

# بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضد میکروبی روغن فرار گیاه رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوزیم، علیه لیستریا مونوسیتوژنز

## چکیده:

**مقدمه و هدف:** رزماری از خانواده نعناع و لیزوزیم به عنوان عامل ضد باکتری طبیعی در میکروبی شناسی غذا مورد توجه می‌باشند. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات و بررسی اثرات ضد لیستریایی روغن فرار رزماری به تنهایی و به صورت ترکیب با لیزوزیم جهت ارتقای اثرات ضد لیستریایی دو ماده مذکور و استفاده از نتایج حاصل از این بررسی به منظور تعمیم در مدل‌های غذایی و تبدیل این روش‌های آزمایشگاهی به روش کاربردی در خط تولید مواد غذایی در آینده صورت پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه ارومیه انجام شد. پس از شناسایی گیاه رزماری، روغن فرار به روش تقطیر با آب استخراج و ترکیبات آن با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی شناسایی گردید. فعالیت ضد باکتریایی روغن فرار علیه لیستریا مونوسیتوژنز به تنهایی و به صورت ترکیبی با لیزوزیم در pH های ۵، ۶ و ۷ به روش رقت‌سازی میکروبراث بر اساس تعیین حداقل غلظت بازدارنده در سه بار، تکرار و محاسبه میانگین ارزیابی گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** ۹۸/۰۵ درصد ترکیبات روغن رزماری شناسایی گردید. ترکیبات اصلی شامل: آلفا-پینن، ۱ و ۸-سینئول، وربنون، کامفر، بورنئول، ۳-اکتانون، کامفن و لینالول بود. ممانعت از رشد روغن رزماری علیه باکتری در pH=۵ بارزتر و حداقل غلظت ممانعت کننده برابر با ۲۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت ممانعت کننده در pH=۵ برابر ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در pH=۷ ممانعتی دیده نشد. لیزوزیم تیمار شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در pH مذکور، حداقل غلظت بازدارنده را به ۱۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تقلیل داد.

**نتیجه‌گیری:** روغن رزماری با ترکیب شیمیایی شناخته شده به تنهایی و به طور ترکیبی با لیزوزیم معمولی و تیمار شده علیه لیستریا مونوسیتوژنز ممانعت کننده می‌باشد. ترکیب لیزوزیم و به خصوص لیزوزیم تیمار شده با روغن رزماری، اثر ضد لیستریایی را افزایش می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** روغن فرار رزماری، لیزوزیم، لیستریا مونوسیتوژنز

دکتر سید سیاوش ساعی دهکردی \*

دکتر حسین تاجیک \*\*

دکتر مهران مرادی \*\*\*

دکتر افشین جعفری دهکردی \*\*\*\*

سارا قاسمی \*\*\*\*\*

\* دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، استادیار دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام

\*\* دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشیار دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی

\*\*\* دانشجوی دکترای بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی

\*\*\*\* دکترای بیماری‌های داخلی دام‌ها، استادیار دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی \*\*\*\*\* کارشناس ارشد علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، انستیتو تغذیه و علوم غذایی

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۷/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۵

مؤلف مسئول: سید سیاوش ساعی دهکردی

پست الکترونیک: smazdak@yahoo.com

## مقدمه

ابرنیکی بالا و یخبندان حساس است و واریته‌های مقاوم به یخبندان آن وجود ندارد(۴). روغن فرار رزماری معمولاً از طریق تقطیر با آب<sup>(۵)</sup> یا با بخار<sup>(۶)</sup> حاصل می‌گردد، هر چند استخراج با حلال فوق بحرانی<sup>(۷)</sup> با استفاده از دی‌اکسیدکربن هم در عمل دارای کاربرد است(۶ و ۵).

روغن فرار رزماری را می‌توان به عنوان تثبیت‌کننده چربی‌ها، روغن‌ها و غذاهای حاوی چربی و کره در برابر اکسیداسیون و تند شدگی و در گوشت‌های تخمیری به کار گرفت (۹-۷). فعالیت ضد میکروبی روغن فرار رزماری علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها مثل؛ استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کولای و پseudomonas آئروژینوزا گزارش شده است (۱۰).

لیزوزیم به عنوان یک آنزیم توانایی لیز نمودن سلول‌های باکتریایی را داراست(۱۱) و به طور کلی باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود لایه لیپوپروتئین- لیپوپلی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره سلولی آنها در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت مقاومت بیشتری در برابر آن دارند(۱۲ و ۱۳). لیزوزیم در محصولات غذایی ویژه مانند پنیرهای سخت برای ممانعت از تورم دیررس و به عنوان نگهدارنده در محصولات دریایی، سبزیجات،

باتوجه به این که هنوز هم بیماری‌های دارای خاستگاه غذایی در برخی از کشورهای در حال توسعه به عنوان یک موضوع نگران کننده مطرح هستند و با در نظر گرفتن اقبال جهانی به استفاده از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی مطمئن‌تر در مقایسه با نگهدارنده‌های شیمیایی، تمرکز به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی که عموماً به عنوان سالم و بی‌خطر<sup>(۱)</sup> شناخته می‌شوند، ضروری به نظر می‌رسد(۱).

روغن‌های فرار(اسانس) موادی با ویژگی‌های ضد اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی و دافع حشرات و آفات محسوب می‌گردند(۲).

گیاه رزماری از خانواده نعناع، گیاهی مترامک، همیشه سبز و سخت، پایا و آروماتیک، دارای ۹۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر ارتفاع و برگ‌های کوچک نوک تیز (۲-۴ سانتی‌متر)، چسبناک و پرزدار است. کلمه رزماری از واژه لاتین رزمارینوسبه به معنی ژاله دریا<sup>(۲)</sup> مشتق شده است. هم‌چنین از آن به عنوان آنتوس<sup>(۳)</sup> نیز یاد می‌شود که در یونان باستان به معنی گل برتر بوده است و خاطر بخور خوشبوی آن تحت عنوان لیبانوتیس<sup>(۴)</sup> نیز نامیده شده است. رزماری را می‌توان به صورت یک محصول مزرعه‌ای تولید کرد. گیاه در خاک‌های با زهکشی مناسب با pH حدود ۶/۵ تا ۷ و تحت شرایط آب و هوای گرم و آفتابی رشد می‌کند(۳). گیاه به آب و هوای دارای

1-Generally Recognized as Safe  
2-Sea dew  
3-Antos  
4-Libanotis  
5-Hydrodistillation  
6-Steam Distillation  
7-Super Critical Solvent Extraction

آبگیری آن استفاده شد و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری گردید. جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی<sup>(۲)</sup> استفاده گردید. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات با استفاده از برنامه کتابخانه نرم‌افزاری وایلی<sup>(۳)</sup> دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی صورت پذیرفت (۱۵).

از روغن فرار به دست آمده از گیاه رزماری غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. به منظور افزایش حلالیت و پخش یکنواخت ذرات روغن فرار در محیط کشت برات، از دی‌متیل‌سولفوکساید<sup>(۴)</sup> با غلظت حجمی ۵ درصد به عنوان کمک حلال استفاده گردید (۱۶).

برای تهیه محلول لیزوزیم ابتدا محلولی از فسفات پتاسیم ۶۶ میلی‌مولار با pH برابر ۶/۲۴ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. برای تنظیم pH از محلول هیدروکسید پتاسیم استفاده شد. سپس غلظت‌های ۸۰، ۱۶۰، ۳۲۰، ۶۴۰ و ۱۲۸۰ میکروگرم پودر لیزوزیم به ازای میلی‌لیتر در حجم نهایی هر چاهک (۱۸۰ میکرولیتر) تهیه گردیدند. لازم به ذکر است که پس از تهیه پنج محلول ذخیره با غلظت‌های

میوه‌جات و نیز به عنوان جزئی از اجزای تشکیل دهنده محصولات دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴).

هدف از مطالعه حاضر شناسایی ترکیبات موجود در روغن فرار گیاه رزماری و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن بر روی لیستریا مونوسیتوژنز به عنوان یکی از خطرناک‌ترین باکتری‌ها با خاستگاه غذایی بود. در این مطالعه روغن فرار گیاه به تنهایی و در ترکیب با آنزیم لیزوزیم به عنوان یک نگهدارنده غذایی دارای خاستگاه طبیعی، تحت شرایط گوناگون pH، جهت یافتن یک ترکیب ضد باکتریایی مؤثر از دو ماده یاد شده و جایگزینی ترکیب مذکور به جای تیمارهای تخریب‌گر حرارتی و نگهدارنده‌های زیان‌آور شیمیایی در غذا مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در دانشگاه ارومیه انجام شد. گیاه رزماری از بازار گیاهان دارویی شهرکرد تهیه و در هر بارיום پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی و با نام علمی رزمارینوس افیکینالیس<sup>(۱)</sup> تأیید گردید.

قسمت‌های هوایی خشک شده گیاه آسیاب گردید و به منظور استخراج روغن فرار گیاه از روش تقطیر با آب و دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استفاده گردید. روغن فرار حاصل بی‌رنگ یا با رنگ بسیار ملایم با بوی منحصر به فرد گیاه بود. پس از استخراج اسانس از سولفات سدیم بدون آب برای

1-Rosmarinus Officinalis L  
2-Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)  
3-WILEY  
4-DMSO

فوق‌الذکر، هر یک به وسیله میکروفیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری پالوده و استریل شدند.

برای تهیه لیزوزیم تیمار شده به وسیله حرارت از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده به داخل لوله‌های درب‌دار اضافه گردید. سپس هر یک از لوله‌های مذکور در حمام آب گرم در دماهای ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از سپری شدن این زمان بلافاصله در کنار یخ سرد و به منظور جدا ساختن مواد نامحلول تجمع یافته حاصل از حرارت دادن، لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. محلول‌های رویی<sup>(۱)</sup> جداسازی شدند و به وسیله لوله دیالیز در یک ارتباط دو طرفه با آب دیونیزه، دیالیز و سپس به وسیله لیوفیلایزر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد به صورت پودر لیوفیلایزه درآمد و غلظت‌های مربوطه با حل نمودن مجدد پودر مذکور در محلول فسفات پتاسیم ۶۶ میلی مولار با pH برابر ۶/۲۴ تهیه و دوباره به وسیله میکروفیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری، استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز از گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و یک کلونی از باکتری مزبور در ۱۰ سی‌سی محیط آب‌گوشت مقوی قلب و مغز تلقیح و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. دانسیته نوری با استفاده از طیف‌سنج در طول موج ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از رقیق‌سازی کشت ۲۰ ساعته در عدد ۰/۱۵ (تعداد

تقریبی ۱۰<sup>۶</sup> واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) تنظیم و در مراحل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

برای تعیین حداقل غلظت‌های ممانعت‌کننده<sup>(۲)</sup> و کشنده<sup>(۳)</sup> از روش رقت‌سازی میکروبراث استفاده گردید (۱۷). برای انجام آزمایش از میکروتیترپلیت‌های کشت بافتی استریل ۹۶ چاهکی استفاده گردید. بدین ترتیب در هر سری تست، حجم نهایی هر چاهک پس از تهیه رقت‌های دو برابر از ماده ضد باکتری روغن فرار رزماری یا لیزوزیم (معمولی و حرارت دیده) معادل ۱۸۰ میکرولیتر شامل؛ محیط آب‌گوشت مقوی قلب و مغز به اضافه ماده ضد باکتری بود که پس از آن باکتری مورد نظر با دوز تقریبی ۱۰<sup>۶</sup> واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه می‌گردید. در مورد حالت ترکیبی پس از تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده محلول ضدباکتری لیزوزیم (معمولی و حرارت دیده) و محلول ضدباکتری رزماری در مرحله قبل و به طور جداگانه، هر دو غلظت مربوط به حداقل غلظت‌های ممانعت‌کننده محاسبه شده، به نسبت مساوی در داخل یک چاهک واحد تهیه و ترکیب شده و سپس رقت‌سازی دو برابر انجام گرفت تا پس از گرم‌خانه‌گذاری حداقل غلظت‌های ممانعت‌کننده حالت ترکیبی حاصل گردد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه ترموشیکرمیکروپلیت گرمخانه‌گذاری گردید و پس از

1-Supernatants

2-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

3-Minimum Bactericidal Concentration(MBC)

سایر ترکیبات از لحاظ درصدی در مقادیر کمتری موجود بودند.

کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده و حداقل غلظت کشنده روغن فرار رزماری علیه لیستریامونوسیژنز به ترتیب ۲۲۵ و ۴۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در pH=۵ حاصل گردید و به موازات افزایش pH ممانعت کنندگی کاهش یافت. کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده لیزوزیم معمولی علیه لیستریامونوسیژنز، ۶۴۰ میکروگرم در میلی لیتر در pH=۵ حاصل شد، ولی در pH=۷ ممانعتی مشاهده نگردید (جدول ۱). کمترین مقادیر مربوط به حداقل غلظت ممانعت کنندگی لیزوزیم تیمار شده با حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب معادل ۱۲۸۰ و ۶۴۰ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید.

در مرحله بعد به منظور یافتن بهترین pH برای عملکرد ضد میکروبی لیزوزیم تیمار شده با حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، آزمایش در pH های ۵ و ۶ انجام شد که کمترین میزان مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده، ۱۶۰ میکروگرم در میلی لیتر، در تیمار ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۵ حاصل گردید (جدول ۲). مرحله آخر اثرات ترکیبی روغن فرار رزماری با لیزوزیم معمولی و تیمار شده با حرارت بررسی و بیشترین کاهش در مقادیر مربوط به حداقل غلظت ممانعت کننده در وضعیت حاصل از

آن حداقل غلظت ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود (در مقایسه با کنترل) به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده و چاهک ما قبل آن به عنوان حداقل غلظت کشنده تعیین گردید. برای تأیید نتایج مشاهده شده ۵۰ میکرولیتر از هر چاهک شفاف بر روی محیط جامد مغذی قلب و مغز اضافه و نتایج بر اساس شمارش کلنی تأیید گردید. آزمایش‌های مربوط به هر مرحله سه مرتبه تکرار شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS<sup>(۱)</sup> و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه<sup>(۲)</sup> تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

در نتیجه آنالیز ترکیبات روغن فرار رزماری مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ۹۸/۰۵ درصد ترکیبات شناسایی شدند. در بین ترکیبات تشکیل دهنده روغن فرار رزماری، بیشترین مقدار مربوط به آلفا-پینن (۱۴/۰۶ درصد)، ۱ و ۸ - سینئول (۱۳/۶۲ درصد)، وربنون (۱۱/۲ درصد)، کامفر (۱۰/۵۱ درصد)، بورنئول (۷/۳ درصد)، ۳- اکتانول (۷/۲ درصد)، کامفن (۵/۴۶ درصد) و لینالول (۵/۰۷ درصد) بود. از این میان بیشترین درصد ترکیبات مربوط به دسته مونوترپن‌های اکسیژنه (۳۰/۱۲ درصد) و هیدروکربن‌های مونوترپنی (۲۸/۴۲ درصد) بود و

1-Statistical Package for Social Sciences  
2-One way ANOVA with Dunnett's post test

هاردل<sup>(۱)</sup> یا اصل ایجاد موانع رشد و تکثیر باکتری می‌باشد. بنابراین هنوز هم به روش‌های جدید برای کاهش یا حذف باکتری‌های بیماری‌زا با خاستگاه غذایی و تا حد امکان ترکیب روش‌های جدید با روش‌های موجود نیاز است(۲). هدف از مطالعه حاضر بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضد میکروبی روغن فرار گیاهی رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوزیم علیه لیستریامونوسیتوژنز بود.

ترکیب لیزوزیم تیمار شده در ۸۰ درجه سانتی‌گراد با روغن فرار رزماری در pH=۵ علیه لیستریا مونوسیتوژنز به دست آمد(جدول ۳).

### بحث و نتیجه گیری

ترکیب عوامل ضد میکروبی به منظور توانمندتر ساختن آنها و کاهش دوز ممانعت کننده فرم ترکیبی در مقایسه با اثر هر یک از آنها به صورت مجزا علیه میکروارگانیسم‌ها، مصداقی از اصل

جدول ۱: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) روغن فرار رزماری و لیزوزیم معمولی علیه باکتری لیستریامونوسیتوژنز در pH مختلف

pH	تیمار		رزماری		لیزوزیم معمولی	
	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده
۵	۲۲۵	۴۵۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۶۴۰	۱۲۸۰
۶	۳۰۰	۶۰۰	۱۲۸۰	>۱۲۸۰	۱۲۸۰	>۱۲۸۰
۷	>۶۰۰	*	>۱۲۸۰	*	>۱۲۸۰	*

\* اندازه گیری نشد

جدول ۲: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) لیزوزیم تیمار شده در حرارت‌های ۷۲ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در pH مختلف

pH	تیمار		۷۲ درجه سانتی‌گراد		۸۰ درجه سانتی‌گراد	
	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده	ممانعت کننده	کشنده
۵	۶۴۰	۱۲۸۰	۱۶۰	۳۲۰	۱۶۰	۳۲۰
۶	۱۲۸۰	>۱۲۸۰	۳۲۰	۶۴۰	۳۲۰	۶۴۰

جدول ۴: حداقل غلظت‌های ممانعت کننده و کشنده (میکروگرم در میلی‌لیتر) روغن فرار رزماری و لیزوزیم معمولی و تیمار شده در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در ترکیب با یکدیگر علیه باکتری لیستریامونوسیتوژنز در pH=۵

متغیر	تیمار		ترکیب رزماری و لیزوزیم معمولی		ترکیب رزماری و لیزوزیم حرارت دیده	
	لیزوزیم	رزماری	لیزوزیم	رزماری	لیزوزیم حرارت دیده	رزماری
ممانعت کننده	۸۰	۱۵۰	۲۰	۴۰	۲۰	۴۰
کشنده	۱۶۰	۳۰۰	۴۰	۱۰۰	۴۰	۱۰۰

ترکیب شناسایی شده بر اساس مطالعه‌های گازکروماتوگرافی و گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی گزارش گردید (۲۰).

در مطالعه حاضر، اثر ضد میکروبی روغن رزماری بیانگر اثر مهارتی قابل قبول بر روی لیستریا مونوسیٹوژنز است و همان طور که نتایج نشان می‌دهد با کاهش pH اثر مذکور به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بر اساس گزارش رضوی روحانی و گریفیت<sup>(۶)</sup> (۱۹۹۶)، کاهش pH موجب ممانعت برخی از باکتری‌های گرم مثبت به وسیله لیزوزیم می‌گردد (۲۱)، به عنوان مثال در تحقیقی با کاهش pH به ۵/۵، ممانعت از رشد لیستریا مونوسیٹوژنز بهبود یافته است (۲۲). واسرشتی حرارتی<sup>(۷)</sup> می‌تواند سبب تقویت اثر ضدباکتریایی لیزوزیم گردد. ابراهیم و همکاران (۱۹۹۶) بر مؤثر بودن فرم دیمری حاصل از دیمیریزاسیون لیزوزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و  $pH=7/2$  علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اشاره نموده‌اند (۲۳). هر چند واسرشتی حرارتی موجب اختلال در فعالیت آنزیمی لیزوزیم می‌گردد، ولیکن فعالیت ضد میکروبی باقی مانده و عملکرد مربوط به آن هم گسیختگی غشا<sup>(۸)</sup> به وسیله لیزوزیم واسرشت شده

در بررسی اخیر ۹۸/۰۵ درصد ترکیبات روغن فرار رزماری شناسایی گردید که تفاوت‌هایی هم از لحاظ نوع ترکیبات و هم از نظر درصد آنها، با سایر بررسی‌های انجام شده دارد و این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از مکان جمع‌آوری گیاه و فاکتورهای دیگر از قبیل فنولوژی و قسمت مورد استفاده گیاه باشد (۱۸ و ۳).

بر اساس گزارش پاراکاسا رائو و همکاران<sup>(۱)</sup> (۱۹۹۹)، ترکیب ابتدایی حاصل از تقطیر به طور عمده شامل؛ آلفا-توجن، آلفا-پینن، بتا-پینن و ۱ و ۸-سینئول می‌باشد، هرچند کامفر و بورنیل استات در مراحل پایانی تقطیر حاصل می‌گردند و ترکیب شیمیایی روغن فرار رزماری شامل؛ ۸ و ۱-سینئول (۳۰ تا ۴۰ درصد)، کامفر (۱۵ تا ۲۵ درصد)، بورنیل (۱۶ تا ۲۰ درصد)، بورنیل استات (حداکثر تا ۷ درصد)، آلفا-پینن (۲۵ درصد) و سایر ترکیبات مثل؛ کامفن، میرسن، آلفا-فلاندرن، آلفا-ترپینن، پارا-سیمن، ترپینن -۴-ال، کاریوفیلین و تیمول می‌باشند (۱۹).

پینتوره و همکاران<sup>(۲)</sup> (۲۰۰۲)، ۵۸ ترکیب حاصل از روغن فرار رزماری مربوط به مناطق ساردینیا و کورسیکا در ایتالیا را بر اساس نتایج گاز کروماتوگرافی شاخص بازداری<sup>(۳)</sup> گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای کربن<sup>(۴)</sup> گزارش نمودند (۱۰). در مطالعه‌ای بر روی روغن فرار رزماری مراکشی نه تنها وجود سه تیپ شیمیایی<sup>(۵)</sup> گوناگون رزماری بلکه وجود ۹۱

1-Prakasa Ruo et al  
2-Pintore et al  
3-Gas chromatography retention index  
4-Carbon nuclear magnetic resonance  
5-Chemotype  
6-Razavi-Rohani & Griffiths  
7-Heat-Denaturation  
8-Membrane-disrupting activity

با حرارت، سلول‌های باکتریایی و قارچی را متأثر می‌نماید و به نظر می‌رسد ناحیه سی - ترمینال آمفیپاتیک<sup>(۱)</sup> در اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی آن دخیل باشد(۲۴).

در تحقیق حاضر لیزوزیم به عنوان یک ماده ضدباکتری طبیعی به شکل معمولی و تیمار شده با حرارت علیه باکتری مورد آزمایش به کار گرفته شد و نتایج نشان داد با کاهش pH به ۵ و نیز تیمار حرارتی خصوصاً ۸۰ درجه سانتی‌گراد اثر مهاری قوی‌تری بروز می‌دهد.

روی آوردن به مواد خارق‌العاده موجود در طبیعت و پیروی از ایده مصرف‌گرایی سبز<sup>(۳)</sup> و البته تمهید شرایطی برای به‌کارگیری کمترین میزان مواد آنتی‌باکتریال با بیشترین اثر (به دلیل عوارض احتمالی ناشی از دوزهای بالا شامل؛ تحریک پوستی، مشکلات احتمالی در زنان آبستن و شیرده یا افراد مبتلا به فشارخون بالا و بی‌خوابی ناشی از ترکیبات رزماری و جایگزین نمودن حالات ترکیبی از مواد ضد میکروب دارای خاستگاه طبیعی مانند لیزوزیم و رزماری به جای نگهدارنده‌های غذایی بسیار زیان‌بار شیمیایی یا فرآوری‌های تخریب‌گر حرارتی برای افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی امری بدیهی و ضروری به نظر می‌رسد(۳). البته لازم به ذکر است به دلیل وجود محدودیت‌های ارگانولپتیک و همچنین فرار بودن اسانس‌های گیاهی، کاهش دوز مورد نیاز با ایجاد فرمول‌های ترکیبی از چند ماده ضد میکروبی طبیعی و استفاده از فیلم‌های حاوی این مواد ضد میکروبی که

آزادسازی تدریجی مواد یاد شده به سمت ماده غذایی را باعث می‌شوند، محدودیت‌های کاربردی این گونه مواد را به حداقل می‌رساند. در مجموع چنین نتیجه‌گیری می‌شود که روغن فرار رزماری ترکیبی مؤثر علیه لیستریا مونوسیترژنز بوده و استفاده هم‌زمان به صورت ترکیب با لیزوزیم هم از دوز تیمار لیزوزیم به تنهایی، می‌کاهد و هم یک فرمول ترکیبی جدید با تأثیر ضدلیستریایی قابل توجه را ایجاد می‌نماید. همچنین به کارگیری روغن فرار رزماری و لیزوزیم تیمار شده با حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد در pH ۵ از بالاترین اثر ضد لیستریایی برخوردار می‌باشد.

#### تقدیر و تشکر

هزینه انجام این طرح از محل اعتبار پژوهانه ریاست دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تأمین گردیده است. لازم است مراتب سپاس‌گزاری خود را از راهنمایی‌های دکتر سیدمهدی رضوی روحانی استاد میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه ارومیه ابراز نمایم.

1-Amphiphatic C-terminal Domain  
2-Natural Green Image

# Chemical Composition and Antibacterial Effects of *Rosmarinus Officinalis* L Essential Oil with Lysozyme on *Listeria monocytogenes*

Saei Dehkordi SS\*,  
Tajik H\*\*,  
Moradi M\*\*\*,  
Jafari Dehkordi A\*\*\*\*,  
Ghasemi S\*\*\*\*\*.

\*Assistant Professor of Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

\*\*Associate Professor of Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

\*\*\*PhD Student Majoring Food Hygiene and Quality Control, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

\*\*\*\*Assistant Professor of Animal Internal Medicine, Department of Clinical Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

\*\*\*\*\* MSc Majoring Food Science, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Shaheed Beheshti Medical University, Tehran, Iran.

Received:27/09/2009

Accepted:16/11/2009

Corresponding Author:Saei Dehkordi SS  
Email: smazdak@yahoo.com

## ABSTRACT:

**Introduction & Objective:** *Rosmarinus officinalis* L. as a member of the Lamiaceae family and lysozyme as a natural antibacterial agent is important in food microbiology, because of its characteristics. The aim of the present study was to determine the chemical composition and anti-listerial activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil (REO) alone and in combination with lysozyme for enhancement of anti-listerial activity of both substances.

**Materials & Methods:** *Rosmarinus officinalis* L. was purchased from a local grocery store at Shahrekord and was identified by the Institute of Medicinal Plants, ACECR. The air-dried aerial parts were subjected to hydrodistillation using a Clevenger apparatus to obtain essential oil and yielded oil was analyzed by GC/MS. Antibacterial activity (on basis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of REO was studied separately and in combination with unheated lysozyme (L) and heat-treated lysozyme (HTL) on *Listeria monocytogenes* at different pH (5, 6 and 7) by a micro-broth dilution assay. The collected data were analyzed by SPSS software.

**Results:** In the current study, 98.05% of constituents of the essential oil were identified. The major components were  $\alpha$ -pinene (14.06%), 1,8-cineole (13.62%), verbenone (11.2%), camphor (10.51%), borneol (7.3%), 3-octanone (7.02%), camphene (5.46%) and linalool (5.07%). The inhibitory action of REO was stronger at lower pH especially 5 (MIC=225  $\mu$ g/mL). Inhibition by L at pH 5 was 640  $\mu$ g/mL but no inhibition was seen at pH 7. HTL resulted in more effective inhibition than L, especially at pH 5 and heat-treatment 80°C (MIC: 160  $\mu$ g/mL).

**Conclusion:** Combination of L + REO and particularly HTL + REO was led to enhancement of bacterial inhibition. It was concluded that REO by the identified chemical composition was effective alone or in combination with L or HTL on *Listeria monocytogenes* as a food-borne pathogen.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis* essential oil, Lysozyme, *Listeria Monocytogenes*

## REFERENCES:

1. Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 2007; 18: 646 - 9.
2. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 2003; 10: 813- 29.
3. Peter KV. *Handbook of Herbs and Spices*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press LLC: USA; 2004; 360.
4. Domokos J, Hethely E, Palinkas J, Szirmai S, Tulok MH. Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Hungarian origin. *Journal of Essential Oil Research* 1997; 9: 41–5.
5. Bicchi C, Binello A, Rubiolo P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*R. officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phytochemical Analysis* 2000; 11: 236–42.
6. Coehlo LAF, Oliveira JV, Pinto JC. Modelling and simulation of supercritical fluid extraction of rosemary essential oil. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 1997; 17: 446–8.
7. Pokorny J, Rebolva Z, Janitz W. Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils. *Czech Journal of Food Sciences* 1998; 16: 227–34.
8. Zegarska Z, Amarowicz R, Karamac M, Rafalowski R. Antioxidative effect of rosemary ethanolic extract on butter. *Milchwissenschaft* 1996; 51: 195–8.
9. Korimova L, Mate D, Turek P. The evaluation of raw fermented meat products stabilized with vitamin E and rosemary. *Folio Veterinaria* 1998; 42: 178–81.
10. Pintore G, Usai M, Bradesi P, Julino C, Boatto Tomi F, Chessa M, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *R. officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal* 2002; 17: 15–9.
11. Scaman C, Nakai S, Aminlari M. Effect of pH, temperature and sodium bisulfite or cystein on the level of maillard-based conjugation of lysozyme with dextran, galactomannan and mannan. *Food Chemistry* 2006; 99: 368-80.
12. Nattress FM, Baker LP. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. *International Journal of Food Microbiology* 2003; 85: 259-67.
13. Vannini L, Lanciotti R, Guerzoni ME. Interaction between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 94: 123-35.
14. Nakimbugwe D, Masschalck B, Anim G, Michiels CW. Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 112: 19-25.
15. Adams RP. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Allured: Carol Stream IL; USA ; 1989; 469.
16. Basti AA, Misaghi A, Khaschabi D. Growth responses and modeling of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil, pH and temperature on *Salmonella yphimurium* and *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technology* 2007; 40: 973-81.
17. Davidson PM, Sophos JN, Branen IL. *Antimicrobials in food*. 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press: New York; 2005; 706.
18. Porte A, Godot RLDE, Lopes D, Koketso M, Goncalves SL, Torquillo HS. Essential oil of *Rosmarinus officinalis* (rosemary) from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 2000; 12: 577–80.
19. Prakasa Rao EVS, Gopinath CT, Ganesha RAO RS, Ramesh S. Agronomic and distillation studies on rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a semi arid tropical environment. *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants* 1999; 6: 25–30.
20. Elamrani A, Zrira S, Benjilali B, Berrada M. A study of Moroccan rosemary oils. *Journal of Essential Oil Research* 2000; 12: 487–95.

21. Razavi-Rohani SM, Griffiths MW. The effect of lysozyme and butylated hydroxyanisole on spoilage and pathogenic bacteria associated with food. *Journal of Food Safety* 1996; 16: 59-74.
22. Johansen C, Gram L, Meyer AS. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 1994; 57: 561-6.
23. Ibrahim HR, Higashiguchi S, Juneja LR, Kim M, Yamamoto TA. phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44:1416-23.
24. Düring K, Mahn P, Brinkmann, O, Ggieffers W. The non enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *Federation of European Biochemical Societies Letters FEBS Letters* 1999; 449: 93-100.