزایش معنی‌دار ماهیت ضد لیستریا همراه با افزایش اسانس و همچنین تاخیر در رشد یک لگاریتمی در روزهای هفتم و پانزدهم است (۴۹). گواریس و همکاران (۲۰۱۰) در پنیر فتا با EO پونه کوهی را مورد مطالعه قرار دادند که در دوز ۰/۱ میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم، سویه‌های *E.coli* O157:H7 و لیستریا مونوسیتوژنز به ترتیب تا ۲۲ یا ۱۸ روز نگهداری زنده ماندند، در حالی که در دوز ۰/۲ میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم به ترتیب تا ۱۶ یا ۱۴ روز زنده ماندند (۵۰). در مطالعه ای دیگر، حمزه ای و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی تأثیر پوشش ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی اسانس روغنی هل در سطوح مختلف (۰، ۱، ۵/۱ و ۲ درصد) بر ماندگاری پنیر سفید پرداختند (۵۱). نمونه‌ها از نظر تغییرات فیزیکیوشیمیایی، میکروبی و حسی طی ۶۰ روز نگهداری و بررسی شدند. پایین‌ترین جمعیت باکتری کل در روز پایان نگهداری در نمونه پنیر سفید با پوشش حاوی ۲٪ اسانس روغنی هل ۲/۴۳ Log cfu/g بود. در مطالعه ای دیگر، علی محمدزاده و همکاران (۲۰۲۰) اثر ضد میکروبی عصاره الکلی و اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۲/۵ درصد بر برخی از باکتری‌ها (استافیلوکوکوس اورئوس، اشیشیاکلی O157 و لیستریا مونوسیتوژنز) و کپک‌ها (کپک‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر و همچنین شمارش کلی کپک و مخمر) در پنیر لاکتیکی را بررسی کردند (۵۲). همچنین تأثیر این نگهدارنده‌های طبیعی بر شمارش کلی باکتری‌های لاکتیکی و ویژگی‌های حسی پنیر نیز مطالعه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس و عصاره این گیاه قادر است رشد میکروبی را به تأخیر بیندازد. زیره سیاه اثر مهاری خوبی بر میکروبی‌های مورد مطالعه در پنیر لاکتیکی نشان داد و فعالیت ضدمیکروبی اسانس در مقایسه با عصاره بیشتر بود به طوری که در پایان دوره آزمایش، نمونه‌های حاوی یک درصد اسانس در پنیر لاکتیکی کمترین شمارش میکروبی‌های هدف را دارا بودند. مقایسه تأثیر اسانس و عصاره زیره بر رشد میکروبی‌های مورد مطالعه نشان داد که تیمارهای مورد مطالعه تأثیر بیشتری بر کنترل رشد کپک آسپرژیلوس فلاووس و اشیشیاکلی در پنیر لاکتیکی نشان دادند. در خصوص باکتری‌های لاکتیکی، با افزایش دوره نگهداری تعداد باکتری‌ها در نمونه‌های پنیر کاهش یافت که این کاهش در تیمار شاهد بیشتر بود. شمارش باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در نمونه شاهد  $10^9 \times 1/4$  Log cfu/g بود. در حالی که این شمارش برای نمونه‌های حاوی اسانس ۱ درصد و عصاره ۱ درصد به ترتیب  $10^6 \times 2/2$  و  $10^5 \times 2/6$  Log cfu/g بود. محمودی و همکاران (۲۰۱۱)، فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه کوهی و باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر رشد

ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی، عملکردی، میکروبی و کاهش انواع آلاینده‌ها و باقیمانده‌ها، مورد مطالعه قرار می‌گیرد در نهایت باید از منظر ویژگی‌های حسی نیز اثر آن تیمار بر روی ماده غذایی بررسی شود زیرا این ویژگی، پس از بسته‌بندی، اولین چیزی است که نظر مشتری را جلب می‌کند. حضور اسانس زنیان و نایسین در غلظت‌های مختلف به طور معنی‌داری منجر به بروز ویژگی‌های حسی بهتر یا به عبارتی منجر به تعویق تغییرات نامطلوب ارگانولپتیک در محصول طی دوره نگهداری در مقایسه با گروه شاهد شده است؛ به گونه‌ای که در روز ۱۱ کم‌ترین امتیاز در تمام ویژگی‌های حسی مربوط به گروه شاهد بود؛ علت این امر را شاید بتوان کاهش سرعت رشد باکتری در اثر حضور اسانس زنیان و نایسین و در نتیجه عدم بروز تغییرات نامطلوب حسی ناشی از فعالیت باکتری دانست. مطلوب بودن نمونه‌های حاوی درصد بالاتری از اسانس در مطالعات مشابه نیز دیده شده است. در مطالعه انجام شده توسط روشنی و همکاران (۱۳۹۴)، پنیر موزارلا با اسانس آویشن (در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۳ و ۰/۰۵ درصد) جهت بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و کاهش بار میکروبی، تیمار شد و نتایج حسی نشان داد که بیش‌ترین امتیاز عطر و طعم، که به عنوان مهم‌ترین پارامترها در ارزیابی پنیر موزارلا بیان شد، مربوط به اسانس آویشن با غلظت ۰/۰۵ درصد بود (۴۵). همچنین در مطالعه انجام شده توسط عزیزخانی و همکاران (۱۳۹۵)، مشخص شد که در تیمار پنیر سفید ایرانی با اسانس‌های ریحان (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد) و مریم گلی (۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ درصد)، بیش‌ترین پذیرش از نظر ویژگی‌های حسی مربوط به اسانس ۰/۷۵ و ۱ درصد ریحان بود؛ این مطالعه نشان می‌دهد علاوه بر غلظت اسانس نوع اسانس نیز در ویژگی حسی محصول تأثیرگذار است (۳۸). البته در مطالعه انجام شده توسط Ahmed و همکاران (۲۰۲۱) غلظت ۰/۰۵ درصد اسانس‌های زنجبیل، میخک و آویشن مورد استفاده در پنیر نرم، با آنکه از نظر ویژگی بافت و رنگ با غلظت ۰/۰۱ درصد این اسانس‌ها در پنیر تفاوت چندانی نداشتند اما در مورد طعم و پذیرش کلی گروه غلظت ۰/۰۱ امتیاز بیش‌تری را بدست آورد و گفته شد که نمونه‌های حاوی ۰/۰۵ درصد اسانس دارای طعمی قوی و مزه تلخ بودند (۵۴). این امر شاید به دلیل متغییر بودن ذائقه متفاوت افراد در کشورهای مختلف با فرهنگ‌های غذایی مختلف و یا متغییر بودن طعم و مزه اسانس‌های مختلف با غلظت‌های متفاوت باشد؛ از این رو این امر را باید در نظر گرفت که اسانس‌ها صرفاً باید در حداقل غلظت مؤثره در ایجاد اثرات ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرند و مصرف بیش از حد آن‌ها هم می‌تواند اثرات ارگانولپتیک نامطلوب را به دنبال داشته باشد (۴۵، ۵۴) و هم از طرفی خود این اسانس‌های

لیستریا مونوسیتوژنز در روند تولید، رسیدن و نگهداری پنیر سفید ایرانی را بررسی کردند (۵۳). نتایج نشان داد که اسانس پونه کوهی در دو غلظت ۰/۱۵ و ۰/۰۳ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک از بالاترین تأثیر بر رشد لیستریا مونوسیتوژنز برخوردار بوده است. همچنین بهترین غلظت اسانس از نظر ممانعت از رشد لیستریا مونوسیتوژنز و تولید پنیر با خواص طعمی مطلوب غلظت ۰/۱۵ درصد در تیمار توام با پروبیوتیک بود.

### ارزیابی pH

در این مطالعه نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH فقدان تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان و ترکیب ضد میکروبی نایسین بر رشد و فعالیت باکتری‌های آغازگر مولد اسید لاکتیک، در کنار اثر مهارکنندگی آن‌ها بر باکتری پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد. مطالعه صادقی و همکاران (۲۰۲۰) اسانس کندر و موسیر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در پنیر سفید آب نمکی بود که نتایج حاصل از ارزیابی pH در مراحل مختلف تهیه و نگهداری نمونه‌ها نشان دهنده فقدان تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس کندر و موسیر بر میزان pH است. اما با افزایش طول دوره نگهداری تا روز ۶۰ شاهد کاهش pH در تمام نمونه‌ها به صورت معنی‌دار مشاهده شد ( $p \text{ value} < 0.05$ ). در مطالعه دیگر توسط احسانی و همکاران (۲۰۱۱) اسانس موسیر و بادیان در فرمولاسیون پنیر سفید آب نمکی استفاده شد که پنیرهای حاوی اسانس در مقایسه با گروه شاهد تغییر معنی‌داری نداشتند ( $p \text{ value} > 0.05$ ). در مطالعه حمزه ای و همکاران (۲۰۲۲) که به بررسی تأثیر پوشش ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی اسانس روغنی هل در سطوح مختلف (۰، ۱، ۵/۱ و ۲٪) بر ماندگاری پنیر سفید پرداختند (۵۱)، بررسی تغییرات pH نتایج نشان داد که pH تمام نمونه‌ها در طی مدت نگهداری به طور معنی‌داری کاهش یافت. در مطالعه محمودی و مکاران (۲۰۱۱) که بررسی تأثیر اسانس پونه کوهی همراه با باکتری پروبیوتیک بر ماندگاری پنیر سفید ایرانی پرداختند، نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH پنیر در مراحل مختلف تهیه و نگهداری آن نشان دهنده فقدان تأثیر اسانس پونه کوهی بود. به گونه‌ای که تغییرات pH در طی تولید پنیرها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی در دوره‌های زمانی مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد.

### ارزیابی حسی

ویژگی‌های حسی از جمله عوامل مهم در میزان پذیرش و خریداری یک محصول محسوب می‌شوند؛ از این رو انواع تیمارهای مختلف جدید که روی مواد غذایی جهت تغییر انواع

اسانس زنیان ۲ و ۱ درصد و نایسین ۱۰ و ۲۰ میکرو گرم بر گرم بر لیستریا مونوسیوتوژنز در پنیر موزارلا در طی ۱۱ روز نگهداری در دمای °C ۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج میکروبی و pH که تفاوت معنی داری در طی دوره نگهداری (از روز سوم تا روز ۱۱ برای ارزیابی میکروبی) در میان گروه‌های تیمار شده دیده نشد، اسانس زنیان ۲ درصد می‌تواند گزینه مناسبی جهت کاهش بار میکروبی لیستریا مونوسیوتوژنز در کنار عدم تغییر معنی دار pH و خواص حسی محصول در طی دوره نگهداری ۱۱ روزه، باشد. اسانس زنیان به عنوان یک ماده ضد میکروبی طبیعی می‌تواند با کاهش بار میکروبی و جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر در پنیر موزارلا، به بهبود ایمنی آن کمک کند. نایسین نیز به عنوان یک پپتید ضد باکتری عمل می‌کند و ترکیب آن با اسانس زنیان می‌تواند اثرات سینرژیک داشته باشد، که در نتیجه، حفاظت بیشتری در برابر آلودگی‌های میکروبی و افزایش ماندگاری پنیر را به همراه دارد. نتایج این مطالعات در مقایسه با سایر مطالعات نیز نشان دادند که اثر سینرژیستی بین استفاده از اسانس/عصاره و سایر افزودنی‌ها مانند نایسین در مقایسه با تیمار کنترل و تیمارهای دارای اسانس و فاقد نایسین، معنی دار بود که این بیانگر تاثیر مهاری اسانس و نایسین بر روی لیستریا مونوسیوتوژنز بوده و در صورت به کارگیری به همراه با نایسین می‌توان از غلظت‌های پایین تری از اسانس برای اثر مهاری مشهود، استفاده کرد.

**ملاحظات اخلاقی:** نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل رضایت آگاهانه (در صورتی که مطالعه بر روی نمونه‌های انسانی انجام شده است)، حسن رفتار (در صورتی که مطالعه بر روی نمونه‌های انسانی یا حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است)، عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

گیاهی می‌توانند دارای ترکیبات بالقوه سمی برای انسان باشند که در صورت مصرف به مقدار زیاد در طولانی مدت ممکن است مشکلاتی را برای فرد مصرف‌کننده ایجاد کنند (۵۵-۵۷). در مطالعه حمزه ای و همکاران (۲۰۲۲) نتایج ارزیابی حسی نشان داد که پوشش خوراکی ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی ۵/۱٪ اسانس روغنی هل خصوصیات حسی مطلوب‌تری نسبت به سایر پوشش‌ها برای نمونه‌های پنیر سفید داشت. با توجه به نتایج ارزیابی حسی نمونه‌های پنیر تیمار شده با اسانس و عصاره زیره سیاه در مطالعه علی محمد زاده و همکاران (۲۰۲۰)، بیشترین امتیاز رنگ مربوط به تیمارهای شاهد بود و با افزایش میزان عصاره زیره سیاه در فرمولاسیون پنیرها امتیاز رنگ کاهش یافت. بیشترین امتیاز بو مربوط به تیمار ۰/۵ درصد اسانس زیره در پنیر الکتیکی بوده و کمترین امتیاز نیز به پنیر معمولی حاوی ۲/۵ درصد اسانس زیره تعلق داشت. پنیر الکتیکی حاوی ۰/۵ درصد عصاره زیره و پنیر معمولی و الکتیکی حاوی ۲/۵ درصد اسانس زیره به ترتیب بیشترین و کمترین امتیازات پذیرش کلی را دریافت کردند. در مطالعه محمودی و مکاران (۲۰۱۱) که بررسی تاثیر اسانس پونه کوهی همراه با باکتری پروبیوتیک بر ماندگاری پنیر سفید ایرانی پرداختند، غلظت ۰/۰۱۵ درصد اسانس در ترکیب با پروبیوتیک بهترین تیمار از لحاظ خصوصیات حسی بود.

از جمله کاستی‌های مطالعه حاضر مهیا نبودن شرایط بررسی تعداد نمونه بیشتر و آزمون روی سایر پاتوژن‌های غذایی و همچنین مقایسه برخی دیگر از نگهدارنده‌های مواد غذایی بود.

### نتیجه گیری

مطالعات مختلف نشان دادند که بیشترین میزان آلودگی لبنیات به لیستریا مونوسیوتوژنز در شیر خام و پنیر بوده است. در این مطالعه اثر ضد میکروبی، شیمیایی و خواص حسی

### References

1. Tirloni E, Bernardi C, Stella S. Use of food grade acetic organic acid to prevent *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese. *LWT*. 2022;165:113750.
2. Ewida RM, Hasan WS, Elfaruk MS, Alayouni RR, Hammam AR, Kamel DG. Occurrence of *Listeria* spp. in soft cheese and ice cream: Effect of probiotic *Bifidobacterium* spp. on survival of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Foods*. 2022;11(21):3443.
3. Falardeau J, Trmčić A, Wang S. The occurrence, growth, and biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fresh and surface-ripened soft and semisoft cheeses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(4):4019-48.
4. Tirloni E, Bernardi C, Rosshaug PS, Stella S. Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(6):4913-24.
5. Prezzi LE, Lee SH, Nunes VM, Corassin CH, Pimentel TC, Rocha RS, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a probiotic Minas Frescal cheese. *Food Microbiology*. 2020;92:103557.
6. Kazemeini H, Azizian A, Adib H. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in turkey fillets by alginate edible coating with *Trachyspermum ammi* essential oil nano-emulsion. *International journal of food microbiology*. 2021;344:109104.

7. Panebianco F, Giarratana F, Caridi A, Sidari R, De Bruno A, Giuffrida A. Lactic acid bacteria isolated from traditional Italian dairy products: Activity against *Listeria monocytogenes* and modelling of microbial competition in soft cheese. *Lwt*. 2021;137:110446.
8. Khedmati Morasa H, Mahmoudi R, Ghajarbeygi P, Mosavi S, Shahsavari S, Abbasi N, et al. *Listeria monocytogenes* Contamination in Unpasteurized Traditional Cheese Products in Qazvin, Iran. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2019;29(178):115-26.
9. Kiyangpour Berjoe R, Momtaz H, Lotfollahi L, Bamzaheh Z. Detection and antibiotic resistance pattern of *Listeria monocytogenes* strains isolated from curd and cheese. *Journal of Food Microbiology*. 2022;9(4):18-29.
10. Wemmenhove E, Wells-Bennik M, Zwietering M. A model to predict the fate of *Listeria monocytogenes* in different cheese types—A major role for undissociated lactic acid in addition to pH, water activity, and temperature. *International journal of food microbiology*. 2021;357:109350.
11. Martinez-Rios V, Dalgaard P. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*. 2018;84:205-14.
12. Rutigliano M, Albenzio M, Sevi A, Di Luccia A, la Gatta B. High moisture mozzarella cheese features and detection of commercial frauds: A review. *International Dairy Journal*. 2025;163:106179.
13. Tremonte P, Nazzaro F, Coppola R. *Mozzarella Cheese*. *Dairy Foods Processing*: Springer; 2024. p. 31-54.
14. Ye C-W, Gao J, Yang C, Liu X-J, Li X-J, Pan S-Y. Development and application of an SPME/GC method for the determination of trace phthalates in beer using a calix [6] arene fiber. *Analytica chimica acta*. 2009;641(1):64-74.
15. Murru N, Peruzy MF, De Carlo E, Mercogliano R, Aponte M, Morena C, et al. *Listeria monocytogenes* survival during production and storage of water buffalo Mozzarella cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2018;71(2):356-61.
16. Gérard A, El-Hajjaji S, Niyonzima E, Daube G, Sindic M. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. *International Journal of Dairy Technology*. 2018;71(4):825-43.
17. Greco S, Tolli R, Bossù T, Rodas EMF, Di Gamberardino F, Di Sirio A, et al. Case of contamination by *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese. *Italian journal of food safety*. 2014;3(1).
18. Gonçalves MC, Cardarelli HR. Mozzarella cheese stretching: a minireview. *Food Technology and Biotechnology*. 2021;59(1):82-91.
19. Polat Yemiş G, Sezer E, Sıçramaz H. Inhibitory effect of sodium alginate nanoemulsion coating containing myrtle essential oil (*Myrtus communis* L.) on *Listeria monocytogenes* in Kasar cheese. *Molecules*. 2022;27(21):7298.
20. de Sousa DP, Damasceno ROS, Amorati R, Elshabrawy HA, de Castro RD, Bezerra DP, et al. Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. *Biomolecules*. 2023;13(7):1144.
21. Falleh H, Jemaa MB, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*. 2020;330:127268.
22. Baptista-Silva S, Borges S, Ramos OL, Pintado M, Sarmiento B. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*. 2020;32(4):279-95.
23. Javan AJ, Salimiraad S, Khorshidpour B, editors. Combined effect of *Trachyspermum ammi* essential oil and propolis ethanolic extract on some foodborne pathogenic bacteria. *Veterinary Research Forum*; 2019: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
24. Hashemi SMB, Jafarpour D, Gholamhosseinpour A. Antimicrobial activity of *Carum copticum* and *Satureja khuzestanica* essential oils and acetic acid in vapor phase at different relative humidities and temperatures in peanuts. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2022;46(2):e16269.
25. Hejazi M, Zareshahrabadi Z, Ashayeri S, Saharkhiz MJ, Iraj A, Alishahi M, et al. Research Article Characterization and Physical and Biological Properties of Tissue Conditioner Incorporated with *Carum copticum* L. 2021.
26. Dutta S, Kundu A, Saha S, Prabhakaran P, Mandal A. Characterization, antifungal properties and in silico modelling perspectives of *Trachyspermum ammi* essential oil. *Lwt*. 2020;131:109786.
27. Hosseini SM, Behbahani M. Enhancement of probiotics viability and lactic acid production in yogurts treated with *Prangos ferulaceae* and *Carum copticum* plant extracts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2021;35:102084.
28. Maroufi LY, Shahabi N, Fallah AA, Mahmoudi E, Al-Musawi MH, Ghorbani M. Soy protein isolate/kappa-carrageenan/cellulose nanofibrils composite film incorporated with zenian essential oil-loaded MOFs for food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;250:126176.
29. Freitas PA, Silva R, De Oliveira T, Soares R, Soares N. Biodegradable film development by nisin Z addition into hydroxypropylmethylcellulose matrix for mozzarella cheese preservation. *International Journal of Food Studies*. 2020;9:360-72.
30. Wu M, Ma Y, Dou X, Aslam MZ, Liu Y, Xia X, et al. A review of potential antibacterial activities of nisin against *Listeria monocytogenes*: the combined use of nisin shows more advantages than single use. *Food Research International*. 2022;112363.
31. Ibarra-Sánchez LA, El-Haddad N, Mahmoud D, Miller MJ, Karam L. Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of dairy science*. 2020;103(3):2041-52.
32. Azizi M, Jahanbin K, Shariatifar N. Evaluation of whey protein coating containing nanoliposome dill (*Anethum graveolens* L.) essential oil on microbial, physicochemical and sensory changes of rainbow trout fish. *Food Chemistry: X*. 2024;21:101110.
33. Shabani M, Ghorbani-HasanSaraei A, Shariatifar N, Savadkoohi F, Shahidi S-A. Effect of *Urtica dioica* L. Essential oil (forms of free and nanoliposome) on some inoculated pathogens (*Escherichia coli* and *Listeria*

- monocytogenes) in minced camel meat. *Food Chemistry*: X. 2023;20:101050.
34. Zomorodian N, Javanshir S, Shariatifar N, Rostamnia S. The effect of essential oil of *Zataria multiflora* incorporated chitosan (free form and Pickering emulsion) on microbial, chemical and sensory characteristics in salmon (*Salmo trutta*). *Food Chemistry*: X. 2023;20:100999.
  35. Chatterjee S, Jain A, De S. Effect of different operating conditions in cloud point assisted extraction of thymol from Ajwain (*Trachyspermum Ammi L.*) seeds and recovery using solvent. *Journal of food science and technology*. 2017;54:4353-61.
  36. Quoc L. Restrictions of the Extraction Process and Bioactivities of *Trachyspermum ammi* Seed Extract. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*. 2022;29(6):173-5.
  37. Solomakos N, Govaris A, Koidis P, Botsoglou N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food microbiology*. 2008;25(1):120-7.
  38. Azizkhani M, Tooryan F, Boreiry M. Effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia sclarea* essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2016;12(2):286-95.
  39. INSO. (Iran National Standards Organization). Milk and milk products-Pizza processed cheese - Specifications and test methods - No. 13526. 2019.
  40. INSO. (Iran National Standards Organization). Pizza topping - Specifications and test methods - No. 15696. 2019.
  41. INSO. (Iran National Standards Organization). Milk and milk products\_mozzarella cheese(pizza cheese) - Specifications and test methods - No. 4658. 2011.
  42. Han JH, Patel D, Kim JE, Min SC. Retardation of *Listeria monocytogenes* growth in mozzarella cheese using antimicrobial sachets containing rosemary oil and thyme oil. *J Food Sci*. 2014;79(11):E2272-8.
  43. INSO. (Iran National Standards Organization). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part : 2 Enumeration method -No. 8035-2. 2022.
  44. INSO. (Iran National Standards Organization). Milk and milk products - Determination of titrable acidity and pH - Test method - No. 2852. 2022.
  45. Roshani S, Gohari Ardebili A, Arianfar A. Investigation on antimicrobial and antioxidant effects of *Thymus vulgaris* on mozzarella cheese. *Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2015;4(3):233-46.
  46. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004;94(3):223-53.
  47. Hassanshahian M, Bayat Z, Saeidi S, Shiri Y. Antimicrobial activity of *Trachyspermum ammi* essential oil against human bacterial. 2014.
  48. Sadeghi F, Nateghi L. Investigating the sensory properties and antimicrobial effect of frankincense and shallots essential oil on *Listeria monocytogenes* bacteria in white brined cheese. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2020;16(4):343-56.
  49. Tehrani F, Sadeghi E. Effect of mint essential oil on growth of *Listeria monocytogenes* during the ripening and storage of Iranian white brined cheese. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 2015;5:150-4.
  50. Govaris A, Botsoglou E, Sergelidis D, Chatzopoulou PS. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT-Food Science and Technology*. 2011;44(4):1240-4.
  51. Hamzei S, Khezerlou A, Ehsani A. Effect of whey protein isolate coating with cardamom essential oil on shelf life of white cheese. *Journal of food science and technology(Iran)*. 2022;19(127):267-80.
  52. Mahmoudi Razzaq, Ehsani Paharabad Ali, le Tadjik Hossein, Akhundzadeh Basti Afshin et Khosrowshahi Asl Asghar. "Effet antimicrobien de l'huile essentielle d'origan et de *Lactobacillus casei* sur *Staphylococcus aureus* dans le fromage blanc iranien." (2010) : 147-161.[in persian]
  53. Ahmed LI, Ibrahim N, Abdel-Salam AB, Fahim KM. Potential application of ginger, clove and thyme essential oils to improve soft cheese microbial safety and sensory characteristics. *Food Bioscience*. 2021;42:101177.
  54. Fuentes C, Fuentes A, Barat JM, Ruiz MJ. Relevant essential oil components: a minireview on increasing applications and potential toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2021;31(8):559-65.
  55. Jain N, Sharma M, Joshi S, Kaushik U. Chemical Composition, Toxicity and Antidermatophytic Activity of Essential Oil of *Trachyspermum ammi*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;80(1).
  56. Vazirian M, Hekmati D, Ostad S, Manayi A. Toxicity evaluation of essential oil of *Trachyspermum ammi* in acute and sub-chronic toxicity experiments. *Journal of Medicinal Plants*. 2019;18(69):70-7.

## Investigating the Antimicrobial Effect of Zenian Essential Oil and Nisin on *Listeria Monocytogenes* Bacteria Inoculated on Mozzarella Cheese (Pizza Cheese) and Changing its Chemical and Sensory Parameters

Ghaibi<sup>1</sup> N, Mohamadi B<sup>1</sup>, Velayati N<sup>1</sup>, Abdolshahi A<sup>2</sup>, Shariatifar N<sup>\*3</sup>

1. Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Food Safety Research Center (Salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

3- \*Corresponding author: Food Safety Research Center (Salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.  
Email: nshariatifar@ut.ac.ir

Received 6 Jan, 2025

Accepted 25 Aug, 2025

**Background & Objectives:** One of the most widely consumed dairy products is mozzarella cheese, which has a high probability of growing food pathogens such as *Listeria monocytogenes*, and its storage methods are of great importance. The purpose of investigate the antimicrobial effect of zenian essential oil and nisin on *L. monocytogenes* inoculated on mozzarella cheese and change its chemical and sensory parameters.

**Materials & Methods:** After preparing zenian essential oil and nisin, microbial test (*L.monocytogenes* evaluation), chemical test (pH) and sensory evaluation (appearance, texture, color, aroma and general acceptance test) were performed.

**Results:** The results showed that zenian essential oil and nisin reduced the number of *Listeria monocytogenes* in treated cheese samples (compared to the control sample). On days 3-11 of storage, the amount of *Listeria monocytogenes* in the treated cheese sample (compared to the control sample) was significantly different (p value < 0.05), so that the lowest bacterial growth rate was on day 11 and related to the treatment containing 2% zenian essential oil (8.32 log CFU/g). The results of the pH showed that the concentrations of zenian essential oil and nisin had no significant effect on the pH during the storage period. In the sensory properties, the highest score in all days was related to 2% essential oil and it had a significant difference with the control sample.

**Conclusion:** It can be said that although the treatments did not differ significantly from each other in terms of the reduction of microbial load and pH changes, considering the sensory properties, it can be concluded that the use of zenian essential oil 2% can be a suitable option to improve the safety of mozzarella cheese and maintain its sensory properties.

**Keywords:** pH test, Sensory evaluation, Microbial test, Food pathogen, Food shelf life extension