

تأثیر اسانس گیاه چویر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در طی تولید و نگهداری

پنیر سفید ایرانی

محمدجواد داردرفشی¹، غلامرضا بهرامی²، احسان صادقی³، معصومه خان احمدی⁴، میترا محمدی⁵، رضا محمدی⁶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، سمنان، ایران

۲- استاد گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران

۳- نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات عوامل محیطی مؤثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران
پست الکترونیکی: ehsan.sadeghi59@yahoo.com

۴- مربی گروه شیمی، جهاد دانشگاهی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران

۶- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/7/20

تاریخ پذیرش: 92/10/15

چکیده

سابقه و هدف: افزایش سطح آگاهی مردم و نگرانی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی، کاربرد مواد نگهدارنده و ضد میکروبی گیاهی را افزایش داده است. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثرات ضد میکروبی اسانس چویر در محصولات لبنی انجام نشده است. این مطالعه با هدف تعیین تأثیر اسانس گیاه چویر بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس در روند تولید پنیر سفید ایرانی با روش پله‌ای - مانعی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از جمع‌آوری گیاه چویر از کوه‌های دالاهو کرمانشاه، اقدام به اسانس‌گیری با استفاده از روش تقطیر با بخار آب و شناسایی اجزای آن به کمک دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی گردید. فعالیت ضد باکتریایی گیاه مذکور در غلظت‌های 0/0075%، 0/015% و 0/03% اسانس مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS انجام شد.

یافته‌ها: آنالیز شیمیایی اسانس منجر به شناسایی 60 ترکیب با مجموع 96/84% شد که بیشترین ترکیب تشکیل دهنده آن سیس - اسایمن بود. غلظت‌های 0/015% و 0/03% به طور معناداری مانع از رشد باکتری در طی مدت نگهداری گردید ($P < 0/01$) اما در غلظت 0/0075 درصد تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/01$). جمعیت باکتری در نمونه‌های نگهداری شده در زمان ماند بالا کاهش بیشتری از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد اسانس چویر در غلظت‌های بالا از فعالیت ضد میکروبی بالایی برخوردار است، از این رو در کنترل مسمومیت‌های استافیلوکوکی می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس چویر، پنیرسفید، استافیلوکوک اورئوس، اثر ضد باکتریایی

• مقدمه

از مصرف غذا و آب آلوده از دست می‌دهند (2). باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در زمره عوامل مهم بیماری‌زای دخیل در مسمومیت‌های غذایی محسوب می‌شود که پس از سالمونلا و کلستریدیوم پرفرینژنس در جایگاه سوم قرار دارد (3) و مسئول یک سوم کل مسمومیت‌های غذایی در آمریکا است (4). شاپان ذکر است 15 تا 80 درصد سویه استافیلوکوک قادر به تولید انتروتوکسین می‌باشد.

امروزه علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در صنعت مواد غذایی صورت گرفته بیماری‌های ناشی از آلودگی میکروبی مواد غذایی بصورت مشکلی اساسی بروز نموده به گونه‌ای که حتی در کشورهای پیشرفته 30 درصد مردم یک بار در سال به بیماری‌های ناشی از مصرف غذای آلوده مبتلا می‌شوند (1). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت سالانه 9 میلیون نفر در جهان جان خود را بر اثر مسمومیت‌های ناشی

می‌گردد (13). هم‌چنین در طب محلی جهت کاهش قند خون و به عنوان چاشنی غذایی استعمال می‌شود (14). از آنجا که آلودگی استافیلوکوکی یکی از مشکلات مهم میکروبیولوژیکی پنیر سفید است و با توجه به اهمیت گیاهان دارویی بومی هر منطقه و هم‌چنین با در نظر گرفتن بروز مقاومت‌های باکتریایی، در این تحقیق خواص ضد باکتریایی اسانس گیاه چویر در پنیر سفید ایرانی مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

تهیه باکتری: باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538 از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و آزمایش‌های تأییدی حساسیت به لیزواستافین، کواگولاز و ترمونوکلئاز مقاوم به حرارت روی آن انجام گرفت. جهت نزدیک شدن تعداد باکتری به دز تلقیح، باکتری لیوفلیزه در محیط آبگوشت با دمای 37°C به مدت 18-16 ساعت و حداقل در 2 مرتبه متوالی کشت داده شد. سپس به نسبت 1 به 5 با گلیسرین استریل مخلوط گردید. در گام بعدی، ماده فوق الذکر در حجم‌های 500 میکرو لیتری در میکروتیوب‌های اپندورف در دمای 20°C نگهداری و جهت انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (15).

نمونه گیاهی: پس از جمع آوری گیاه چویر در فصل تابستان از کوه‌های دالاهو استان کرمانشاه و تأیید علمی پژوهشکده گیاهان دارویی ایران، تهیه اسانس از برگ تازه گیاه با استفاده از روش Hydro distillation آغاز گردید.

استخراج اسانس: مقدار 100 گرم برگ تازه گیاه چویر پس از خشک شدن و خرد کردن در پژوهشکده گیاهان دارویی، با روش Hydro distillation و با دستگاه کلونجر-Clevenger (type apparatus 1928) به مدت 3 ساعت اسانس گیری شد. برگ تازه جهت خشک شدن کامل با دی اتیل اتر مخلوط و کاملاً به هم زده شد. پس از تشکیل لایه اتری و اسانس به صورت دو فاز جداگانه، فاز اتری جدا گردید و فاز دوم حاوی اسانس با بازده 82/2 درصد جدا شد. اسانس حاصل به وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی موجود در پژوهشکده گیاهان دارویی مورد آنالیز قرار گرفت. برای شناسایی اجزای اسانس از بانک اطلاعات جرمی، زمان بارداری (اندیس کوئانس)، مطالعه جرم‌های هر یک از اجزای اسانس، مقایسه آن با طیف‌ها و

انترتوکسین استافیلوکوک مقاوم به حرارت است به طوری- که ماده غذایی آلوده حتی پس از حرارت‌دهی نیز پتانسیل ایجاد بیماری گاستروانتریت را دارا می‌باشد (6، 5). از این رو، توجه به ایمنی مواد غذایی و آرایه راهکارهایی جهت حفظ آن از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است. با توجه به توزیع گسترده استافیلوکوک اورئوس در مواد غذایی و عدم امکان حذف کامل آن از غذا، در سال‌های اخیر تلاش‌هایی جهت یافتن ماده نگهدارنده مناسب به منظور جلوگیری از رشد این نوع باکتری صورت گرفته است (7). افزایش سطح آگاهی مردم و نگرانی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی از قبیل سرطان‌زایی و سمیت، کاربرد مواد نگهدارنده و ضد میکربی طبیعی و گیاهی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را افزایش داده است. استفاده از ترکیبات ضد باکتریایی گیاهی، به عنوان راهکاری مناسب در راستای کنترل باکتری-های بیماری‌زا و افزایش ماندگاری مواد غذایی مطرح می‌باشد. اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در بسیاری از مطالعه‌ها تأیید شده است (8، 1). مکانیسم اثر اسانس‌های گیاهی به دلیل خاصیت آبرگری آن‌ها می‌باشد بدین صورت که با ورود به قسمت چربی غشاء سلولی و افزایش خروج ترکیبات سلولی به خارج سلول سبب اختلال در ساختمان آنها می‌گردند. این عمل در سطح محدودی قابل تحمل و بیش از آن مرگ باکتری را به دنبال خواهد داشت. اسانس‌ها هم‌چنین بر عملکرد آنزیم‌ها و سنتز ترکیبات ساختمانی سلولی نیز مؤثرند (9-11). با عنایت به مطالب گفته شده، در این مطالعه کوشش بر بررسی اثر اسانس گیاه چویر در غلظت‌های متفاوت بر روی باکتری بیماری‌زای مهم با منشا غذایی (استافیلوکوکوس اورئوس) شده است. گیاه چویر با نام علمی *Ferulago* از خانواده چتریان، گیاهی است چندساله، ساقه بلند به رنگ سبز کاهوئی، با میوه زرد رنگ به طول 3-5 میلی متر و دارای 35-40 گونه می‌باشد. سه گونه از هفت گونه‌ای که در ایران رویش دارند از جمله *Ferulago angulata* بومی ایران هستند. قابل ذکر است این گیاه فقط در کرمانشاه، دالاهو، اسلام آباد غرب و منطقه ورمنجه کرمانشاه مشاهده می‌شود. هم‌چنین مشخص گردیده است چویر دارای ویژگی آنتی اکسیدانی می‌باشد و نیز این گیاه به طور سنتی جهت حفاظت مواد غذایی و ایجاد طعم مطلوب در غذا بکار می‌رود (12). چویر به عنوان منبع طبیعی مونوترپن‌ها و سس کوبی‌ترین‌ها که دارای خاصیت ضد میکربی می‌باشند قلمداد

نمونه شاهد نیز صورت گرفت. سرانجام شمارش *S.aureus* براساس روش APHA با استفاده از Baird-Parker Agar انجام گردید (19). لازم به ذکر است pH با استفاده از pH متر مدل Corning 220 در غلظت‌های مختلف مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. تمامی آزمایشات با 3 مرتبه تکرار انجام شده و تأثیرات اصلی اسانس روی *S.aureus* و pH با استفاده از بررسی واریانس در نرم‌افزار SPSS ارزیابی گردید. بر اساس 3 غلظت تعیین شده با 2 مرحله تکرار و 7 سری کشت میکربی در هر مرحله، در مجموع تعداد 42 سری کشت میکربی انجام شد.

آنالیز آماری: نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS₁₆ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفتند.

• یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصله 60 ماده از ترکیبات موجود در روغن فرار گیاه چوبیر که 96/84 درصد از کل مقدار اسانس بود به کمک GC/MS و با استفاده از روش تقطیر با آب شناسایی شدند که در این میان سیس اوسیمین و آلفاپینین به ترتیب با 30/17% و 15/41% بیشترین و متیل سیکلوهگزان با 0/01% کمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بودند. 14 جزء اصلی، 85/23 درصد کل عصاره را تشکیل دادند (جدول 1). نتایج حاصل از بررسی میزان رشد باکتری *استافیلوکوک اورئوس* در طی مراحل مختلف تولید و نگهداری پنیر تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس در جدول 2 نشان داده شده است. غلظت 0/015 درصد و 0/03 درصد از بالاترین تأثیر بر رشد *استافیلوکوک اورئوس* برخوردار بودند. نتایج نشان داد بهترین غلظت اسانس مذکور از نظر ممانعت از رشد باکتری غلظت 0/03 می‌باشد. مطابق آنالیزهای آماری صورت گرفته تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس در نمونه کنترل و نمونه حاوی باکتری معنی‌دار بود. میانگین غلظت صفر با غلظت 0/0075 اختلاف معنی‌داری ندارد ($P > 0/05$). اما با میانگین سایر غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/05$). همچنین، در آزمون مقایسه بین واریانس‌های *استافیلوکوک اورئوس* در مدت زمان مختلف نگهداری اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$)، اما میان میانگین *استافیلوکوک اورئوس* در مدت زمان نگهداری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0/05$). در پنیر حاوی غلظت 0/03% اسانس چوبیر و تعداد اولیه باکتری 1×10^3 cfu/g، پس از گذشت 30 روز تعداد باکتری به 8×10^1 cfu/g کاهش و از این روز به بعد

اندیس کوئاس ترکیبات شناخته گزارش شده در منابع استفاده گردید (16، 17).

مشخصات دستگاه گازکروماتوگرافی - اسپکترومتری

جرمی: دستگاه کروماتوگرافی گازی از نوع Hewlett-Packard ساخت کمپانی AGILDNT آمریکا با ستون مویینه به طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه 25 میکرومتر از نوع HP-5MS بود. دستگاه با دمای 50°C فعالیت خود را آغاز نموده، پس از 2 دقیقه توقف در این دما، حرارت به میزان $3/5^\circ\text{C}$ در هر دقیقه افزایش یافت تا به دمای 200°C رسید. قابل ذکر است سرعت جریان گاز هلیوم ورودی به ستون 1 میلی‌لیتر در دقیقه است (18).

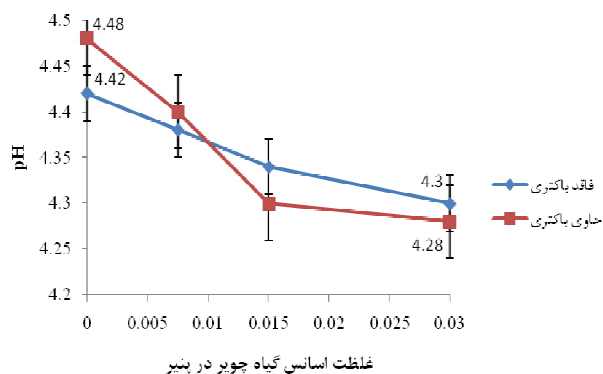
مراحل تولید پنیر: در ابتدا نمونه شیر در دمای $72 \pm 2^\circ\text{C}$

به مدت 15 ثانیه پاستوریزه گردید و به منظور اطمینان از عدم آلودگی به *استافیلوکوک اورئوس* 24 ساعت قبل از آغاز آزمایشات یک نمونه کشت میکربی بر روی آن صورت گرفت. پس از اطمینان از منفی بودن نتایج کشت میکربی، غلظت‌های متفاوتی از اسانس (0، 0/015، 0/0075 و 0/03%) به نمونه‌های مختلف افزوده و دمای آن‌ها به 35°C رسانده شد. سپس جهت انجام مراحل بعدی 1×10^3 cfu/g *استافیلوکوک اورئوس* تلقیح گردید و متعاقب آن 2 میلی لیتر پنیر مایه قارچی (*DK-2970, CHR HANSEN*) و 0/2 میلی لیتر کلرید کلسیم افزوده شد. دلمه تشکیل شده در ابعاد $28 \times 12 \times 12$ سانتیمتر برش خورده و به مدت 6 ساعت تحت فشار وزنه استریل 10 کیلوگرمی آبکشی گردید. پس از آبکشی، در ابعاد $12 \times 8 \times 6$ سانتیمتر برش داده شد و در آب نمک استریل 20% به مدت 8 ساعت در دمای 22°C نگهداری گردید. در گام بعدی در آب نمک 8% با دمای 14°C به مدت 15 روز عمل آوری و به منظور رسیدن نهایی به مدت 60 روز در دمای 4°C نگهداری شد. با کمک آزمایش اسیدیته هنگامی که pH به 4/6 رسید برش‌های پنیر به یخچال با دمای 4°C انتقال داده شد.

انجام کشت در زمان‌های تعیین شده: کشت و شمارش

باکتری در مراحل تولید پنیر سفید ایرانی بعد از ساعت صفر (بلافاصله پس از تلقیح باکتری)، ساعت 1 (بعد از افزودن استارتر و ایجاد لخته)، روز 7 (168 ساعت، پس از آگیری لخته)، روز 15 (360 ساعت، متعاقب اتمام دوره رسیدن اولیه پنیر)، روز 30 (720 ساعت)، روز 45 (1080 ساعت) و روز 60 (1440 ساعت) انجام گردید. تمامی فرآیندها بر روی

تأثیر گذارترین زمان نگهداری زمان 60 روز در غلظت 0/015 درصد و زمان 45 و 60 روز در غلظت 0/03 درصد تشخیص داده شد.



شکل 1. تغییرات میزان pH در غلظت‌های مختلف اسانس گیاه چوپیر در پنیر سفید ایرانی پس از روز 60

تعداد باکتری به صفر رسید. در غلظت 0/015 پس از گذشت 45 روز از نگهداری پنیر تعداد باکتری مذکور در هر گرم پنیر از $9/8 \times 10^2$ cfu/g به 5×10^1 cfu/g کاهش یافت و از این روز به بعد رشد باکتری متوقف شد. در غلظت 0/0075 درصد برخلاف سایر غلظت‌های اسانس و زمان‌های ماند مورد بررسی، پس از آبگیری لخته (روز 7) شاهد افزایش جمعیت باکتری بودیم. قابل ذکر است pH در غلظت 0/0075 درصد در مقایسه با سایر غلظت‌ها بالا بود (5/4). لازم به ذکر است در نمونه شاهد فاقد اسانس با تعداد اولیه باکتری $9/9 \times 10^2$ cfu/g با افزایش مدت نگهداری پنیر تعداد باکتری نیز افزایش یافت به گونه‌ای که شمارش میکربی در پایان روز 60 به $9/5 \times 10^4$ رسید. در غلظت‌های 0/03 و 0/015 درصد در روز 30 شاهد افزایش جزئی در محتوای باکتری پنیر بودیم که با گذشت زمان بیشتری از نگهداری این میزان مجدداً کاهش یافت و حتی به صفر رسید. در واقع

جدول 1. نتایج GC/MS اسانس گیاه چوپیر

درصد	نام ترکیب	ردیف	درصد	نام ترکیب	ردیف	درصد	نام ترکیب	ردیف
0/09	Tricyclene	41	0/33	Alpha-Copaene	21	30/17	Cis-Ocimene	1
0/09	Verbenene	42	0/3	Geranyl Isovalerate	22	15/4	Alpha-Pinene	2
0/08	Palmitic acid	43	0/3	Methyl Eugenol	23	5/7	Trans-Beta-Ocimene	3
0/07	Trans-Sabinene hydrate	44	0/28	Trans-Caryophyllen	24	5/57	Gamma-Terpinene	4
0/07	Alpha-Murolene	45	0/28	Beta-Bourbonene	25	5/03	Germacrene-D	5
0/06	Pino Carvey Acetate	46	0/26	Linallo	26	4/88	Limonene	6
0/06	Iso Spathulenol	47	0/23	Beta-Cubebene	27	4/57	Bornyl Acetate	7
0/06	Alpha-Humulene	48	0/22	Alpha-amorphene	28	3/62	Myrcene	8
0/05	Butanoic Acid, 3-methyl	49	0/17	Terpinene-4-01	29	2/41	Camphene	9
0/05	Gamma- Curcumene	50	0/16	Beta-Element	30	1/87	Noe- Allo-Ocimene	10
0/05	Trans-beta-Farnesene	51	0/15	Alpha-Cadinol	31	1/84	Beta-Phellandrene	11
0/04	Alpha-Cedrene	52	0/14	Beta-Bisabolene	32	1/7	Alpha-Terpinolene	12
0/03	Elemol	53	0/14	Borneol	33	1/29	Bicyclogermacrene	13
0/03	Alpha-Campholenal	54	0/13	Epi-alpha-Cadinol	34	1/18	Delta-Cadinene	14
0/03	Para-Cymene-8-01	55	0/12	Cis-Jasmone	35	0/71	Delta-3Carene	15
0/03	Geranio	56	0/11	Gamma-Element	36	0/64	Germacrene-B	16
0/03	Carvacrol	57	0/1	(+)- Cuparene	37	0/56	Para-Cymene	17
0/03	Alpha-Cubebene	58	0/1	Alpha-Cadinene	38	0/54	Spathulenol	18
0/02	Myrtenal	59	0/09	Ledene	39	0/53	Alpha-Terpinene	19
0/01	Methyl cyclohexane	60	0/09	Alpha-Terpineol	40	0/52	alpha-Phellandrene	20

جدول 2. میانگین و انحراف معیار شمارش/استافیلوکوک/اورئوس (cfu/g) در زمان‌های مختلف تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت اسانس گیاه چویر در پنیر سفید ایرانی

غلظت (%)	زمان	ساعت صفر	ساعت یک	روز 7	روز 15	روز 30	روز 45	روز 60
0		990±62/1	1130±200	3200±46/5	12000±792/4	25000±895/4	52000±504/6	95000±594/8
0/0075		1100±79/8	1150±193/2	510±83/1	1100±78	23400±965/7	31000±798/7	53000±483/8
0/015		980±75/4	1040±42/3	150±22	90±11/1	120±27	50±6/3	0
0/03		1050±65/6	1180±73/2	70±6	60±2/5	80±14	0	0

• بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که غلظت‌های 0/015 و 0/03 درصد اسانس توانستند رشد باکتری را متوقف کنند که این تأثیر در غلظت 0/03 سریعتر بود. به طور خلاصه می‌توان چنین اظهار داشت در بالاترین غلظت اسانس هرچه مدت زمان نگهداری در 4 درجه سانتی گراد بیشتر شود میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از ارزیابی تغییرات pH طی نگهداری نمونه نشان دهنده تأثیر غلظت اسانس بر مقدار آن بود به گونه‌ای که با افزایش غلظت اسانس این میزان کاهش یافت. نتایج اندازه‌گیری میزان pH پس از 60 روز نشان داد که با افزایش غلظت اسانس pH نیز کاهش می‌یابد و این روند در نمونه‌های حاوی باکتری و فاقد باکتری مشاهده گردید. همچنین تفاوت چندانی بین pH نهایی نمونه‌های حاوی باکتری و فاقد باکتری وجود ندارد.

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی بومی هر منطقه و هم-چنین با در نظر گرفتن بروز مقاومت‌های باکتریایی در سال‌های اخیر و نیز با توجه به افزایش آگاهی عمومی جامعه در رابطه با نگهدارنده‌های شیمیایی و عوارض خطرناک آنها، مطالعات بسیاری بر روی اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی و عصاره آنها بر روی مواد غذایی صورت گرفته است. در تحقیقی که توسط حیدری و همکاران انجام شد، گزارش شد *Ferulago angulata* در ایران بنام چویر شناخته می‌شود و یک بوته بهاری و در ارتفاع 1900-3200 متر بالاتر از سطح دریا و به طول 60-150 سانتی‌متر می‌روید. هدف این تحقیق ارزیابی ظرفیت عصاره چویر برای نابودی سلول‌های سرطانی بود که مثبت ارزیابی گردید. مهم‌ترین ماده مؤثره اسانس سیس اوسایمن بود که با این پژوهش همخوانی دارد (20). در پژوهش انجام شده توسط صادقی و همکاران در سال 2013 با هدف بررسی رفتار *استافیلوکوک*

اورئوس در پنیر سفید ایرانی در سه غلظت اسانس زیره سبز (0/0075، 0/015، و 0/03%) از طریق سنجش میزان رشد باکتری در محیط کشت اختصاصی در آزمایشگاه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد اسانس مذکور در دو غلظت 0/03 و 0/015 درصد به ترتیب از بیشترین تأثیر بر رشد *استافیلوکوکوس* برخوردار هستند (21). در پژوهش سدوفیان و همکاران عصاره قسمت‌های هوایی چویر از طریق فناوری *supercritical fluids* استخراج و روغن اصلی به وسیله GC و GC-MASS بررسی شد. در این مطالعه 37 جزء روغن اصلی شناسایی شدند که 14 جزء اصلی، 83/3 درصد کل عصاره را تشکیل دادند (22). در تحقیقی که توسط Laport و همکاران صورت گرفت، فعالیت ضد باکتریایی علیه 61 درصد از انواع *استافیلوکوک‌های* کواگولاز منفی (CNS) توسط عصاره‌های گرفته شده از انواع اسفنج‌های دریایی بررسی شد. عصاره گرفته شده از اسفنج *P. citrina* در غلظت 0/5% بزرگترین طیف را در فعالیت بازدارندگی نشان داد. این تحقیق ظرفیت اسفنج‌های دریایی به عنوان یک منبع جدید آنتی بیوتیک‌ها و ضد عفونی کننده برای کنترل CNS مورد بحث در بیماری ورم پستان را نشان داد (23). در مطالعه قلیوند و همکاران، ترکیبات مؤثره اسانس گیاه چویر قبل و بعد از زمان گلدهی گزارش شده است. اسانس به روش تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر به دست آمده و ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی کوپل شده با طیف نگار جرمی (GC-MS) شناسایی گردید. 30 نوع ترکیب معادل 97% کل اسانس به دست آمده از برگ‌های گیاه قبل از گلدهی، 25 نوع ترکیب معادل 96% کل اسانس استخراج شده از ساقه گیاه قبل از گلدهی، بیست و شش نوع ترکیب معادل 97%

پاتوژن گیاهی مورد تأیید قرار گرفت که با این پژوهش همخوانی دارد (27). این تفاوت در میزان درصد اسانس چویر در مطالعات مختلف می‌تواند مربوط به اختلاف رقم، شرایط آب و هوایی، شرایط کشت، شرایط نگهداری و مدت زمان نگهداری نمونه باشد (28). همچنین در تحقیقی که توسط صادقی و همکاران در سال 2010 بر روی اسانس زیره سبز صورت گرفت بهترین غلظت اسانس از نظر تأثیر ممانعت‌گری بر رشد استافیلوکوکوس و ایجاد طعم مطلوب در محصول، غلظت 0/015 درصد بود که با مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد (29). همان‌طور که در قسمت نتایج بیان گردید در مطالعه حاضر اسانس چویر در غلظت 0/03 و 0/015 درصد نه تنها تعداد باکتری را کاهش داد بلکه پس از گذشت مدتی از زمان نگهداری رشد استافیلوکوک متوقف شد و میزان آن به صفر رسید. با مقایسه نتایج حاصل از آزمایش با نمونه شاهد فاقد اسانس می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسانس مذکور از اثرات ضد باکتریایی قوی بر علیه استافیلوکوک برخوردار است و جهت جلوگیری از مسمومیت استافیلوکوکی با استفاده از غلظت 0/03 درصد اسانس در زمان 45 روز و غلظت 0/015 درصد اسانس در زمان 60 روز می‌توان پنیر را وارد بازار کرد و بدون هیچ نگرانی از وجود این باکتری آن را به مصرف رساند.

امید است بتوان در خصوص آثار آنتی‌اکسیدانی و ممانعت‌گری این اسانس بر روی جنس‌های دیگر میکروب‌های بیماریزا پژوهش‌های بیشتری انجام داد.

کل اسانس به دست آمده از ساقه گیاه پس از گلدهی و 30 نوع ترکیب معادل 99% کل اسانس استخراج شده از گل پس از گلدهی شناسایی و گزارش شده است. هم‌چنین بهره‌هر اسانس بر حسب وزن گیاه خشک به دست آمد که با روش اسانس‌گیری این پژوهش همخوانی دارد (24). در تحقیق رضازاده و همکاران، روغن فرار گل آذین گیاه *Ferulago angulata* که در زمان گل‌دهی جمع‌آوری و در سایه خشک شده بودند به روش تقطیر با بخار آب استخراج و توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به شناساگر طیف نگار جرمی بررسی و اجزای آن شناسایی شد. در این کار تعداد 33 ترکیب که 89/7 درصد اجزا را تشکیل می‌داد شناسایی شد که 77/1 درصد آن مونوترپن و 12/6 درصد سس‌کویی‌ترین بود. ترکیبات اصلی شناسایی شده آلفا-پینن (17/3 درصد)، بورنیل استات (14/45 درصد) و سیس-اسیمن (14/4 درصد) بود که با این پژوهش همخوانی کامل ندارد و این تفاوت می‌تواند مربوط به اختلاف شرایط آب و هوایی و شرایط کشت نمونه باشد (12). در تحقیق قاسم‌پور و همکاران در سال 2007 اسانس گیاه چویر مورد ارزیابی گاز کروماتوگرافی قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین ماده مؤثره این اسانس آلفا پینن و اوسایمن می‌باشد که هر دوی این ترکیبات دارای اثرات ضد میکروبی بوده که با این پژوهش همخوانی دارد (25). در مطالعه سیگارودی و همکاران در سال 2005 بر روی اثرات شیمیایی و ضد میکروبی اسانس گیاه چویر مشخص گردید که اثرات ضد میکروبی آن با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مشابه می‌باشد (26). در مطالعه ای که توسط بهرامی نژاد و همکاران در سال 2011 انجام پذیرفت اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه چویر بر روی میکروب‌های

• References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-53.
- 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 Cont* 2007; 18: 414-20.
- Rudolf M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Food Microbiol* 2001; 63: 91-8.
- Jay MJ. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. An Aspen Publication; 2005; pp: 323,441-6.
- Bania J, Dabrowska A, Korzekwa K, Zarczynska A, Bystron J, Chrzanoska J, et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. *Lett Appl Microbiol* 2006; 42(2): 315-20.
- Fueyo JM, Mendoza MC, Alvarez MA, Martin MC. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243(2): 447-54.
- Blackburn CW, Peter JM. *Foodborne Pathogens, Hazard, risk analyses and control*, CRC Press; 2002; pp: 385-90.
- Fazlara A, Sadeghi E, Rostami Soleimani P. Study on the antibacterial effects of *Cuminum cyminum*

- essential oil on *Listeria monocytogenes* in Iranian white cheese. *J Food Sci & Tech* 2012; 35(9): 35-44.
9. Noori N, Rokni N, Akhondzade Basti A, Misaghi A, Dabbagh Moghaddam A, Yahyaraeyat R, Ghanbari Sagharloo N. The antimicrobial effect of *Zataria multi flora* Boiss essential oil against *E.coli O157: H7* in minced beef during refrigerated storage as a replacement for chemical preservatives in order to maintain the consumer's health. *J Army Univ Med Sci* 2012; 10 (3): 192-7.
 10. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol* 2005; 22 (4): 273 - 92.
 11. Pol IE, Krommer J, Smid EJ. Bioenergetic cosequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2002; 3 (1): 55 - 61.
 12. Khanahmadi M, Shahrezaei F, Alizadeh A. Isolation and Structural Elucidation of Two Flavonoids from *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. *Asian J.Research Chem* 2011; 11: 1667- 70.
 13. Rezazadeh SH, Yazdani D, Shahnazi S. Distinguish of *Ferulago angulata*(Schlecht) Boiss essential oil was collection in Iran west. *Med herb* 2003; 7: 49-52.
 14. Nasab asgarian H, Sajadi E, Sadeghi H, Naderian M, Abedi A. The survey of phytochemical of *Ferulago an gulate*(schlecht.) Boiss. National congress of medicine herbal 5-8 September, yasooj; 2012.
 15. Mousavi T. Study of behavior of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Iranian White cheese. Thesis of food hygiene (Ph.D) Azad University of Tehran, jan; 2005; 237: 60 - 70.
 16. Azadbakht M. Morteza-semnani K, Khansari N. The essential oils composition of *Achillea wilhelmsii* C. Koch. Leaves and flowers. *Med Plants* 2003; 2: 55-59.
 17. Jaimand K, Rezaee MB. Essential oil analysis of *Achillea eriophora* DC. *Iranian J. of Med. And Aromatic Plants Res* 2004; 20(1): 89 -98.
 18. Zargari, A. Handbook of Medical Plants. 6th Edition. Tehran University Publications 1997; pp: 1-154.
 19. (APHA), A.P.H.A. Standard methods for the examination of water and wastewater, ed. t. ed. 2005, Washington: DC: APHA.
 20. Heidari SH, Akrami H, Mahdiuni H. Study of Chemo preventive activity of Ethanolic extract of *Ferulago Angulate* leaves. *Clin Biochem* 2011; 843-8.
 21. Sadeghi E, Akhondzadeh Basti A, Noori N. Effect of *Cuminum L.* Essential Oil and *Lactobacillus acidophilus* (A Probiotic) on *Staphylococcus aureus* during the Manufacture Ripening and Storage of White Brined Cheese. *J Food Proces & Pres* 2013; 37: 449-55.
 22. Sodeifian G, Ansari K, Bamoniri A, Mirjalili F. Study of Chemical Composition of The Essential Oil of *Ferulago angulata* (Schelcht) Boiss. From Iran Using Supercritical Fluid Extraction and Nano Scale Injection. *Digest Journal of Nano materials and Bio structures*; 2011; 6(1): 161 –8.
 23. Laport M, Marinho PR, Dasilva Santos OC, Almeida P, et al. Antimicrobial activity of marine sponges against coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. *Vet Microbial* 2012; 155(2-4):362-8.
 24. Gholivand MB, Dastanfar D, Khosravi L. Extraction and determination of *Ferulago angulata* essential oil before and after flowering (Dalahoo mountain. Kermanshah). Sixth congress of agriculture sciences; 2009.
 25. Ghasempour HR, Shirinpour E, Heidari H. Analysis by Gas Chromatography-mass spectrometry of essential oil from seeds and aerial parts of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss gathered in Nevakoh in west of Iran. *Biolog Sci* 2007;10(5): 814-7.
 26. Sigaroudi F, Hadjiakhoondi A, Shahverdi AR, Mozafarian VA, Shaiee A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ferulago Bernardii* Tomk. and M. Pimen. *DARU*; 2005; 13(3):100-6.
 27. Bahraminejad S, Abbasi S, Fazlali M. In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *Biotech* 2011; 10(72): 16193-201.
 28. Shahsavari N, barzegar M, Sahari MA. Survey of *Zataria multiflora* Boiss anti oxidant and *Bunium persicum* Boiss in soybean oil. 18 th national congress on food technology, Mashhad. 15-16 Oct. 2008.
 29. Sadeghi E, Akhondzade A, Misaghi A. Effect of *Cuminum cyminum* essential oil on growth of *Staphylococcus aurous* in hurdle technology. *J Medicinal plants* 2010; 34(2)130- 40.

The effect of *Ferulago angulata* essential oil on *Staphylococcus aureus* during the manufacture and preservation of Iranian white cheese

Darderafshi MJ¹, Bahrami Gh², Sadeghi E^{*3}, Khanahmadi M⁴, Mohammadi M⁵, Mohammadi R⁶

1- M.Sc Student in Food Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Semnan, Iran.

2- Prof, Dept. of Pharmacology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

3- *Corresponding author: Assistant Prof, Research Center for Environmental Determinants of Health (RCEDH), Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. Email: ehsan.sadeghi59@yahoo.com

4- Instructor, Dept. of Chemistry, Jihad-e-daneshgahi, Kermanshah Unit, Kermanshah, Iran.

5- M.Sc Student in Food Science, Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

6- Ph.D Student in Food Science, Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Received 12 Oct, 2013

Accepted 5 Jan, 2014

Background and objective: The use of antimicrobials and herbal preservatives has increased in response to increasing public awareness about the effects of chemical preservatives. No study has been carried out thus far on the antimicrobial effects of *Ferulago angulata* essential oil in dairy products. This study determined the effect of the essential oil on *Staphylococcus aureus* growth in the manufacture of Iranian white cheese using hurdle technology.

Materials and methods: *Ferulago angulata* was collected from the Dalahoo mountains in the province of Kermanshah and the components of this essential oil were determined by hydro-dilution and gas chromatography/mass spectrophotometer. The antibacterial effect of *Ferulago angulata* on *S. aureus* was evaluated at concentrations of 0.0075%, 0.015%, and 0.03%. The data was analyzed using SPSS software.

Results: Chemical analysis of the essential oil identified 60 substances (96.84%) and cis-Ocimene was found to be the most frequent compound. Concentrations of 0.015% and 0.03% affected the growth rate of *S. aureus* significantly ($p < 0.01$), but the 0.0075% concentration was not significant ($p > 0.01$). It was found that the bacteria colony decreased at high retention times.

Conclusion: The results showed *Ferulago angulata* essential oil at high concentrations had a high antibacterial effect and could be used to control *S. aureus* in dairy products in place of chemical preservatives.

Keywords: *Ferulago angulate*, Essential oil, White cheese, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial effect