

# مطالعه تأثیر ضد میکروبی روغن‌های فرار برخی گیاهان بر باکتری *E. coli* در پنیر سفید ایرانی

گیتی کریم\* و مجتبی بنیادیان<sup>۱</sup>

۱- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۲- استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد

## چکیده

هدف از طرح مطالعه مداخله‌ای همراه با شاهد ارزیابی اثر ضد میکروبی روغن‌های فرار برخی گیاهان در پنیر می‌باشد و گیاهان مورد مطالعه، نعناع، ترخون، زیره، پونه و آویشن<sup>۱</sup> بودند که روغن‌های فرار آنها با استفاده از بخار آب استخراج گردید و دو غلظت از روغن فرار هر گیاه مورد استفاده قرار گرفت. (اویشن، ۰/۱ و ۰/۲ درصد و سایر گیاهان ۰/۳ و ۰/۴ درصد).

در این روش از غلظتهای مورد نظر روغن‌های فرار گیاهان در پنیرهای پاستوریزهای کلیفرم منفی بودند استفاده شد و سپس تعداد  $10^7$  گیاهان در *E. coli* به پنیرها تلقیح گردید، همزمان، به تعداد نمونه‌ها پنیرهای نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شدکه فاقد روغن فرار گیاهان بودند ولی به همان تعداد باکتری به آنها تلقیح شد. نمونه‌ها به همراه شاهدها در دمای  $12^\circ\text{C}$  به مدت یک هفته نگهداری شدند و در زمانهای ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت از نظر باکتری تلقیح شده مورد شمارش قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل آماری با مقایسه گروههای مورد آزمون از طریق آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشانگر بالاترین اثر ضد میکروبی تلقیح شده در پنیر در روغن‌های فرار گیاه آویشن بود به طوری که غلظت ۰/۱ و ۰/۲ درصد پس از گذشت ۱۶۸ ساعت موجب کاهش باکتری به میزان سه و چهار  $\log_{10}$  نسبت به گروه شاهد شد. پس از آویشن روغن‌های فرار گیاهان نعناع، زیره و پونه اثر تغییریاً یکسانی بر باکتری تلقیح شده نشان دادند به نحوی که پس از گذشت ۱۶۸ ساعت در غلظتهای ۰/۳ و ۰/۴ درصد کاهش باکتری به میزان ۲ و  $2/5 \log_{10}$  نسبت به گروه شاهد ایجاد شد. کمترین اثر بر باکتری تلقیح شده در پنیر را روغن‌های فرار گیاه ترخون نسبت به سایر گیاهان از خود نشان داد و پس از گذشت ۱۶۸ ساعت کاهش باکتری به میزان ۱ و  $1/5 \log_{10}$  به ترتیب در غلظتهای ۰/۳ و ۰/۴ درصد نسبت به گروه شاهد موجب شد. نتیجه‌گیری کلی نشان داد که از ترکیبات یاد شده به عنوان یک نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در پنیر و سایر مواد غذایی با توجه به اثر ضد میکروبی مناسب روغن‌های فرار گیاهان بررسی شده در پنیر، می‌توان استفاده کرد.

**کلید واژگان:** روغن‌های فرار گیاهان، نگهدارنده طبیعی، پنیر سفید

[۱، ۲]. این امر به دلیل شناخت اثرات زیان‌بار ترکیبات طعم دهنده و نگهدارنده شیمیایی است که به طور گستره‌ای در انواع غذاهای فرآوری شده و آماده مصرف استفاده می‌شود. در بین ترکیبات طبیعی که می‌توانند در مواد غذایی نگهدارنده محسوب شوند به گیاهان و مشتقان آنها بیشتر از سایر ترکیبات طبیعی توجه شده و مطالعاتی بر گیاهان و اثرات ضد میکروبی و خاصیت طعم بخش آنها به مواد غذایی بر حسب نوع عادات غذایی و فرهنگهای مختلف در کشورهای گوناگون انجام گرفته و محصولاتی نیز از این نوع به بازار عرضه شده است. در دو دهه گذشته اثرات ضد میکروبی گیاهان و ترکیبات آنها مورد توجه

## ۱- مقدمه

در دو دهه اخیر به استفاده از مواد نگهدارنده و طعم دهنده طبیعی در مواد غذایی رویکرد وسیعی شده است به طوری که حتی در برخی از کشورها تمایل مصرف کنندگان به استفاده از غذاهای حاوی مواد نگهدارنده یا طعم دهنده ساختگی، کاهش یافته است

\* مسؤول مکاتبات مقاله [gkrim@chamran.ut.ac.ir](mailto:gkrim@chamran.ut.ac.ir)

1. *Mentha piperita*
2. *Artemisia dracunculus*
3. *Carvi carum*
4. *Mentha pulegium*
5. *Thymus vulgaris*

بررسی به عنوان نگهدارنده طبیعی بوده است.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- روغن‌های فرار گیاهان

روغن‌های فرار گیاهان مورد مطالعه با همکاری پژوهشکده دارویی جهاد دانشگاهی به روش تقطیر با بخار آب<sup>۱</sup> و به وسیله دستگاه کلونجر<sup>۹</sup> تهیه شد [۱۱]. برای این منظور گیاهان مورد مطالعه در فصل بهار جمع‌آوری شدند و پس از خشک کردن آنها در سایه، روغن‌های فرار استخراج گردید. این روغنها در ظروف شیشه‌ای تیره سترون شده تا موقع مصرف در دمای ۴°C نگهداری شدند.

### ۲-۲- پنیر

پنیر مورد استفاده در این مطالعه به وسیله کارخانه پنیر سازی شاهد شهرکرد با استفاده از شیر پاستوریزه تهیه می‌شد؛ برای به حداقل رساندن تأثیر نمک موجود در پنیر روی باکتری، از آب نمک ۸ درصد برای تولید این پنیرها استفاده گردید.

### ۲-۳- باکتری مورد مطالعه

در این مطالعه از باکتری *E. coli K ۱۲* (تهیه شده از گروه میکروب شناسی دانشگاه بریستول انگلستان) استفاده شد. برای انجام آزمون از تعداد ۱۰<sup>۷</sup> باکتری در هر میلی‌لیتر استفاده شد، به این منظور باکتری در دو نوبت متوالی به فواصل ۲۰ و ۲۴ ساعت در محیط کشت آبگوشت مغذی کشت و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه گذاری شد. از کشت ۲۰ ساعته رقت تهیه و به روش کشت سطحی روی پلیت، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر محاسبه گردید و تعداد مورد نیاز (۱۰<sup>۷</sup> / ml) به دست آمد. همچنین به وسیله اسپکتروفوتومتر، جذب نوری کشت ۲۰ ساعته باکتری که تعداد میکروارگانیسم در آن تعیین شده بود، در طول موج ۶۰۰ nm اندازه‌گیری شد که از آن در مراحل بعدی آزمون برای کالیبره کردن باکتری استفاده گردید.

## ۳- روش کار

ابتدا پنیر با آب نمک ۸ درصد تولید شد و پنیرهایی که از نظر باکتریهای کلیفرم منفی بودند برای شرکت در مطالعه در نظر گرفته شدند. سپس غلظتها مورد نظر روغن‌های فرار گیاهان

بسیاری از محققین قرار گرفته است. اغلب مطالعات در محیط کشت باکتری یا قارچ انجام شده و در سیستمهای غذایی، مطالعه کمتری صورت گرفته است. در ایران با وجود استفاده زیاد از گیاهان سنتی به عنوان طعم دهنده، کمتر پیرامون خواص گیاهان بومی مطالعه شده است. در این میان، اثر ضد میکروبی سیر بیشتر از سایر گیاهان بررسی شده و علت اصلی خاصیت ضد میکروبی آن به ترکیبات سولفوره موجود گیاه نسبت داده است [۳]. طی مطالعه کومار و همکاران مشخص شد سیر بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر باکتری اشريشياکلی دارد [۴]. همچنین در مطالعه دیگری اثر ضد قارچی بیشتر سیر تازه نسبت به سیر کهنه مشاهده گردید [۵].

دل کامپو و همکاران (۲۰۰۰) خاصیت ضد میکروبی گیاه مریم گلی را بررسی کردند [۶]، احمد و همکاران (۲۰۰۱) پس از بررسی تأثیر عصاره ۴۵ گیاه سنتی روی برخی از باکتریها و قارچهایی که نسبت به آنتی بیوتیک مقاوم بودند، اثر ضد باکتریایی ۴۰ نوع از آنها و اثر ضد قارچی ۲۴ نوع از آنها را مشاهده کردند. اثر کشندگی عصاره آویشن بر ویریوپاراهمولیتیکوس<sup>۱</sup> نیز مشاهده شده است [۷]. همچنین روغن گیاهانی مانند گشنیز و ریحان از رشد باکتریهایی مثل یرسینیا، لیستریا، استافیلوکوکوس اوریوس<sup>۲</sup> و اشريشياکلی ممانعت می‌کند [۸]. عصاره الکلی بعضی از گیاهان تیره ترخون رشد باکتریهای مانند اشريشياکلی، استافیلوکوکوس اوریوس و باسیلوس سوبتیلیس<sup>۳</sup> را مهار می‌کند [۹]. عصاره گیاه ترخون از رشد کلستریدیوم پرفانشنس<sup>۴</sup> در غذا ممانعت می‌کند [۱۰]. ماروتی و همکاران (۱۹۹۴) اثر ضد قارچی خوبی از عصاره روغنی گیاه پونه بر قارچ آسپرژیلوس نایگر<sup>۵</sup> مشاهده کردند [۲]. مطالعه حاضر با هدف بررسی نحوه تأثیر عصاره (روغن‌های فرار) گیاهان ترخون، نعناع، پونه، زیره و آویشن بر باکتری اشريشياکلی صورت گرفت. میکروارگانیسم مورد مطالعه موجب بادکردگی زود هنگام در پنیر سفید ایرانی می‌شود که میان شرایط غیر بهداشتی در تولید پنیر است، ضمن اینکه اشريشياکلی شاخص بهداشتی در بسیاری از غذاها از جمله فرآورده‌های شیر می‌باشد. اهداف دیگر این مطالعه ایجاد تنوع در طعم و مزه پنیرهای سفید ایرانی و همچنین امکان استفاده از گیاهان مورد

1. *Vibrio parahemolyticus*

2. *Yersinia*

3. *Listeria*

4. *Staphylococcus aureus*

5. *Bacillus subtilis*

6. *Clostridium perfringens*

7. *Aspergillus niger*

پنیر نشان دادند؛ به طوری که روغن گیاهان زیره، نعناع و پونه، اثر متوسط و روغن گیاه ترخون اثر ضعیفتراز نسبت به سایر گیاهان در کاهش تعداد باکتری تلقیح شده از خود نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده، روغن نعناع با غلظت  $0/3$  درصد پس از یک هفته دو  $\log$  و با غلظت  $0/4$  درصد  $2/5 \log$  نسبت به گروه شاهد کاهش بیشتری در تعداد باکتری تلقیح شده در پنیر نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۴). این نتایج برای روغن گیاه زیره به ترتیب  $2$  و  $2/3 \log$  و برای گیاه پونه  $1$  و  $2 \log$  محاسبه شد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۱ و ۵). همانگونه که ذکر شد روغن گیاه ترخون کمترین تأثیر را در کاهش تعداد باکتری *E. coli* داشت به طوری که پس از یک هفته در غلظت  $0/3$  درصد یک  $\log$  و در غلظت  $0/4$  درصد  $1/5 \log$  کاهش نسبت به گروه شاهد در تعداد باکتری تلقیح شده مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ) (شکل ۲).

(برای هر کدام دو غلظت) در  $100\text{ g}$  پنیر ایجاد شد (آویشن  $1/0$  و  $2/0$  درصد و سایر گیاهان  $0/3$  و  $0/4$  درصد). این غلظتها بر اساس حداقل غلظت مهار کننده (MIC)<sup>۱</sup> هر یک از روغنها فرار در نظر گرفته شد [۱۲]. در هر گروه و برای هر غلظت  $25$  بسته  $100\text{ g}$  گرمی پنیر در نظر گرفته شد. همزمان  $25$  بسته  $100\text{ g}$  گرمی پنیر که فاقد روغنها شده در عنوان شاهد انتخاب شد. سپس به تیمارها و شاهدها، باکتری *E. coli* به میزان  $10^7 \text{ g}$  باکتری در هر گرم تلقیح شد و بعد از دوخته شدن، بستهها با دست کاملاً یکنواخت گردید. گروههای تیمار و شاهد به مدت یک هفته در دمای  $12^\circ\text{C}$  نگهداری شد و سپس در زمانهای  $24$ ،  $48$ ،  $72$  و  $168$  ساعت پس از تلقیح از نظر تعداد باکتری تلقیح شده، با تهیه رقت و کشت روی محیط VRBA به روش مخلوط و دو لایه شمارش شد.

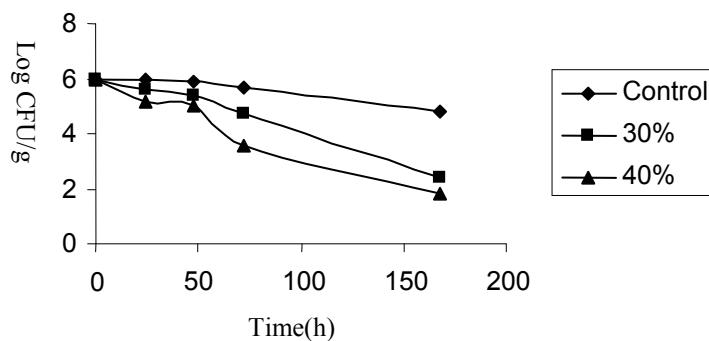
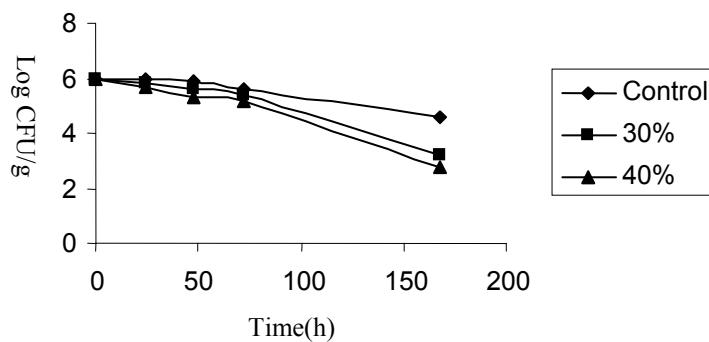
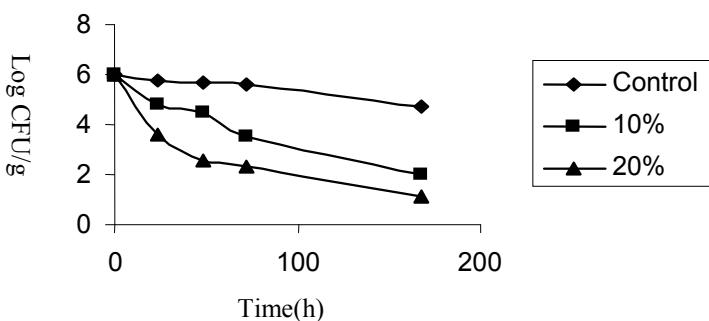
اطلاعات به دست آمده از شمارش باکتری در گروههای تیمار و شاهد به وسیله نرم افزار SPSS و با روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) تجزیه و تحلیل آماری شد.

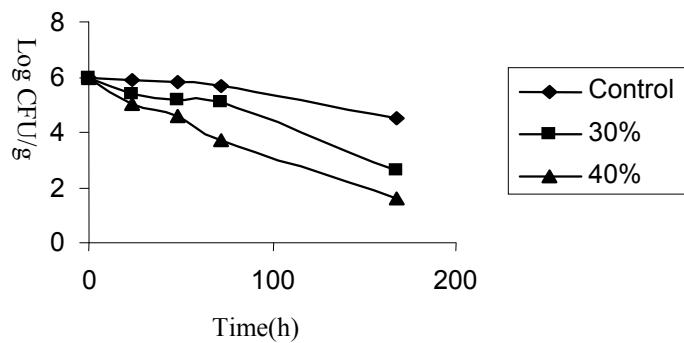
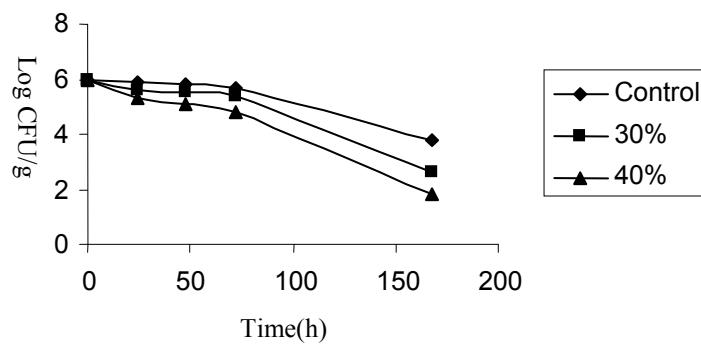
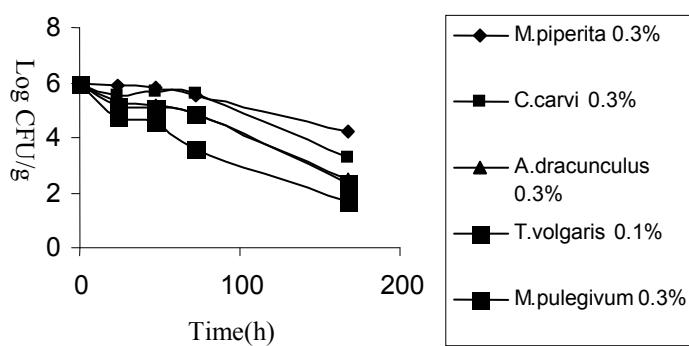
## ۴- نتایج و بحث

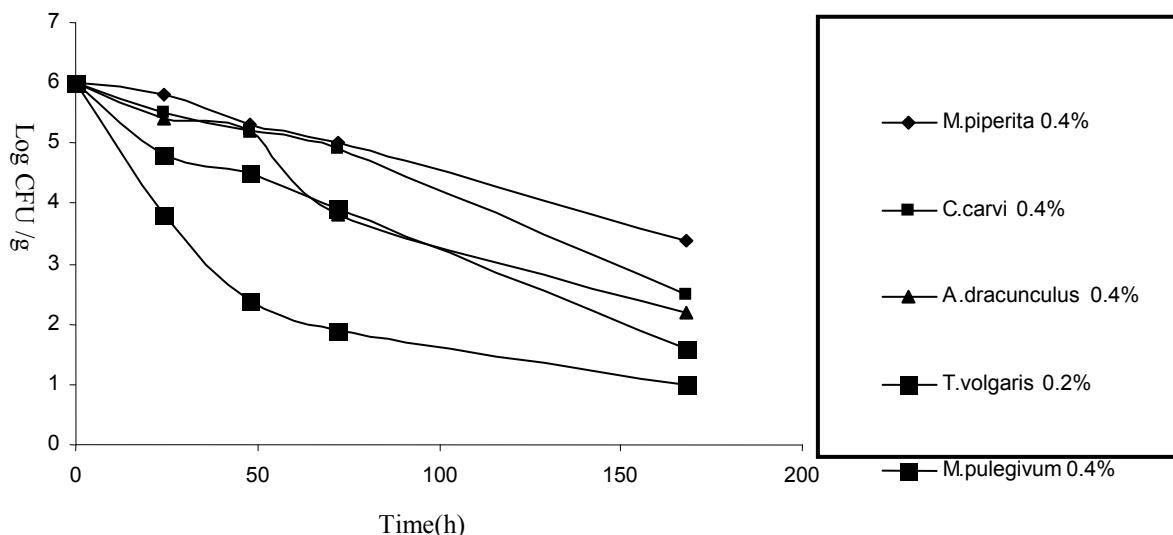
نتایج این مطالعه نشان می دهد که روغنها فرار گیاهان مورد مطالعه، تعداد باکتری *E. coli* را در گروههای تیمار نسبت به گروه شاهد به طور معناداری کاهش داده است.

روغن فرار آویشن با وجود اینکه با غلظت کمتری استفاده شده بود اثر ضد میکروبی قوی تری از خود نشان داد [۱۲]. به طوری که پس از یک هفته در گروههای تیمار با غلظت  $0/1$  درصد سه  $\log$  و با غلظت  $0/2$  درصد چهار  $\log$  کاهش در تعداد باکتری تلقیح شده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳). در مقایسه با سایر گیاهان نیز غلظتها بکار رفته روغن فرار گیاه آویشن پس از یک هفته تأثیر بیشتری در کاهش تعداد باکتری تلقیح شده در پنیر نشان داد به طوری که غلظت  $0/1$  درصد روغن فرار این گیاه نسبت به غلظت  $0/3$  درصد روغنها فرار زیره، نعناع، پونه و ترخون به ترتیب  $0/7$ ،  $0/5$  و  $1/6 \log$  کاهش بیشتری در تعداد باکتری دارد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۶). همچنین غلظت  $0/2$  درصد روغن فرار گیاه آویشن در مقایسه با غلظت  $0/4$  درصد روغنها گیاهان نعناع، زیره، پونه و ترخون به ترتیب  $1/2$ ،  $1/5$  و  $2 \log$  کاهش بیشتری در تعداد باکتری *E. coli* در پنیر نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۷). روغن فرار سایر گیاهان استفاده شده در این مطالعه نیز اثرات ضد میکروبی در

10. Minimun inhibitory concentration

شکل ۱ تأثیر عصاره گیاه زیره روی باکتری *E. coli* در پنیرشکل ۲ تأثیر عصاره گیاه ترخون روی باکتری *E. coli* در پنیرشکل ۳ تأثیر عصاره گیاه آویشن روی باکتری *E. coli* در پنیر

شکل ۴ تأثیر عصاره گیاه نعناع روی باکتری *E. coli* در پنیرشکل ۵ تأثیر عصاره گیاه پونه روی باکتری *E. coli* در پنیرشکل ۶ مقایسه تأثیر غلظت اول عصاره گیاهان روی باکتری *E. coli* در پنیر

شکل ۷ مقایسه تأثیر غلظت دوم عصاره گیاهان روی باکتری *E. coli* در پنیر

می رسد پونه به عنوان مهار کننده رشد میکرووارگانیسمهای گرم منفی قابل استفاده باشد.

مطالعه بر تأثیر روغنهاي فرار گیاهانی مثل آویشن و زیره بر باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، اثر مهار کننده‌گی بیشتر این گیاهان را بر باکتریهای گرم مثبت نشان داده است [۱۷]. با توجه به گرم منفی بودن باکتری اشريشياکلي می‌توان انتظار داشت که در برابر عصاره گیاهان مقاومت بیشتری داشته باشد. با توجه به بررسی کمتر عصاره گیاهان و خواص نگاهدارنده‌گی آنها در سیستمهای غذایی و ارتباط بیشتر مطالعات با تأثیر عصاره‌ها در محیط‌های میکروب شناسی، در این مطالعه از پنیر به عنوان یک سیستم غذایی استفاده شد. بنابر مشاهدات در این آزمایش امکان استفاده از غلظنهای عصاره‌ها در حدود MIC یا کمتر از آن در محیط آبگوشت در پنیر وجود داشت. این امر را می‌توان به وجود نمک در پنیر و pH آن مربوط داشت. این مسئله در مطالعه انجام شده در مورد عصاره گیاه مریم گلی در محیط آبگوشت، برنج پخته و گوشت پخته بر باسیلوس سریوس<sup>1</sup>، استافیلوکوکوس اوریوس و سالمونلاتیفی موریوم<sup>2</sup> به اثبات رسیده است یا به عبارت دیگر، بنابر مشاهدات، وجود نمک و آب در غذا حساسیت باکتریها را نسبت به عصاره گیاه افزایش می‌دهد [۶]. علاوه بر این مشاهده شد که عصاره گیاهان در محیط اسیدی تأثیر بیشتری بر روی باکتریها دارد [۱۸-۱۶]. pH پایین و میزان نمک بالا قادر است اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان را تقویت

مطالعه روی خاصیت ضد میکروبی گیاهان و عصاره آنها در کشورهای مختلف، انجام شده که از گونه‌های مختلف گیاهی برای طعم بخشی و نگهداری بر اساس فلور گیاهان بومی مناطق مختلف و کامپذیری مردم استفاده شده است. در مطالعه روی عصاره زیره، مشاهده شد عصاره روغنی این گیاه بر رشد باکتری *E. coli* در غلظت ۱/۰ درصد اثر مهار کننده دارد [۱۳]. که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در مطالعه‌ای که به وسیله Hammer و همکاران در سال ۱۹۹۹ روی عصاره روغنی گیاه آویشن صورت گرفت، ممانعت رشد اشريشياکلي در محیط آبگوشت در غلظت ۰/۳ درصد این عصاره، مشاهده شد [۱۴]. در این مطالعه با توجه به اینکه از عصاره آویشن روی پنیر استفاده گردید، این تأثیر در غلظت کمتری دیده شد که ممکن است به دلیل وجود سایر عوامل بازدارنده در محیط غذایی باشد.

بررسی اثر ضد میکروبی گیاهان تیره ترخون نشان داد عصاره الكلی این گیاه در غلظت ۵۰۰ mg/ml از رشد اشريشياکلي ممانعت می‌کند [۱۵]. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حساسیت اشريشياکلي نسبت به عصاره روغنی گیاه ترخون به گونه‌ای بوده است که باکتری در غلظت ۰/۳ درصد عصاره این گیاه یک log و در غلظت ۰/۴ درصد log ۱/۵ کاهش داشته است. در مطالعه‌ای که در مورد چکونگی تأثیر عصاره گیاه پونه بر ویريوپاراهمولیتیکوس صورت گرفت مهار رشد این باکتری با عصاره گیاه مشاهده شد [۱۶]. در مطالعه حاضر عصاره پونه در غلظت ۰/۴ درصد از رشد اشريشياکلي جلوگیری کرد. به نظر

1. *Bacillus cereus*2. *Salmonella typhimurium*

راهکارهای مناسب برای تنوع تولیدات شیر و بالا بردن کیفیت آنها و در نتیجه ایجاد بازارهای جدید در منطقه باشد.

## ۵- سپاسگزاری

این مطالعه با پشتیبانی مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و کارخانه شاهد شهرکرد انجام گرفته است. وظیفه خود می‌داند از کمکهای حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران سپاسگزاری کند. از همکاران محترم در پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی برای مشاوره‌های ذیقیمتی که فرمودند بی‌نهایت متشرک است. همکاری صمیمانه همکاران ارجمند در کارخانه شهرکرد را ارج نهاده و از گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به خاطر امکان تهیه میکروگرانیسم مورد مطالعه سپاسگزاری می‌نماید.

کند [۶]. تأثیر عصاره گیاهان بر اسربیشیاکلی را به افزایش ویژگی آب گریزی ترکیبات سطحی سلولهای باکتری نسبت می‌دهند زیرا به این ترتیب از اتصال باکتری به سلولهای میزبان جلوگیری می‌شود [۹].

با توجه به تأکید بسیاری از پژوهشگران بر استفاده از مواد نگاهدارنده طبیعی [۱۱، ۱۹]. این مطالعه، به عنوان کوششی در جهت به کارگیری گیاهان برای ایجاد طعم در پنیر و بهره‌گیری از اثر ضد میکروبی این مواد- که علاوه بر دو خاصیت پیش گفته امکان کاستن از میزان نمک در پنیر را فراهم می‌آورند- انجام شد. علاوه بر این کاهش میزان نمک در پنیرهای معطر و طعم دار می‌تواند گامی در جهت سلامت افراد در معرض خطر بیماریهای قلبی عروقی نیز باشد. تنوع در طعم پنیر سفید ایرانی صادرات این فرآورده را به کشورهای دیگر نیز افزایش دهد. به این منظور تولید پنیر سفید با استفاده از عصاره گیاهان مختلف بر اساس ذایقه و کامپذیری جامعه مصرف کننده می‌تواند یکی از

## ۶- منابع

- [1] Hirokodo, Hirata K, Uematsu Y. 1996. Survey on the quality of natural preservatives used in food processing. Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health 47: 157–181.
- [2] Marotti, M. Piccaglia, R Giovanelli, E. 1194. Effect of planting time and mineral fertilization on peppermint essential oil composition and its biological activity. Flavour and Fragrance Journal. 9: 899–902.
- [3] Naganawa, R. Iwata, N. Ishikawa, K. 1996. Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur- compound derived from garlic. Applied and Environmental Microbiology. 62: 4238–42.
- [4] Kumar, M. Berwal, J.Z.S. 1998. Sensitivity of food pathogens to garlic. Journal of Applied Microbiology. 84: 213–215.
- [5] Shelef, L.A. Jerothi, E.K. 1984. Growth of entropathogenic and spoilage bacteria in sage – containing broth and foods. Journal of Food Science. 94: 737–740.
- [6] Del Campo, J. Amato, M.J. Nguyen, C. 2000. Antimicrobial effect of Rosemary extracts. Journal of Food Protection. 63: 1359–63.
- [7] Ahmad, I. Beg, A.Z. 2001. Antimicrobial and photochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multidrug resistant human pathogens. Journal of Ethnopharmacol. 74: 113–123.
- [8] Elgayar, M. Draughon, F.A. Golden, D.A. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. Journal of Food Protection. 64: 1019–204.
- [9] Turi, M. Koljalgs, S. Milelsaar, M. 1997. Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *E. coli* strains of different origin. APMIS 105: 956–962.
- [10] Dong, Jin. Kwon, Jong. Hyun, Park. 1997. Optimal extracting condition of growth inhibitory component of *Artemisia princeps* against *C. perfringens*. Agricultural Chemistry and Biotechnology 40: 267–70.
- [11] Walton, M.G. Brown, D.E. 1999. Chemical from plants. Imperial college press 106–108. London
- [۱۲] بنیادیان، م و کریم، گ؛ مطالعه تأثیر روغنها فرار برخی گیاهان بر باکتریهای *E. coli* و *S. aureus* در محیط کشت مایع، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)؛ دوره ۵۷، شماره ۴.
- [13] Farag, R.S. Daw, Z.Y. Hewedi, F.M. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection. 52: 65–667.

- [14] Hammer, K.A. Carson, C.f. Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 985–90.
- [15] Smither, G.W. Ballard, FJ. Copland, AD. 1996. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 79: 454–59.
- [16] Beuchat, L.R. 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spice and organic acids. *Journal of Food Science*. 41: 899–902.
- [17] Farag, R.S. Taha, SH. 1990. Use of some essential oils as natural perservatives for butter. *Journal of American oil chemists Society*. 97: 188–191.
- [18] Patrick, F. 2000. *Fundamentals of cheese science*. Wolf Publocation.
- [19] Herve, M. Elstathiou, T. Quiblier, JP. 1992. Natural perservative for semi soft processed cheese. *Process Magajine* 1069: 24–29.