

مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس پوست دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) در شرایط آزمایشگاهی در برابر پنج باکتری عامل فساد غذایی

سید مهدی اجاق^۱، مسعود رضائی^{۲*}، سید هادی رضوی^۳،
سید محمد هاشم حسینی^۴

۱- استادیار گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی گرگان

۲- دانشیار دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۴- دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۱۲)

چکیده

ترکیب شیمیایی اسانس پوست دارچین (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) مورد استفاده در صنایع غذایی با استفاده از دستگاه GC-MS ارزیابی شد و ۲۱ ترکیب شناسایی شدند. سینامالدهید^۱ با ۶۰/۴۱ درصد بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده بود و پس از آن لینالول^۲ (۶/۴۶ درصد)، ارتومتوکسی سینامیک آلدهید^۳ (۳/۶۳ درصد)، بتا کاریوفیلن^۴ (۳/۵ درصد)، ۱-۸ سینئول^۵ (۳/۳۲)، اوجنول^۶ (۳/۱۹ درصد) و ترکیبات دیگر قرار داشتند. فعالیت آنتی باکتریایی (حداقل غلظت بازدارنده و کشندگی) اسانس پوست دارچین در مقابل ۵ باکتری بیماری‌زا و فسادزا در مواد غذایی شامل *Lactobacillus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* و *Lactobacillus sakei* و *plantarum* ارزیابی شدند. حداقل غلظت بازدارنده اسانس دارچین در مقابل *L. sakei* ۲۵۰ µg/ml و برای سایر باکتری‌ها برابر ۵۰۰ µg/ml مشاهده شد. حداقل غلظت کشندگی برای *L. sakei* و *Ps. fluorescens* برابر ۱۰۰۰ µg/ml و برای سایر باکتری‌ها بالاتر از ۱۵۰۰ µg/ml بودند.

کلید واژگان: اسانس پوست دارچین، *Cinnamomum zeylanicum*، فعالیت آنتی باکتریایی، باکتری‌های بیماری‌زا

*مسئول مکاتبات: Rezai_ma@modares.ac.ir

1. E-cinnamaldehyde
2. Linalool
3. Ortho methoxy cinnamic aldehyde
4. β-caryophyllene
5. 1,8-cineole
6. Eugenol

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، موارد زیادی از فساد مواد غذایی و بیماری‌های با منشأ غذایی ناشی از رشد ریزسازواره‌ها (میکروارگانیسم‌ها) در سراسر جهان گزارش شده است [۲۰]. تلاش‌های زیادی مانند استفاده از مواد شیمیایی سنتزی جهت کنترل رشد میکروبی و کاهش شیوع مسمومیت‌های غذایی و فساد صورت پذیرفته است. در هر حال، به دلیل اثرات سوء این ترکیبات مصرف کنندگان نگران بوده و لذا نیاز به مواد ایمن‌تر برای جلوگیری و کنترل ریزسازواره‌های بیماری‌زای مواد غذایی وجود دارد [۲]. افزایش مقاومت برخی میکروب‌های بیماری‌زای مواد غذایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از دیگر دغدغه‌ها می باشد [۳]. لذا گرایش زیادی جهت استفاده از انواع جدید ترکیبات ضد میکروبی طبیعی مانند عصاره‌ی ادویه‌ها و گیاهان برای نگهداری مواد غذایی وجود دارد. تعدادی از ادویه‌ها و ترکیبات گیاهی که امروزه استفاده می شوند به دلیل فعالیت ضد میکروبی و اثرات دارویی و نیز کیفیت عطر و طعم ارزشمند هستند. ترکیب عصاره‌های بیشتر گونه‌های گیاهی در سال‌های اخیر شناسایی شده و تلاش برای شناسایی اجزای زیست فعال آن‌ها برای مقاصد دارویی مختلف و عمل‌آوری مواد غذایی شتاب گرفته است. فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی، اساس کاربردهای مختلفی مانند نگهداری مواد غذایی خام و فرآوری شده، کاربردهای داروسازی، طب سنتی و درمان طبیعی را تشکیل می دهند اما مقایسه‌ی نتایج گزارش شده در این مطالعات معمولاً به دلیل تعداد کم نمونه‌های آزمایش شده، روش‌های متفاوت آزمایش و نژاد باکتریایی متنوع و منابع نمونه‌های ضد میکروبی مشکل است [۴، ۵ و ۶]. *Cinnamomum zeylanicum* که به عنوان دارچین شناخته می شود گیاه بومی سریلانکا [۷] است. اسانس دارچین توسط محققین زیادی به عنوان منبع مناسب از ترکیبات ضد قارچی و باکتریایی شناخته شده است [۷-۱۰].

Matan و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده اند که ترکیب

اسانس دارچین قادر است که از رشد میکروارگانیسم‌های اصلی فاسد کننده‌ی غذاهای با رطوبت متوسط پیشگیری کند [۱۱]. بررسی خواص ضد باکتریایی ۲۸ اسانس در برابر ۴ باکتری بیماری‌زا (*E. coli* O157:H7، *Staphylococcus aureus*، *monocytogenes* و *Salmonella typhimurium*) نشان داده است که غالب این اسانس‌ها فعالیت ضدباکتریایی دارند [۹].

گوشت محیطی غنی از مواد مغذی و ایده‌آل برای رشد و تکثیر بیشتر میکروب‌های بیماری‌زا و عامل فساد است. *Listeria monocytogenes* بیماری‌زای مقاوم به دماهای پایین است سلامت گوشت و فرآورده‌های گوشتی را که در دمای یخچال نگهداری می شوند را به مخاطره می اندازد. *E. coli* O157:H7 از خطرهای دیگر است که سلامتی مصرف کننده مواد غذایی را تهدید می کند. بیشتر بیماری‌های شایعی که توسط *E. coli* O157:H7 ایجاد شده در نتیجه مصرف غذاهایی با منشأ گوشتی بوده است. علاوه بر بیماری‌زاها، ریزسازواره‌های عامل فساد نیز می توانند به آسانی بر روی فرآورده‌های گوشتی تازه و پیش پخته و فرآورده‌های گوشتی تکه تکه شده رشد کنند [۱۲].

عامل اصلی فساد در فرآورده‌های گوشتی تازه در طی نگهداری گونه‌های *Pseudomonas* هستند [۱۲]. *P. fragi* و *P. fluorescens* به دلیل تولید پروتئازها و لیپازهای خارج سلولی در دماهای پائین موجب فساد کیفی فرآورده‌های گوشتی می گردند [۱۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک^۳ به عنوان جمعیت غالب عامل فساد سوسیس‌ها و کالباس‌های امولسیون‌ی بسته بندی شده تحت شرایط خلا و گوشت‌های فرآوری شده دیگر که در دمای یخچال نگه داری می شوند شناخته شده‌اند [۱۴ و ۱۵]. در نتیجه فعالیت باکتری‌های اسید لاکتیک، بو و طعم نامطلوب ترشیدگی، خروج ترکیبات شیری رنگ، متورم شدن بسته‌ها و یا رنگ متمایل به سبز ممکن است مشاهده گردد [۱۲].

1. Cinnamon
2. Sri Lanka

3. Lactic acid bacteria

۲-۲ شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین با دستگاه GC/MS انجام پذیرفت. مشخصات و تنظیمات دمایی دستگاه به صورت زیر بود:

برای آنالیز نمونه ی اسانس پوست دارچین از دستگاه گازکروماتوگراف متصل شده با طیف سنج جرمی^۵ مدل، Trace مجهز به ستون کاپیلاری DB-5 به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر استفاده شد (شیماتزو، ژاپن)^۶. دمای آون از ۶۰ درجه سانتیگراد تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۵ درجه سانتیگراد بر دقیقه افزایش یافت و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. از گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی لیتر بر دقیقه استفاده شد و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده گردید. نسبت Split ۱ به ۵۰ و حجم تزریق یک میکرولیتر بود.

شاخص بازدارندگی طیف‌های حاصل از اسانس با استفاده از زمان بازدارندگی نرمال آلکان‌های تزریق شده (C₆-C₂₄) به دستگاه در شرایط مشابه با اسانس محاسبه گردید. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه ی این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آن در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح به دست آمد [۱۶]. کروماتوگرام نمونه ی اسانس دارچین و جدول آنالیز اسانس به ترتیب در شکل ۱ و جدول ۲ مشاهده می شود.

۲-۳ باکتری‌های مورد بررسی

باکتری های مورد استفاده در این تحقیق *L. E. PTCC1399 monocytogenes PTCC1163*، *L. sakei*، *L. plantarum PTCC1058*، *coli PTCC1272* و *Ps. fluorescens* بودند. چهار باکتری اول از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران و باکتری

لذا به عنوان اولین گام، ضروری است که تاثیر عوامل ضدباکتریایی، به ویژه اسانس‌ها بر روی ریزسازواره های طبیعی گوشت مشخص گردد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی کارایی اسانس دارچین (بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس) بر روی ۵ باکتری بیماری‌زا و فسادزای مواد غذایی (*E. coli*، *L. Ps. fluorescens*، *L. monocytogenes*، *L. sakei* و *plantarum*) در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲-۲ مواد و روش‌ها

۲-۱ تهیه ی اسانس

اسانس پوست دارچین با مشخصات موجود در جدول ۱ به سفارش گروه شیلالت دانشگاه تربیت مدرس از شرکت زردبند (استخراج و فرآوری کننده ی مواد مؤثره گیاهان دارویی) به روش استخراج صنعتی تقطیر با بخار آب^۱ تهیه شد و در ظرف درب دار تیره رنگ دور از نور و در یخچال نگهداری شد. پارامترهای رنگ و ظاهر به صورت چشمی، بو به روش حسی، وزن مخصوص از طریق اندازه گیری وزن حجم مشخصی از اسانس، اندیس شکست با دستگاه رفراکتومتر^۲ و چرخش نوری با دستگاه پولاری متر^۳ اندازه گیری شدند.

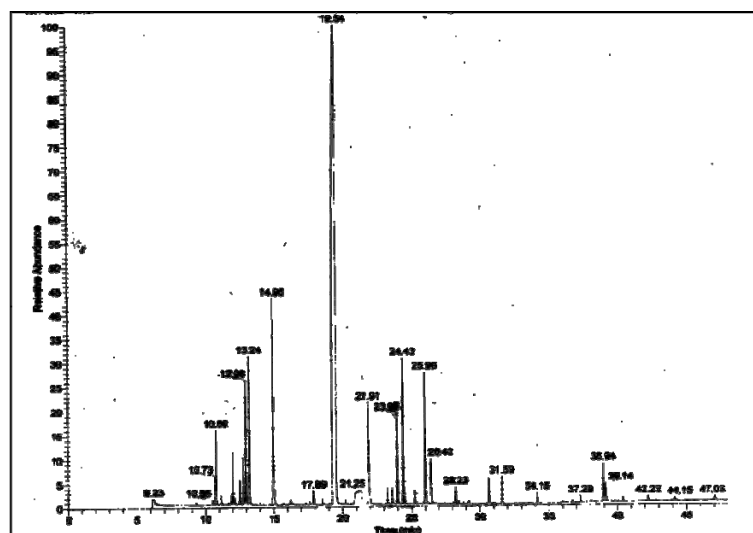
جدول ۱ مشخصات اسانس پوست دارچین^۴

پارامتر	نتیجه
رنگ	زرد
وضعیت ظاهری	مایع
بو	خاص دارچین (Characreristic)
وزن مخصوص (g/cm ³)	۱/۰۲۹
اندیس شکست	۱/۵۹۵
چرخش نوری	-۰/۲

1. Steam distillation
2. Refractometer
3. Polarimeter
4. Cinnamon bark oils

5. Thermoquest-Finnigan
6. Shimadzu, Japan

شفاف بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در نظر گرفته شد. در صورتی که در سطح غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام کدورتی مشاهده نمی‌شد این آزمایش مجدداً در سطوح غلظتی پائین‌تر شامل ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی‌پی‌ام تکرار شد تا سطح دقیق MIC تعیین گردد. پس از تعیین MIC جهت تعیین MBC در شرایط کاملاً استریل از محتویات ارلن‌هایی که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری هنوز شفاف بودند و کدورتی در آنها مشاهده نشده بود به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت مناسب هر گونه باکتری کشت سطحی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب رشد و عدم رشد باکتری‌ها بررسی شد. اولین غلظتی که در آن رشد مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد [۱۷ و ۱۸].



شکل ۱ کروماتوگرام حاصل از آنالیز GC-M
S اسانس دارچین مورد استفاده در تحقیق حاضر

۳- نتایج و بحث

در جدول شماره ۲ ترکیبات تشکیل دهنده اسانس دارچین، شاخص بازدارندگی و درصد سطح زیر پیک آنها مشاهده می‌شود.

دیگر از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردیدند. برای فعال‌سازی سویه‌های میکروبی آمپول‌های منجمد شده تحت خلاء (لیوفیلیزه) حاوی میکروارگانیزم‌ها طبق دستورالعمل، از محل مورد نظر تحت شرایط استریل باز شده و از آن کشت مادر و سپس کشت ذخیره تهیه شده و در مراحل بعدی از کشت ذخیره استفاده شد. به منظور حفظ قابلیت زیستی باکتری‌ها، هر بیست روز کشت مجدد آن‌ها صورت گرفت.

۲-۴ تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^۱) و حداقل غلظت کشندگی (MBC^۲) اسانس دارچین در مقابل

باکتری‌های مورد مطالعه

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از محیط کشت‌های Brain Heart Infusion (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) استفاده شد سپس از باکتری‌های مورد مطالعه غلظت تقریبی ۱۰^۷ cfu/ml (از طریق رسم منحنی cfu در مقابل دانسیته نوری (OD)) به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به هر یک از ارلن‌ها افزوده شد. در مرحله بعد محلول‌های اسانس دارچین با استفاده از Tween 80 (مرک) و آب مقطر به نحوی تهیه شدند که با ریختن مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از هر کدام از محلول‌ها درون ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع و باکتری‌های مورد آزمایش به ترتیب غلظت‌های ۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام ساخته شود. غلظت‌های بالاتر از ۱۵۰۰ پی‌پی‌ام به دلیل عدم انحلال پذیری اسانس دارچین در Tween 80 و آب مقطر مطالعه نگردید. سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای *L. sakei* و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای سایر باکتری‌ها و دور ۱۴۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت پائین‌ترین غلظتی که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. در واقع کدر شدن محیط داخل ارلن‌ها نشان دهنده رشد باکتری‌ها بوده و اولین ارلنی که در آن کدورت مشاهده نگردید و کاملاً

1. Minimu inhibitory concentration
2. Minimum bactericidal concentration

جدول ۲ ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس پوست دارچین

شماره پیک (ردیف)	زمان پیک (دقیقه)	نام ترکیب	شاخص بازداری	مقدار (درصد)
۱	۱۰/۸	α -pinene	۹۳۶	۲/۱۸
۲	۱۱/۱۸	camphene	۹۵۰	۰/۱۴
۳	۱۲/۰۲	myrcene	۹۸۲	۱/۰۳
۴	۱۲/۵۴	α - phellandrene	۱۰۰۱	۰/۵۴
۵	۱۲/۷۸	δ -3-carene	۱۰۱۰	۰/۹۴
۶	۱۲/۹۶	p-cymene	۱۰۱۶	۲/۸۵
۷	۱۳/۲۴	1,8-cineole	۱۰۲۶	۳/۳۲
۸	۱۴/۹۵	linalool	۱۰۸۶	۶/۴۶
۹	۱۷/۸۹	Z-Cinnamaldehyde	۱۱۸۸	۰/۲۹
۱۰	۱۹/۵۴	E-Cinnamaldehyde	۱۲۴۷	۶۰/۴۱
۱۱	۲۱/۳۳	Hexagerman	۱۳۱۲	۰/۴۸
۱۲	۲۱/۹۱	Eugenol	۱۳۳۴	۳/۱۹
۱۳	۲۳/۲۸	α -copaene	۱۳۸۶	۰/۳۴
۱۴	۲۳/۶۲	Coumarine	۱۳۹۸	۰/۴
۱۵	۲۳/۹۸	E-cynnamyl acetate	۱۴۱۳	۲/۰۱
۱۶	۲۴/۴۳	β -caryophyllene	۱۴۳۱	۳/۵
۱۷	۲۵/۲۵	A- α -humulene	۱۴۶۳	۰/۲۷
۱۸	۲۵/۹۹	Ortho methoxy cinnamic aldehyde	۱۴۹۲	۳/۶۳
۱۹	۲۸/۲۲	Caryophyllene oxide	۱۵۸۵	۰/۳۴
۲۰	۳۱/۵۹	Benzyl benzoate	۱۷۳۶	۰/۶
۲۱	۳۸/۹۴	Equilin	۲۰۴۹	۰/۹۱
۲۲		شناخته نشده		۶/۱۷

جدول ۳ حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس دارچین علیه باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق

باکتری	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>
حداقل غلظت بازدارندگی ($\mu\text{g/ml}$)	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
حداقل غلظت کشندگی ($\mu\text{g/ml}$)	$1500 <$	$1500 <$	۱۰۰۰	$1500 <$	۱۰۰۰

بر اساس کروماتوگرام نشان داده شده در شکل ۱، تعداد ۲۱ ترکیب در اسانس دارچین شناسایی شد که در این میان سینامالدهید با ۶۰/۴۱ درصد (زمان خروج پیک ۳۸/۹۴ دقیقه) بیشترین ترکیب شناسایی شده بوده و پس از آن لینالول (۶/۴۶ درصد)، ارتومتوکسی سینامیک آلدهید^۱

بر اساس کروماتوگرام نشان داده شده در شکل ۱، تعداد ۲۱ ترکیب در اسانس دارچین شناسایی شد که در این میان سینامالدهید با ۶۰/۴۱ درصد (زمان خروج پیک ۳۸/۹۴ دقیقه) بیشترین ترکیب شناسایی شده بوده و پس از آن لینالول (۶/۴۶ درصد)، ارتومتوکسی سینامیک آلدهید^۱

1. Ortho methoxy cinnamic

(۳/۶۳ درصد)، بتا کاروفیلین (۳/۵ درصد)، ۸-۱ سینئول (۳/۳۲ درصد)، اوجنول (۳/۱۹ درصد)، p-سیمن^۱ (۲/۸۵ درصد)، α -پینن^۲ (۲/۱۸ درصد)، E-سینامیل استات^۳ (۲/۰۱ درصد)، میرسن^۴ (۱/۰۳ درصد) و ترکیبات دیگر قرار داشتند. در جدول شماره ۳ نتایج MIC برای ۵ باکتری مورد بررسی در تحقیق حاضر مشاهده می شود. ۳ گونه از ۵ باکتری مورد مطالعه شامل *L. L. monocytogenes* گرم منفی بودند. مقدار MIC اسانس دارچین در مقابل *L. sakei* ۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و برای سایر باکتری ها برابر ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ مشاهده شد. مقادیر MBC برای *L. sakei* و *Ps. fluorescens* برابر ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و برای سایر باکتری ها بالاتر از ۱۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد (جدول ۳).

Bullerman و همکاران گزارش نمودند که دارچین حاوی سینامالدهید به عنوان ترکیب اصلی می باشد که ۶۵-۷۵٪ اسانس را تشکیل می دهد و این ترکیب مسئول اثر آنتی باکتریایی می باشد [۱۹]. پاره ای دیگر از مطالعات نشان داده اند اسانس دارچین که در میان فعال ترین اسانس ها قرار دارد حاوی مقادیر بالایی از سینامالدهید و اوجنول می باشد. مشخص شده که اسانس پوست دارچین^۵ حاوی ۶۰-۸۰ درصد سینامالدهید و نیز حدود ۲ درصد اوجنول بوده و اسانس برگ های آن از اوجنول (۷۵-۷۰ درصد) غنی می باشند [۲]. مشابه تحقیق حاضر، در مطالعه Ouattara و همکاران [۱۹] که فعالیت ضد باکتریایی چند اسانس را بررسی نمودند نیز، تفاوتی در میزان حساسیت باکتری های گرم منفی و گرم مثبت پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض اسانس ها مشاهده نشد. از طرفی گزارشات متعدد بیان نموده اند که باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی در برابر ترکیبات ضد باکتریایی حساس تر هستند و این حساسیت بالای باکتری های گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاردی است که این دیواره

در باکتری های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد [۱۶]. مقاومت باکتری های گرم منفی در برابر مواد ضد باکتریایی با سطح هیدروفیلی غشای خارجی باکتری ها که غنی از مولکول های لیپوپلی ساکارد است و یک حائل در برابر نفوذ مولکول های آنتی بیوتیکی مختلف ایجاد می کند و نیز با آنزیم های فضای پری پلاسمی (که قادر به شکستن مولکول های وارد شده از خارج هستند) نیز در ارتباط می باشد. باکتری های گرم مثبت چنین غشای خارجی در ساختار دیواره سلولی ندارند. برخی از آنتی بیوتیک می توانند به آسانی دیواره سلول باکتریای و غشای سیتوپلاسمی را تخریب نموده و منجر به خروج سیتوپلاسم آن گردند (۲ و ۴). به هر حال مقاومت بالای باکتری های گرم منفی ممکن است یک قاعده کلی نباشد چرا که مطالعاتی نیز وجود دارد که به مقاومت مشابه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و حتی مقاومت بالاتر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی اشاره نموده اند. به عنوان مثال در مطالعه Ouattara و همکاران [۱۹] *Brochothrix thermosphacta* (گرم مثبت) مقاومتی مانند *Serratia liquefaciens* (گرم منفی) نشان داد. در مطالعه ای که فعالیت آنتی باکتریایی چندین عصاره گیاهان دارویی و ادویه ها را در شرایط آزمایشگاهی^۶ بررسی نمودند [۴]، مشاهده شد که به طور کلی باکتری های گرم مثبت در برابر عصاره های مورد مطالعه در آن آزمایش نسبت به باکتری های گرم منفی حساس تر بودند، با این وجود نتایج اثر ۳ عصاره ی *Eugenia caryophyllata* Thunb *Prunella vulgaris* و *Roxb Terminalia bellirica* بر باکتری های مورد مطالعه آن تحقیق متفاوت بود. اگر چه *Staphylococcus aureus* (باکتری گرم مثبت) نسبت به باکتری *E. coli* (گرم منفی) به این ۳ عصاره ی حساس تر بود، اما فعالیت بازدارندگی این ۳ عصاره ی در مقابل *Salmonella anatum* (گرم منفی) بیشتر از *Bacillus cereus* و *Listeria monocytogenes*

1. P-cymene
2. α -pinene
3. E-cinnamyl acetate
4. myrcene
5. *Cinnamomum zeylanicum*

6. in vitro

(گرم مثبت) بود. این محققین دلیل این امر را به وجود احتمالی مقداری ترکیبات ضد باکتری های گرم منفی خاص در این ۳ عصاره نسبت دادند. در مطالعه ای دیگر در بین ۳ باکتری گرم مثبت مورد مطالعه *S. aureus* حساس ترین باکتری به عصاره ی خالص *Cinnamomum burmannii* بود، پس از آن *B. cereus* قرار داشت. در مقابل *L. monocytogenes* مقاوم ترین بود [۲]. نتایج مشابه توسط Kim و همکاران گزارش شده است (۱۷). این محققین مشاهده نمودند که *L. monocytogenes* (گرم مثبت) به اثرات بازدارنده ترکیبات اسانس نسبت به باکتری های گرم منفی آزمایش شده تحت همان شرایط مثل *Salmonella E coli O157:H7 E. coli typhimurium* و *Vibrio vulnificus* مقاوم تر است. در مطالعه حاضر نیز *Listeria monocytogenes* تقریباً مقاومتی مانند باکتری های گرم منفی نشان داد. متفاوت بودن مقاومت باکتری های گرم مثبت در برابر اثرات بازدارندگی اسانس ها احتمالاً به دلیل تفاوت بین سویه های مختلف می باشد. این فرضیه توسط *Sivropoulou* و همکاران بر روی دو سویه *Staphylococcus aureus* در حضور کارواکرول و تیمول تایید شده است [۲۰]. علاوه بر تفاوت های ساختاری، تفاوت های متابولیسمی نیز ممکن است در حساسیت یا مقاومت باکتری ها در برابر اسانس ها موثر باشد. در میان باکتری های گرم مثبت که عموماً حساس هستند باکتری های اسید لاکتیکی دارای بالاترین مقاومت می باشند. توانائی این باکتری ها در تولید آدنوزین تری فسفات (ATP) بوسیله فسفوریلاسیون سوپرسترا احتمالاً علت این مقاومت می باشد. تفاوت میزان ATP در *L. sakei* و *L. monocytogenes* بعد از قرارگیری در معرض اوجنول یا سینامالدهید این فرضیه را قوت بخشیده است. مقاومت بالاتر باکتری های اسید لاکتیکی همچنین ممکن است به علت توانائی بالاتر آن ها در مواجهه با شرایط تنش اسمزی و نیز واکنش موثرتر در مقابل خروج یون کلسیم (ایجاد شده توسط بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی) باشد [۲۱]

فعالیت ضد باکتریایی ادویه جات را به صورت قوی، متوسط و ضعیف طبقه بندی نموده اند [۱۹]. بر طبق این رتبه بندی چندین مطالعه نشان داده اند که دارچین، میخک، فلفل^۱، آویشن، مرزنگوش و رزماری اثرات آنتی باکتریایی قوی داشته و اثرات بازدارندگی قوی در برابر باکتری های بیماری زا و فسادزا نشان داده اند [۱۹]. در تطابق با این یافته ها اسانس دارچین در این مطالعه اثرات بازدارندگی مناسبی در برابر چند باکتری فسادزا و بیماریزای گوشت نشان داد. در مطالعه *Ouattara* و همکاران [۱۹] نیز اثرات ضد باکتریایی بالای اسانس دارچین بر روی چند باکتری گرم مثبت و منفی تایید شده اند. فعالیت های ضد باکتریایی اسانس ها را به ترکیبات فرار نسبت داده اند [۲]. در مطالعه حاضر ۶۰/۴۱ درصد E-سینامالدهید و ۳/۱۹ درصد اوجنول مشاهده شد. همچنین سینامیک آلدهید به میزان ۳/۶۳ درصد مشاهده گردید. نتایج مطالعه *Shan* و همکاران بر روی باکتری های *S. L. monocytogenes*، *B. cereus* و *E. coli aureus* نشان داد، E-سینامالدهید خواص ضد باکتریایی قوی با طیف وسیعی از اثرات بازدارندگی در برابر ۵ باکتری آزمایش شده دارد [۲]. مطالعه *Ouattara* و همکاران [۱۹] نشان داد در اسانس هایی که اثرات بازدارندگی کمی داشتند، سینامالدهید و اوجنول نیز وجود نداشته و یا به میزان کمی وجود داشته است لذا عنوان کردند حضور سینامالدهید و اوجنول می تواند به طور مستقیم با خواص ضد باکتریایی مرتبط باشد. روش فعالیت اسانس ها در جلوگیری از فعالیت ریزسازواره ها متفاوت است. متداول ترین ترکیباتی که در اثر با دارندگی دخالت دارند ترکیبات فنولی اسانس ها هستند. ترکیبات فنولی آروماتیک مانند تیمول و کارواکرول در مرزنگوش و آویشن، اوجنول در میخک و دارچین و سینامیک آلدهید در دارچین شناسایی شده اند. این ترکیبات غشای دو لایه فسفولیپیدی سلول را حساس نموده و موجب افزایش نفوذپذیری و نشت اجزای ضروری داخل سلولی (مانند آهن، ATP، اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای

اسانس دارچین در ترکیب با فیلم‌ها و پوشش‌هایی که جهت نگهداری فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شوند در افزایش مدت ماندگاری بهره‌برد. لذا پیشنهاد می‌گردد آزمایش‌های بعدی جهت بررسی اثر این اسانس به تنهایی و یا در ترکیب با سایر پوشش‌ها بر ریز سازواره‌های طبیعی گوشت ماهی، مرغ و ... و اثر آن در افزایش ماندگاری این محصولات صورت پذیرد.

۴- منابع

- [1] Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffen, P. M. and Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infect. Dis.* 5, 607 - 625.
 - [2] Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. D. and Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (14): 5484 - 5490.
 - [3] Meng, J.H., Zhao, S.H., Doyle, M.P. and Joseph, S.W. (1998). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157: H7 and O157: NM isolated from animals, food, and humans. *Journal of Food Protection*, 61: 1511 - 1514.
 - [4] Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. D. and Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 112 - 119.
 - [5] Lis-Balchin, M. and Deans, S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 759 - 762.
 - [6] Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118-122.
 - [7] Ranasinghe, L., Jayawardena, B. and Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from
- آمینو) می‌شوند [۲، ۴، ۱۷ و ۲۰] و یا به سیستم آنزیمی باکتری‌ها آسیب می‌زنند [۲۰ و ۲۲]. اسانس‌های حاوی کارواکرول، اوچنول و تیمول رفتار ضد باکتریایی بالایی دارند [۱۷]. Suresh و همکاران مشاهده نمودند اوچنول اثرات ضد باکتریایی بالاتری در مقابل *Escherichia coli*، *Entrobacter sakazakii* و *Klebsiella pneumoniae* در مقایسه با چند آنتی‌بیوتیک مانند آمپی‌سیلین، اریترومايسین و سولفامتازول داشت [۲۳]. در میان ترکیبات غیر فنولی اسانس‌ها، نشان داده شده که سینامالدهید دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشد و احتمالاً از طریق اتصال گروه کربنیل با پروتئین‌ها عمل می‌کند و جلوی فعالیت آمینو اسید دکربوکسیلاز را می‌گیرد [۱۹ و ۲۰]. مشاهده شده که ترکیب آللیل‌هیدروکسی‌سینامات^۱ که کاملاً مشابه با سینامالدهید است قادر به مهار *P. fluorescens* از طریق کاهش محتوای انرژی سلولی آن می‌باشد [۱۹].
- در مطالعه‌ی حاضر اثرات بازدارندگی اسانس پوست دارچین بر باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزای گوشت تحت شرایط ویژه و کنترل شده بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد اسانس دارچین و ترکیبات ضد باکتریایی اصلی آن پتانسیل بالایی جهت استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی مواد غذایی دارند. اگر چه اسانس دارچین فعالیت ضد باکتریایی قوی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و فسادزای گوشت نشان داد، تعمیم این نتایج به سیستم‌های گوشتی باید همراه با احتیاط باشد. باکتری‌های موجود در گوشت ممکن است به طور محکم به سطح گوشت بچسبند و در نتیجه منجر به کاهش اثر اسانس شوند. ترکیبات پروتئینی و چربی گوشت نیز ممکن است با اجزای فعال ترکیبات ضد باکتریایی همانطور که توسط Devlieghere و همکاران گزارش شده، برهم کنش دهند [۲۴]. از طرفی اثری که دارچین ممکن است بر عطر و طعم فرآورده گوشتی داشته باشد را نیز باید با انجام آزمون‌های حسی مورد توجه قرار داد. لذا با در نظر داشتن همه‌ی این نکات شاید بتوان از

1. allylhydroxycinnamates

- [16] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *J. Agric. Food Chem*, 55: 7879 – 7885.
- [17] kim, j.m., marshall, m. r. and wei, c. i. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2839 – 2845.
- [18] Shahnazi, S., Khalili Sigaroudi, F., Ajni, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M. and taghizad, F. (2007). Investigation of chemical composition and antimicrobial properties *Thymus trautvetteri* essential oil. *Journal of Medicinal plants*, 23:80 – 88.
- [19] Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.-P., Be'gin, A., (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37: 155 - 162.
- [20] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223 - 253
- [21] Holley, R. A. and Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials (Review). *Food Microbiology*, 22: 273 - 292.
- [22] Wendakoon, C.N. and Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58 (3): 280 - 283.
- [23] Suresh, P., Ingle, V. K. and Vijayalakshmi, V. (1992). Antibacterial activity of Eugenol in comparison with other antibiotics. *J. food Sci. Technol*, 29:254 - 256.
- [24] Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere J.(2004). Chitosan: Antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables, *Food Microbiology*, 21: 703 - 714.
- banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 208-211.
- [8] Alzoreky, N.S. and Nakahara, K.(2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80:223 - 230.
- [9] Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). 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*, 18: 414 - 420.
- [10] Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1 - 93.
- [11] Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., and Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 180 - 185.
- [12] Zhang, H., Kong, B., Xiong, Y. L. and Sun, X. (2008). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, in press.
- [13] Lebert, I., Begot, C., and Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25°C). *International Journal of Food Microbiology*, 39: 53 - 60.
- [14] Sakala, R. M., Kato, Y., Hayashidani, H., Murakami, M., Kaneuchi, C., and Ogawa, M. (2002). *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52: 1151 - 1154.
- [15] Samelis, J., Kakouri, A., and Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. *Food Microbiology*, 17, 329 - 340.

Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria

Ojagh, S. M.¹, Rezaei, M.^{2*}, Razavi, S. H.³, Hosseini, S. M. H.⁴

1- Ph. D. Student, Dept. of Fisheries, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2- Associate prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

3- Associate prof., Dept. of Food Science and Engineering, Collage of Agriculture, University of Tehran

4- Ph. D. Student, Dept. of Food Science and Engineering, Collage of Agriculture, University of Tehran

(Received: 88/7/17 Accepted:88/10/12)

The chemical composition of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* (Nees) that has been used in food industries were analysed by GC–MS and 21 components were detected. The major component characterized in the essential oil was E-cinnamaldehyde (60.41%). The other components were linalool (6.46%), Ortho methoxy cinnamic aldehyde (3.63%), β caryophyllene (3.5%), 1, 8-cineole (3.32%), Eugenol (3.19%) and etc. The antimicrobial activity including minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of cinnamon essential oil were evaluated against five food born pathogenic and spoilage bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei*. The MICs of cinnamon essential oil against *L. sakei* and the other bacteria were observed 250 and 500 μ g/ml respectively. The MBC of cinnamon essential oil against *Pseudomonas fluorescens* and *Lactobacillus sakei* was 1000 μ g/ml. The MBCs for the other bacteria were more than 1500 μ g/ml.

Key words: Cinnamon bark essential oil, *Cinnamomum zeylanicum*, Antibacterial activity, Pathogenic bacteria

*Corresponding Author E-Mail address: Rezai_ma@modares.ac.ir