

بررسی اثر تیمار حرارتی بر ترکیبات و خواص ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و دارچین

سید جواد حسینی^۱ ID، محبوبه سرابی جماب^{۲*} ID، مصطفی شهیدی نوقابی^۳ ID، حسین زمانی^۴ ID،
غلام حسین ظهوری^۵ ID

- ۱- گروه فرآوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۲- گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول (m.sarabi@rifst.ac.ir)
- ۳- گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۴- گروه ماشین آلات صنایع غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- ۵- گروه شیمی پلیمر، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

امروزه اسانس‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزین نگهدارنده‌های سنتزی در محصولات غذایی استفاده شوند؛ در صورتی که در شرایط فرآوری مواد غذایی پایدار بمانند. در تحقیق حاضر، ضمن بررسی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین به روش کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی، ویژگی‌های ضد میکروبی دو اسانس، قبل و بعد از فرایند حرارتی (۲۰۰ درجه سانتی‌گراد-۱۰ دقیقه) در برابر باکتری باسیلوس سوبتیلیس و کپک *آسپرژیلوس نایجر* ارزیابی گردید. براساس نتایج به‌دست‌آمده، فرایند حرارتی اثر قابل توجهی بر ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها نداشت. ترکیبات اصلی اسانس دارچین شامل سینامالدهید و اوژنول بود. در آویشن شیرازی نیز ترکیبات شاخص، ترکیبات فنولی بودند که شامل تیمول و کارواکرول بود و در مجموع ۶۱/۵ درصد از کل ترکیبات آویشن را تشکیل می‌دادند. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین در برابر *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۲۵۰ و ۴۰۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر بود؛ این در حالی است که کمترین غلظت کشندگی برای اسانس‌های ذکر شده ۲۵۰ و ۱۶۰۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر به‌دست‌آمد. از سوی دیگر مقادیر MIC و MBC آویشن شیرازی در مقابل باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب برابر با ۷/۸ و ۱۵/۶ میکرولیتر بر میلی‌لیتر و در خصوص دارچین به ترتیب ۱۶۰۰۰ و ۳۲۰۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. قطر هاله عدم رشد در آویشن شیرازی و دارچین حرارت‌دیده علیه *آسپرژیلوس نایجر* به ترتیب ۲۰/۵ و ۱۶/۰۵ و بر علیه باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب ۲۹/۰۰ و ۱۷/۰۰ میلی‌متر بود. به‌طور کلی نتایج نشان داد فرایند حرارتی تأثیر قابل توجهی بر فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها نداشت، بنابراین می‌توان آنها را به‌عنوان عامل ضد میکروبی در محصولاتی که متحمل فرایند حرارتی بالا می‌شوند، به‌کاربرد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۱
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۵/۰۸

واژه‌های کلیدی

آویشن شیرازی
حداقل غلظت بازدارندگی
حداقل غلظت کشندگی
دارچین
کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی



مقدمه

می‌شود. سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) میزان دورریز غلات و حبوبات و خسارت وارد شده به کشورهای مختلف جهان در بازه زمانی ۲۰۱۲-۲۰۲۲

با افزایش جمعیت جهان و نیاز روزافزون مردم به مواد غذایی سالم، اهمیت حفظ و نگهداری مواد غذایی بیشتر نمایان

سمیت حاد، تراژون بودن^۴ و ایجاد آلودگی زیست‌محیطی به دلیل تخریب آهسته برخی مواد، با محدودیت‌هایی مواجه شده است (Calo *et al.*, 2015; Faleiro, 2011). اگرچه استفاده از تعداد محدودی از نگهدارنده‌های مصنوعی، به مقدار کم، در محصولات نانویی مجاز است، به دلیل اطلاع مصرف‌کنندگان از خطر نگهدارنده‌های شیمیایی و همچنین روی آوردن مردم به محصولات با برجسب بدون نگهدارنده یا برجسب تمیز^۵ (Simsek, 2020)، در سال‌های اخیر محققان روی جایگزینی مواد طبیعی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی به‌منظور جلوگیری از فساد در محصولات غذایی از جمله نان متمرکز شده‌اند (Borghai *et al.*, 2010; Jideani & Vogt, 2016). مطالعه‌های متعددی خواص ضد میکروبی، ضد اکسایشی و ضد سرطانی اسانس‌ها را ثابت کرده است (Bhavaniramy, 2010; Tajkarimi *et al.*, 2019; *et al.*) که عمدتاً به دلیل وجود ترکیبات فنولی است (Bagamboula *et al.*, 2004; Bahmani *et al.*, 2016; Neffati *et al.*, 2017).

دارچین^۶ حاوی آلدئید^۷، فنول^۸ و ترپن^۹ است و به دلیل داشتن ترکیبات مؤثر سینامالدهید^{۱۰} و اوژنول^{۱۱} از خاصیت ضد میکروبی خوبی برخوردار است (Fattahi *et al.*, 2020; Prasad *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2020). ضدقارچی دارچین علیه برخی از گونه‌های آسپرژیلوس (آسپرژیلوس نایجر^{۱۲}، آسپرژیلوس فومیگاتوس^{۱۳} و آسپرژیلوس فلاووس^{۱۴}) اثبات شده است (Badr *et al.*, 2022; Manso *et al.*, 2013; Sharaf & Al-Zaidi, 2021; Xiang *et al.*, 2020).

آویشن شیرازی^{۱۵}، دارویی گیاهی و معطر بوده که طبق تحقیق‌ها، اسانس آن روی باکتری‌های بیماری‌زا، به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت، همچنین قارچ‌ها و مخمرها مؤثر است (Basti *et al.*, 2016; Saadati Ardestani *et al.*, 2022). Guynot و همکاران (۲۰۰۳)، گزارش کردند که آویشن به‌طور عمده از تیمول^{۱۶} (۵۳/۹ درصد) تشکیل شده است. Couladis و همکاران (۲۰۰۴)، فعالیت ضدقارچی تیمول را ارزیابی‌نموده و ثابت کردند که این ماده مهارکننده

در نتیجه اتلاف این مواد غذایی در زمان نگهداری را حدود ۱۰ درصد برآورد کرده است (FAO, 2023). فساد ناشی از فعالیت‌های میکروبی یکی از عوامل اصلی در ازدست‌رفتن مواد غذایی محسوب می‌شوند. نان از جمله پرمصرف‌ترین محصولات غذایی در جهان است که معمولاً فساد آن به‌علت نگهداری نامناسب است (Ravimannan *et al.*, 2016). هرچند به‌علت دمای پخت، بیشتر میکروارگانیسم‌های احتمالی نان در حین پخت نابود می‌شوند، اسپوره‌های باکتریایی مانند *باسیلوس سوبتیلیس*^۱ که به حرارت مقاوم هستند، احتمال دارد در پخت نان زنده بمانند (Pacher *et al.*, 2022). شایان ذکر است آلودگی ثانویه به‌ویژه آلودگی به کپک‌ها، از محیط اطراف در زمان خنک‌کردن، تکه‌کردن، بسته‌بندی و نگهداری نیز محتمل می‌باشد (Banwart, 1989).

بر اساس یافته‌های اخیر دانشمندان، حدود ۶۰ درصد از فساد محصولات نانویی و خمیری مربوط به گونه‌های کپک پنی‌سیلیوم^۲ و آسپرژیلوس نایجر^۳ است (Alhendi & Choudhary, 2013). در مطالعه Adewole و Faparusi (۲۰۱۹) که روی انواع کپک‌های فاسدکننده نان انجام شد، مشخص گردید، غالب‌ترین کپک نان گونه آسپرژیلوس نایجر می‌باشد.

در آغاز قرن بیستم، تحقیق‌هایی در زمینه کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد نان از طریق نگهدارنده‌هایی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک یا اسید پروپیونیک متمرکز شده‌اند (Cook & Johnson, 2009; Pacher *et al.*, 2022; Watkins, 1906). صنعت نانویی در حال حاضر نیز به مواد نگهدارنده برای کنترل فساد نان وابسته است. به‌طور کلی نمک‌های اسید پروپیونیک و سوربیک (سدیم، پتاسیم یا کلسیم) به‌عنوان نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات نانویی استفاده می‌شوند (Axel *et al.*, 2017; Pacher *et al.*, 2022). کنترل فساد مواد غذایی و باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر با به‌کارگیری ترکیبات شیمیایی حاصل می‌شود، اما استفاده از مواد شیمیایی مصنوعی به‌دلیل جنبه‌های نامطلوب از جمله سرطان‌زایی،

¹⁰ Cinnamaldehyde

¹¹ Eugenol

¹² *Aspergillus niger*

¹³ *Aspergillus fumigatus*

¹⁴ *Aspergillus flavus*

¹⁵ *Zataria multiflora*

¹⁶ Thymol

¹ *Bacillus subtilis*

² Penicillium

³ *Aspergillus niger*

⁴ Teratogenesis

⁵ Clean label

⁶ *Cinnamomum verum*

⁷ Aldehyde

⁸ Phenol

⁹ Terpene

ترکیبات فعال آنها، اسانس‌ها درون لوله آزمایش ریخته شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه درون آون (Memmert، ساخت آلمان) در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند (زمان رسیدن دما به ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد نیز محاسبه گردید به طوری که اطمینان حاصل شد تمام اسانس‌ها ۲ دقیقه در معرض دمای مورد نظر بودند) و پس از آن بلافاصله خنک گردیده و تا هنگام استفاده، داخل یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Krepker *et al.*, 2018).

تعیین ترکیب شیمیایی اسانس‌ها توسط کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS^۹)

برای تعیین ساختار اسانس و مشخص نمودن ترکیبات اصلی آن، ۵ میکرولیتر از هر اسانس در ۰/۵ میلی‌لیتر این-هگزان با گرید HPLC حل گردید و ۱ میکرولیتر از آن به GC-MS (Agilent Technologies-5977A، ساخت آمریکا) تزریق شد. ستون GC از نوع موئین (HP-5MS-phenyl methyl siloxane، شرکت Agilent، ساخت آمریکا) به طول ۳۰ متر، قطر خارجی ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) بود. دمای قسمت تزریق ۲۷۹ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد، برنامه دمایی آون از ۶۰ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ افزایش دمای ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تنظیم شد. گاز حامل هلیوم با حجم تزریق (ورودی) ۱ میکرولیتر انتخاب گردید و نرخ جریان گاز هلیوم ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. همچنین طیف‌سنج جرمی روی حالت یونیزه‌کننده الکترونی (EI^{۱۰}) با میزان ۷۰ الکترون‌ولت قرار گرفت. دمای حد واسط^{۱۱} روی ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت جرم به بار نیز در طیف جرمی بین ۳۵ تا ۷۰۰ تنظیم شد (Paventi *et al.*, 2020).

فعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها

به منظور فعال‌سازی سوپه باکتری، مقدار ۱ گرم از پودر باکتری در ۹ میلی‌لیتر محلول رینگر ریخته و در حمام ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس

قوی کپک‌هاست و حتی در کمترین غلظت بازدارندگی (MIC^۱) خود نیز قادر است از رشد طیف گسترده‌ای از میکروارگانیزم‌ها جلوگیری کند؛ بنابراین بر پتانسیل استفاده از آن در حفظ مواد غذایی تأکید شد.

ترکیبات ضد میکروبی طبیعی می‌توانند به غذا یا به بسته‌بندی آن اضافه شوند؛ باین‌حال چالش اصلی در استفاده از ترکیبات طبیعی نظیر اسانس‌ها، حفظ فعالیت ضد میکروبی آنها در دمای بالایی است که در حین فراوری برخی محصولات غذایی و یا در تولید فیلم‌های بسته‌بندی استفاده می‌شود (Palermo *et al.*, 2014; Riehle *et al.*, 2013). بنابراین بررسی مقاومت حرارتی آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی خواص ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و دارچین قبل و بعد از عملیات حرارتی در برابر رایج‌ترین عوامل فساد قارچی و باکتریایی نان انجام شد و همچنین اثر عملیات حرارتی بر نوع و مقدار ترکیبات اسانس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کپک *آسپرژیلوس نایجر* جدا شده از کشمش و شناسایی شده به روش مولکولی از بانک میکروبی مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی تهیه شد. پودر لیوفلیزه *باسیلوس سوبتیلیس*^۲ (UBBS-14) از شرکت Unique Biotech (ساخت هند) خریداری شد. محیط‌های کشت میکروبی شامل مولر هینتون برات^۳ (MHB)، مولر هینتون آگار^۴ (MHA)، پوتیتو دکستروز برات^۵ (PDB) و پوتیتو دکستروز آگار^۶ (PDA) و همچنین قرص رینگر و این-هگزان^۷ (مخصوص کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC^۸) از شرکت مرک (ساخت آلمان) خریداری شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مانند جنتامایسین، آمپی‌سیلین و اریترومایسین از شرکت پادتن طب (ساخت ایران) تهیه شدند. اسانس آویشن شیرازی از شرکت گل قطره شیراز و اسانس دارچین از شرکت اکسیر گل سرخ مشهد خریداری شدند.

فرایند حرارتی

به منظور بررسی اثرات فرایند حرارتی روی اسانس‌ها و

⁷ n-Hexane

⁸ High-performance liquid chromatography

⁹ Gas chromatography-mass spectrometry

¹⁰ Electron ionization

¹¹ Interface

¹ Minimum inhibitory concentration

² *Bacillus Subtilis*

³ Mueller hinton broth

⁴ Mueller hinton agar

⁵ Potato dextrose broth

⁶ Potato dextrose agar

تعیین MIC، حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC^۷) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC^۸) اسانس‌ها برای تعیین MIC اسانس‌ها از روش میکروداپلوشن^۹ با استفاده از کدورت‌سنجی به‌وسیله دستگاه الیزاید (Biotech, ELX 808، ساخت آمریکا) استفاده شد؛ به‌این‌صورت که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف اسانس‌های دارچین و آویشن (۳۲۰۰۰، ۱۶۰۰۰، ۸۰۰۰، ۴۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲۵ و ۷/۸۱۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر) به میکروتیوب‌هایی که حاوی ۹۵ میکرولیتر محیط MHB (باکتری) و محیط PDB (کپک) و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (۱۰^۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر) بود، ریخته شد. سل حاوی محیط‌کشت و اسانس بدون سوسپانسیون میکروبی به‌عنوان کنترل منفی و سل حاوی محیط‌کشت مایع و ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی بدون حضور اسانس، به‌عنوان کنترل مثبت تهیه شد. سپس پلیت الیزا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای باکتری و برای کپک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. رشد میکروبی با اندازه‌گیری میزان کدورت توسط دستگاه الیزا تعیین شد. به‌منظور تعیین MBC/MFC اسانس‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک با کدورت مشابه شاهد منفی و یا کمتر از آن، روی سطح محیط‌کشت MHA و PDA پخش شد و در دما و زمان مناسب برای میکروارگانیسم‌ها گرم‌خانه‌گذاری شد (Klančnik *et al.*, 2010).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از GC-MS اسانس‌های دارچین و آویشن قبل و بعد از فرایند حرارت‌دهی کروماتوگرام حاصل از GC-MS اسانس دارچین و ترکیبات مؤثره اصلی آن قبل و بعد از فرایند حرارتی به‌ترتیب در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول (۱) نیز مشاهده می‌شود، قبل از فرایند حرارتی پیک‌های اصلی دارچین براساس زمان بازداری (زمان خروج آنها از ستون GC)، مربوط به دکان^{۱۰}، متا-پیرول^{۱۱}، لینالول^{۱۱}

به‌وسیله مقیاس ۰/۵ مک‌فارلند و با استفاده از روش کدورت‌سنجی به‌وسیله اسپکتروفتومتر سوسپانسیونی معادل ۱۰^۸ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر تهیه گردید (Mazkour *et al.*, 2019).

به‌منظور تهیه سوسپانسیون قارچی، ابتدا از کشت اولیه اسپرژیلوس نایجر، به‌وسیله یک لوپ استریل، کشت مجدد^۱ تهیه شد و درون گرم‌خانه (Memmert، ساخت آلمان) ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا بعد از ۵ روز کپک وارد فاز لگاریتمی شود و اسپورزایی نماید. اسپور قارچ کشت‌داده‌شده در محیط PDA به‌صورت استریل خراشیده و به داخل رینگر استریل حاوی توئین ۸۰ انتقال یافت و در نهایت تعداد آن تا رسیدن به ۱۰^۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر از اسپور قارچ، توسط لام هموسیتومتر شمارش گردید (Sun *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری هاله عدم رشد میکروبی

برای انجام این تست از روش انتشار دیسک^۲ استفاده شد. به‌منظور انجام آزمون ابتدا سوسپانسیون میکروبی با غلظت معادل ۱۰^۶ واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر میلی‌لیتر از باکتری باسیلوس سوبتیلیس و اسپور کپک اسپرژیلوس نایجر تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی بر سطح محیط‌کشت MHA (برای باکتری) و PDA (برای کپک) به‌طور یکنواخت پخش گردید. دیسک‌های بلانک استریل به قطر ۶ میلی‌متر به ۳۰ میکرولیتر از اسانس آغشته گردید و سپس در سطح محیط آگار قرار داده شد. لازم به ذکر است اسانس قبل از استفاده از فیلتر استریل ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. دیسک آغشته به اتانول به‌عنوان کنترل منفی و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین^۳، جنتامایسین^۴ و آمپی‌سیلین^۵ (۱۰ میکروگرم در دیسک) نیز به‌عنوان کنترل مثبت در سطح محیط آگار قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت، به‌ترتیب برای باکتری و کپک گرم‌خانه‌گذاری شدند و سپس قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و به میلی‌متر گزارش گردید (Aljeldah, 2022).

⁷ Minimum fungicidal concentration

⁸ Micro dilution

⁹ Decane

¹⁰ M-Pyrol

¹¹ Linalool

¹ Subculture

² Disk diffusion

³ Erythromycin

⁴ Gentamicin

⁵ Ampicillin

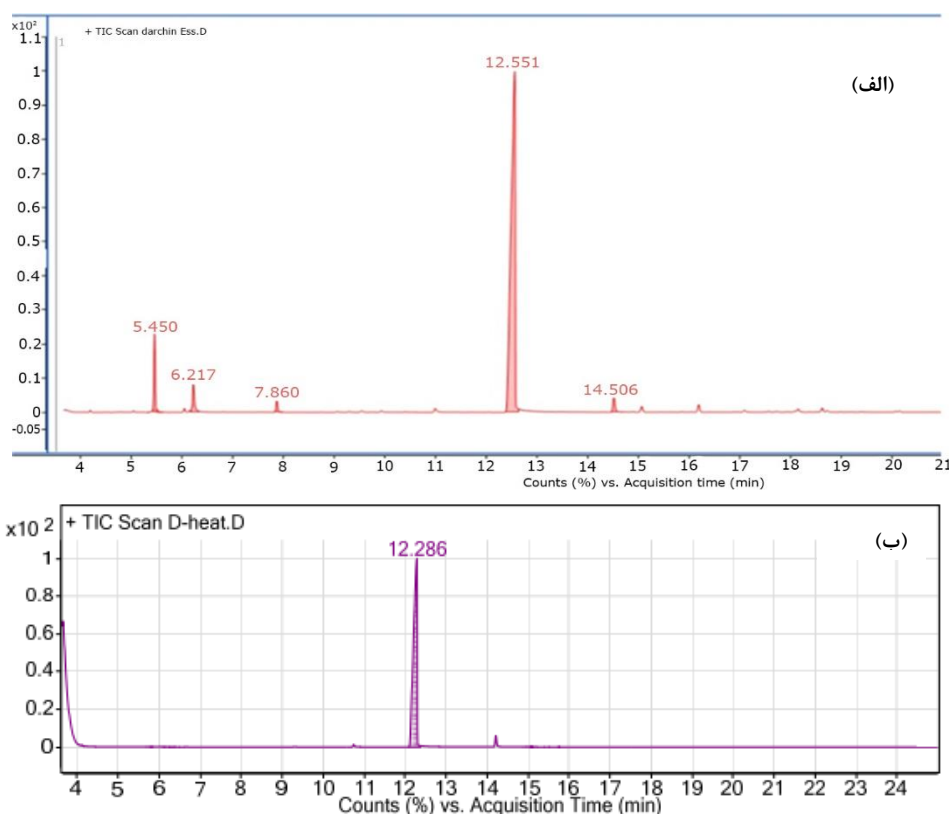
⁶ Minimum bactericidal concentration

در کروماتوگرام اسانس قبل از فرایند حرارتی به دلیل آلودگی ستون یا در واقع باقی ماندن این مواد در ستون کروماتوگرافی است، از سوی دیگر میزان سینامالدهید و اوژنول نیز افزایش پیدا کرده است که می‌تواند ناشی از تجزیه ترکیبات و تولید مواد بر اثر حرارت باشد. براساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات اصلی تشکیل دهنده اسانس دارچین (سینامالدهید و اوژنول) به فرایند حرارتی در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان حدود ۱۰ دقیقه مقاوم بودند.

جدول ۱- ترکیبات اصلی، درصد و زمان بازداری اسانس دارچین (قبل و بعد از حرارت‌دهی)

نام ترکیب مؤثره	زمان بازداری (دقیقه)	سطح زیر نمودار (درصد)	
دکان	۵/۴۵	۶/۲۷	قبل از فرایند حرارت‌دهی
متا-پیرول	۶/۲۲	۳/۳۸	
لینالول	۷/۸۶	۱/۱۴	
سینامالدهید	۱۲/۵۵	۸۴/۰۴	
اوژنول	۱۴/۵۰	۱/۹۰	بعد از فرایند حرارت‌دهی
سینامالدهید	۱۲/۲۹	۹۷/۳۶	
اوژنول	۱۴/۲۱	۲/۶۴	

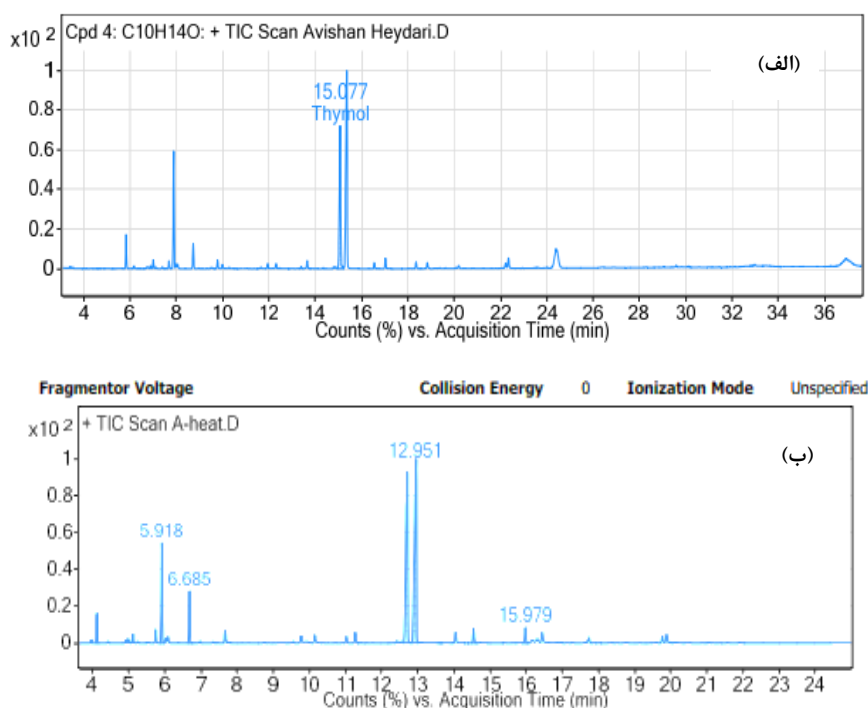
سینامالدهید و اوژنول هستند که به ترتیب ۶/۲۷، ۳/۳۸، ۱/۱۴، ۸۴/۰۴ و ۱/۹۰ درصد از کل ترکیبات را تشکیل می‌دهند. از سوی دیگر باتوجه به شکل (۱) مشخص شد که بعد از فرایند حرارتی پیک‌های اصلی در دقایق ۱۲/۲۸۶ و ۱۴/۲۱ از ستون GC خارج شده‌اند که با تطبیق آنها با کتابخانه دستگاه GC مشخص شد؛ پیک بزرگ‌تر که ابتدا از ستون بیرون آمده است نمایانگر حضور سینامالدهید می‌باشد که ترکیب اصلی دارچین را تشکیل می‌دهد و پیک ضعیف‌تر که در انتهای نمودار نمایان است، ناشی از حضور اوژنول در دارچین می‌باشد که با نتایج Fattahi و همکاران (۲۰۲۰)، Prasad و همکاران (۲۰۰۹) و Sun و همکاران (۲۰۲۰) نیز همخوانی دارد. در واقع پس از حرارت‌دهی اسانس دارچین، سینامالدهید ۹۷/۳۶ درصد و اوژنول ۲/۶۴ درصد از کل ترکیبات اسانس را تشکیل دادند. قبل از حرارت‌دهی نیز میزان ترکیبات شاخص دارچین، سینامالدهید و اوژنول، به ترتیب ۸۴/۰۴ و ۱/۹۰ درصد به دست آمد. با مقایسه ترکیبات قبل و بعد از اعمال حرارت، مشخص گردید که برخی ترکیبات مانند دکان (مانند هگزان نوعی حلال هیدروکربنی ۱۰ کربنه است) حذف گردیدند که به نظر می‌رسد حضور چنین ترکیباتی



شکل ۱- کروماتوگرام حاصل از GC-MS اسانس دارچین، الف) قبل از فرایند حرارتی و ب) پس از فرایند حرارتی

مهم‌ترین ترکیبات مؤثره آویشن شیرازی، قبل و پس از فرایند حرارتی اشاره شده است. در پژوهش حاضر ترکیبات شاخص آویشن شیرازی، ترکیبات فنولی شامل تیمول و کارواکرول^۱ بود، که در مجموع قبل از حرارت ۶۱/۵ درصد و بعد از فرایند حرارتی ۷۵ درصد از کل ترکیبات آویشن را تشکیل دادند.

در شکل (۲) کروماتوگرام GC-MS اسانس آویشن شیرازی به ترتیب قبل و بعد از فرایند حرارتی نشان داده شده است که در مقایسه با کروماتوگرام GC-MS دارچین، پیک‌های متنوعی در کروماتوگرام آویشن شیرازی مشاهده می‌شود که در ادامه به بررسی و مقایسه ترکیبات آن و تأثیر فرایند حرارتی بر آنها پرداخته شده است. جدول (۲) به



شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از GC-MS اسانس آویشن شیرازی، (الف) قبل از فرایند حرارتی و (ب) پس از فرایند حرارتی

جدول ۲- ترکیبات اصلی، درصد ترکیبات و زمان بازداری اسانس آویشن شیرازی (قبل و بعد از فرایند حرارتی)

نام ترکیب مؤثره	زمان بازداری (دقیقه)	سطح زیر نمودار (درصد)
آلفا-پینن	۵/۸۳	۳/۶۰
پارا-سیمن	۷/۸۹	۱۴/۴۰
گاما-تریپین	۸/۷۲	۳/۰۰
تیمول	۱۵/۰۷	۲۵/۳۰
کارواکرول	۱۵/۳۷	۳۶/۲۰
۶ متیل-۶،۴-بیس (۴-متیل پنت-۳-ان-۱-ایل) سیکلوهگز-۱-ان-۳،۱-دی‌ان کاربالدئید	۲۴/۳۹	۹/۵۰
آلفا-کارن	۴/۱۲	۲/۷۱
اورتو-سیمن	۵/۹۲	۱۱/۵۷
گاما-تریپین	۶/۶۹	۶/۰۶
کارواکرول	۱۲/۷۱	۳۴/۶۳
تیمول	۱۲/۹۵	۴۰/۶۳
کارواکرول استات	۱۴/۵۵	۲/۱۰
کاریوفیلن	۱۵/۹۸	۲/۳۱

قبل از فرایند حرارتی

بعد از فرایند حرارتی

¹ Carvacerol

شیرازی پرداختند، ثابت بودن ترکیبات اصلی شامل سینامالدهید و اوژنول در دارچین و کارواکرول، تیمول، لینالول و پارا-سیمن در آویشن شیرازی بوده است؛ هرچند تفاوت درصد ترکیبات تشکیل دهنده را می توان به نوع گونه گیاه، بخشی از گیاه که جهت استخراج اسانس استفاده شده، روش استخراج اسانس و حتی موقعیت جغرافیایی و نوع کشت و آبیاری گیاه نسبت داد (Mahmoudvand *et al.*, 2017; Moghadam *et al.*, 2019; Raeisi *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2020; Zomorodian *et al.*, 2015).

Tomaino و همکاران (۲۰۰۵) تأثیر تیمارهای مختلف دمایی به مدت ۳ ساعت را بر اسانس های روغنی چند ادویه، به وسیله GC بررسی کردند. سینامالدهید و اوژنول که به ترتیب ترکیبات غالب اسانس دارچین محسوب می شود در دمای اتاق، ۱۰۰ و ۱۸۰ درجه سانتی گراد به ترتیب حدود ۶۷/۹، ۶۸ و ۶۷/۳ درصد و ۶/۷۲، ۶/۷۵ و ۶/۶۸ درصد از ترکیبات دارچین را تشکیل دادند که مقاومت حرارتی ترکیبات اصلی اسانس دارچین را اثبات می کند. در خصوص آویشن درصد پارا-سیمن در دمای اتاق و ۱۰۰ درجه سانتی گراد تغییر محسوسی نکرد (۲۶ درصد) ولی افزایش دما به ۱۰۰ درجه سانتی گراد باعث افزایش این ترکیب شد (۲۹/۷ درصد). میزان ترکیب لینالول با افزایش دما کاهش یافت و به ترتیب در دمای اتاق، ۱۰۰ و ۱۸۰ درجه سانتی گراد ۶/۱۷، ۶/۱۲ و ۵/۶۸ درصد به دست آمد. میزان تیمول در دمای محیط ۴۵/۳ درصد بود که با افزایش دما به ۱۰۰ درجه سانتی گراد ابتدا کمی افزایش (۴۶/۳ درصد) و سپس در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد مجدد کاهش یافت (۴۵/۴ درصد) که ممکن است ناشی از واکنش های تبدیل و تجزیه باشد.

نتایج آزمون های MIC، MBC و MFC اسانس ها

نتایج آزمون های میکروبی تعیین کمترین غلظت بازدارندگی و کشندگی میکروارگانیزم ها نشان داد که اسانس های مورد مطالعه دارای خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی هستند. براساس نتایج به دست آمده در جدول (۳)، خاصیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی نسبت به دارچین بیشتر بود و در غلظت های پایین تر می توان از آن علیه میکروارگانیزم ها استفاده کرد. البته شایان ذکر است که برای استفاده از اسانس های ذکر شده در سامانه های غذایی باید غلظت های بالاتری از اسانس ها را استفاده کرد (Bassolé & Juliani, 2012).

مقایسه ترکیبات قبل و بعد از تیمار حرارتی نشان می دهد که مونوترپنی مانند پارا-سیمن^۱ بر اثر حرارت دچار تغییر شکل شده و بر اثر واکنش های تبدیلی به اورتو-سیمن^۲ تبدیل شدند که به احتمال زیاد ناشی از تغییر مکان گروه عاملی از موقعیت پارا به اورتو بوده است؛ همچنین بر اثر واکنش های تجزیه ای و تبدیلی، ترکیبات اصلی آویشن شیرازی که شامل تیمول و کارواکرول می شوند، بر اثر حرارت حدود ۱۴ درصد افزایش یافته است. ترکیبات کم مقدار جدیدی مانند کاراکرول استات، آلفا-کارن^۳ و کاریوفی^۴ نیز تشکیل شده اند که ممکن است به دلیل جابه جایی گروه عاملی یا تغییر در ساختار مولکول، مقدار کمی از کارواکرول که کاهش پیدا کرده است به کارواکرول استات تبدیل شده باشد. Xing و همکاران (۲۰۱۰) ترکیبات مؤثره اسانس دارچین را بررسی کردند و اعلام نمودند سینامالدهید ترکیب شاخص و عمده اسانس دارچین است. Naderi و همکاران (۲۰۱۰) نیز درصد ترکیبات مؤثره آویشن شیرازی و دارچین را با استفاده از GC-MS به دست آورده و اعلام کردند آویشن شیرازی شامل ۸۸/۰۹ درصد کارواکرول، ۱/۳۷ درصد تیمول و ۲/۸۰ درصد لینالول است و دارچین نیز دارای ۹۶/۸۲ درصد سینامالدهید است که با نتایج پژوهش حاضر نیز همخوانی دارد. Golkar و همکاران (۲۰۲۰) نیز گونه های مختلف آویشن باغی و آویشن شیرازی ایران را بررسی کردند و اعلام کردند که در مناطق جغرافیایی متنوع مورد مطالعه، محتوای کارواکرول ۴۶/۲۲-۴/۹۹ درصد و تیمول ۷۰/۱۲-۱۴/۸ درصد بوده که ترکیبات شاخص و اصلی آویشن می باشند. Razavi و همکاران (۲۰۲۰) اعلام کردند که ترکیب اصلی اسانس دارچین سینامالدهید (۸۲/۸۰ درصد) و برای آویشن شیرازی، تیمول (۳۲/۶۸ درصد)، کارواکرول (۳۰/۵۷ درصد) و پاراسمین (۸/۹۴ درصد) بوده است. Raeisi و همکاران (۲۰۲۱) نیز سینامالدهید را در دارچین و کارواکرول و تیمول را در آویشن شیرازی بیشترین ماده مؤثره این اسانس ها گزارش کردند. Yu و همکاران (۲۰۲۰) ترکیبات اسانس دارچین را به سه روش استخراج با بخار آب، استخراج با بخار با کمک فراصوت و استخراج با بخار با کمک مایکروویو بررسی کرده و اعلام کردند که سینامالدهید، ۲-متوکسی سینامالدهید و سینامیل استات ترکیبات اصلی اسانس دارچین را تشکیل می دهند. فصل مشترک پژوهش هایی که به بررسی ترکیبات مؤثره اصلی اسانس های دارچین و آویشن

^۳ α-Carene

^۴ Caryophyllene

^۱ p-Cymene

^۲ o-Cymene

جدول ۳- نتایج MIC، MBC و MFC اسانس‌ها (پی‌پی‌ام)

نوع اسانس	علیه باسیلوس سوبتیلیس	علیه اسپریژیلوس نایجر
آویشن شیرازی	۷/۸۰	۲۵۰
دارچین	۱۶۰۰۰	۴۰۰۰

در پژوهش‌های مشابه که روی خواص ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی و دارچین انجام شده است نیز قدرت ضد میکروبی بالای این اسانس‌ها اثبات شده است؛ به‌طور مثال Moghadam و همکاران (۲۰۱۹)، کمترین غلظت بازدارندگی دارچین علیه اسپریژیلوس/اکراسئوس^۱ در روز ۳ پس از کشت را ۳۹ میکروگرم بر لیتر گزارش کردند. MIC آویشن شیرازی و آویشن باغی نیز به ترتیب ۱۵۶ و ۷۸ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. همچنین کمترین غلظت قارچ‌کشی دارچین، آویشن شیرازی و آویشن باغی به ترتیب، ۷۸، ۳۱۲ و ۱/۲۵ میکروگرم بر لیتر گزارش نمودند. Xing و همکاران (۲۰۱۰) خاصیت ضد قارچی اسانس دارچین را علیه اسپریژیلوس فلاووس و پی‌سیلیوم/اکسپنسوم^۲ بررسی کردند. آنها نشان دادند که کمترین غلظت بازدارندگی دارچین علیه دو میکروارگانیسم ذکر شده ۱۶۰۰ پی‌پی‌ام است. Gandomi و همکاران (۲۰۰۹) خاصیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی را علیه اسپریژیلوس فلاووس بررسی و اعلام کردند که در غلظت بیشتر یا مساوی ۴۰۰ پی‌پی‌ام، به‌طور کامل رشد اسپریژیلوس را جلوگیری می‌کند و کمترین غلظت کشندگی اسانس نیز ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام می‌باشد. Zamanian Chaleshtori و همکاران (۲۰۲۱) کمترین غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی را علیه گونه‌های اسپریژیلوس و پی‌سیلیوم به ترتیب ۱۰۰۰ و ۵۰ پی‌پی‌ام و کمترین غلظت کشندگی رشد را نیز ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام عنوان کردند. Raeisi و همکاران (۲۰۲۱)، اثر ضد میکروبی دارچین و آویشن افزوده شده به نانوفیبر حاوی ایزوله پروتئین سویا و ژلاتین علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و منفی را بررسی و اعلام نمودند به‌طور کلی آویشن شیرازی نسبت به دارچین، خاصیت ضد میکروبی قوی‌تری در برابر میکروب‌های مورد آزمون دارد. آویشن شیرازی توانست به‌طور کامل رشد باسیلوس سرئوس^۳، لیستریا مونوسیتوژنز^۴ استافیلوکوکوس اورئوس^۵ جلوگیری نماید؛ در حالی که به ترتیب به میزان ۷۰ و ۶۳ درصد مانع رشد

اشریشیاکلی^۶ و سالمونلا تیفی‌موریوم^۷ شد.

به‌طور کلی خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها بیشتر ناشی از ترکیبات فنولی می‌باشد، مکانیسم اثرگذاری، بدین صورت است که ترکیبات فنولی باعث آسیب به دیواره میکروارگانیسم و سوراخ شدن آن شده و با نشت یون‌های پتاسیم و ATP بین سلولی، در نهایت باعث مرگ سلول می‌شود (Bounatirou et al., 2007; Kordsardouei et al., 2010; Sharafati-chaleshtori et al., 2013).

بررسی قطر هاله عدم رشد

علاوه بر تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس‌های آویشن شیرازی و دارچین، جهت بررسی و مقایسه فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها، هاله عدم رشد آنها علیه باسیلوس سوبتیلیس و اسپریژیلوس نایجر، قبل و بعد از فرایند حرارتی، اندازه‌گیری و با هاله عدم رشد حاصل از چند آنتی‌بیوتیک مقایسه گردید. همان‌طور که در جدول (۴) قابل مشاهده است؛ آویشن شیرازی هم بر علیه کپک و هم بر علیه باکتری اصلی عامل فساد نان، عملکرد ضد میکروبی بهتری نشان داد. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده، اعمال حرارت سبب کاهش قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط آویشن و دارچین به ترتیب علیه باکتری و کپک شد. در بررسی هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، آمپی‌سیلین و اریترومایسین نیز مشخص گردید که آمپی‌سیلین و جنتامایسین با هاله عدم رشد برابر (۳۰ میلی‌متر) و سپس اریترومایسین (۶/۹۰ میلی‌متر) در برابر کپک اسپریژیلوس نایجر خاصیت ضد کپکی نشان دادند. از سوی دیگر در برابر باکتری باسیلوس سوبتیلیس، اریترومایسین بزرگ‌ترین هاله عدم رشد معادل ۲۰/۷۰ میلی‌متر را ایجاد کرد و سپس به ترتیب آمپی‌سیلین (۱۰/۴۴ میلی‌متر) و جنتامایسین (۹/۴۴ میلی‌متر) قرار داشتند.

جدول ۴- هاله عدم رشد اسانس‌ها بر علیه کپک و باکتری اصلی فساد نان (میلی‌متر) قبل و بعد از فرایند حرارتی

نوع	نوع	اسانس	اسانس
میکروارگانیسم <td>اسانس <td>حرارت ندیده <td>حرارت دیده </td></td></td>	اسانس <td>حرارت ندیده <td>حرارت دیده </td></td>	حرارت ندیده <td>حرارت دیده </td>	حرارت دیده
باسیلوس	آویشن	۲۹/۶۶±۰/۴۷	۲۹/۰۰±۰/۸۲
سوبتیلیس	دارچین	۲۹/۲۰±۱/۲۸	۱۷/۰۰±۰/۰۰
اسپریژیلوس نایجر	آویشن	۲۵/۳۰±۰/۰۰	۴/۸۲±۲۰/۵۰
	دارچین	۱۶/۷۰±۰/۰۰	۰/۷۸±۱۶/۰۵

⁵ *Staphylococcus aureus*

⁶ *Escherichia coli*

⁷ *Salmonella typhimurium*

¹ *Aspergillus ochraceus*

² *Penicillium expansum*

³ *Bacillus cereus*

⁴ *Listeria monocytogenes*

گردید که هر دو اسانس آویشن شیرازی و دارچین حتی بعد از اعمال حرارت دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجه در برابر میکروارگانیسم‌های اصلی عامل فساد نان هستند. به‌طور کلی، محتوای اسانس‌ها در طول فرایند حرارتی تغییر محسوسی نکرد، بنابراین هر دو اسانس روغنی در برابر فراوری حرارتی (۲۰۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه) مقاوم بودند که این امر پتانسیل استفاده از آنها در فرمولاسیون یا در بسته‌بندی نان و محصولات نانویی را به‌منظور افزایش ایمنی غذا و کاهش خطر پاتوژن‌های غذایی نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله در قالب قرارداد پژوهشی مشترک بین مأسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی (مشهد، ایران) و شرکت ناهید آسمان ایرانیان (مشهد، ایران) حمایت مالی شده است که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

مشارکت نویسندگان

سیدجواد حسینی: جمع‌آوری داده، آنالیز داده‌ها، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله؛ محبوبه سرابی جماب: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی؛ مصطفی شهیدی نوقابی: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، آنالیز داده‌ها، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی؛ حسین زمانی: ارائه ایده پژوهشی، نظارت بر مطالعه؛ غلام حسین ظهوری: ارائه ایده پژوهشی، نظارت بر مطالعه.

تضاد منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

Moghadam و همکاران (۲۰۱۹) قطر هاله عدم رشد اسانس‌های مختلف علیه کپک *آسپرژیلوس اکراسئوس* را به روش انتشار دیسک اندازه‌گیری کردند، نتایج نشان داد که پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری، درمورد دارچین فقط در حاشیه پتری‌دیش کپک رشد کرده بود و درمورد آویشن شیرازی و آویشن باغی هیچ‌گونه رشدی مشاهده نشد؛ همچنین پس از ۷۲ ساعت هاله عدم رشد دارچین، آویشن شیرازی و آویشن باغی را به ترتیب ۴۲، ۳۵/۵ و ۳۲/۵ میلی‌متر گزارش کردند. Sun و همکاران (۲۰۲۰)، خاصیت ضد میکروبی فیلم‌های امولسیون پیکرینگ اکتیل سوکسینات نشاسته سدیم^۱ که با دارچین ریزپوشانی شدند را علیه *باسیلوس سوبتیلیس* بررسی کردند و نشان دادند که غلظت ۱۰ درصد از اسانس دارچین قادر است ۱۹ میلی‌متر هاله عدم رشد در برابر *باسیلوس سوبتیلیس* ایجاد کند. Zamanian Chaleshtori و همکاران (۲۰۲۱) هاله عدم رشد آویشن شیرازی را علیه کپک‌های گونه‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* به ترتیب ۱۱/۶ و ۵/۷ میلی‌متر به دست آوردند. میزان هاله عدم رشد در پژوهش‌های مختلف بسته به غلظت و چگونگی کاربرد اسانس و منطقه جغرافیایی که گیاه از آن جمع‌آوری شده و همچنین دستگاه و نحوه و حتی مدت زمان استخراج اسانس دارد ولی در مقایسه نتایج پژوهش اخیر با مقاله‌های مشابه، واضح است که دارچین و آویشن خاصیت ضد میکروبی مطلوبی در برابر میکروارگانیسم‌های هدف از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج GC-MS، قبل و بعد از تیمار حرارتی، مشخص شد که اسانس آویشن شیرازی و دارچین به حرارت مقاوم بوده و ترکیبات مؤثره اصلی آنها نیز طی حرارت تغییر محسوسی نکردند. از سوی دیگر، بر اساس نتایج آزمایش‌های MIC، MBC، MFC و همچنین انتشار دیسک مشخص

منابع

- Alhendi, A., & Choudhary, R. (2013). Current Practices in Bread Packaging and Possibility of Improving Bread Shelf-life by Nano-technology. *INT J Food SCI Nutr*, 3, 55-60 .
- Aljeldah, M. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Potencies of Chemically-Profiled Essential Oil from *Asteriscus graveolens* against Clinically-Important Pathogenic Microbial Strains. *Molecules*, 27(11), 3539. <https://doi.org/10.3390/molecules27113539> .

¹ Sodium starch octenylsuccinate-based Pickering emulsion

- Axel, C., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2017). Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(16), 3528-3542. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1147417>
- Badr, M. M., Badawy, M. E. I., & Taktak, N. E. M. (2022). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde nanoemulsions. *Journal of Essential Oil Research*, 34(6), 544-558. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2107100>
- Bagamboula, C., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food microbiology*, 21(1), 33-42. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7)
- Bahmani, M., Tajeddini, P., Ezatpour, B., Rafieian-Kopaei, M., Naghdi, N., & Asadi-Samani, M. (2016). Ethenobotanical study of medicinal plants against parasites detected in Shiraz, southern part of Iran. *Der Pharmacia Lettre*, 8(1), 153-160 .
- Banwart, G. J. (1989). Chapter10- Control of Microorganisms. In *Basic Food Microbiology* Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6453-5_10
- Bassolé, I. H., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Basti, A. A., Gandomi, H., Noori, N., & Khanjari, A. (2016). Chapter 83 - Shirazi thyme (*Zataria multiflora* Boiss) Oils. In Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 731-736). (Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00083-3>
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Borghai, M., Karbassi, A., Oromiehie, A., & Javid, A. (2010). Microbial biodegradable potato starch based low density polyethylene. *African Journal of Biotechnology*, 9(2), 4075-4080 .
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M. N., Neffati, M., . . . Pedro, L. G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff .et Link. *Food Chemistry*, 105(1), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.059>
- Calo, J. R., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems— A review. *Food control*, 54, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>
- Cook, F. K., & Johnson, B. L. (2009). Microbiological Spoilage of Cereal Products. In Sperber & Doyle (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Food Microbiology and Food Safety*. (pp. 223-244). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_8
- Couladis, M., Tzakou, O., Kujundzic, S., Sokovic, M., & Mimica-Dukic, N. (2004). Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(1), 40-42. <https://doi.org/10.1002/ptr.1353>
- Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1143-1156 .
- FAO. (2023). *Food Loss and Waste database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/platform-food-loss-waste/flw-data/en/>
- Faparusi, F., & Adewole, A. (2019). Characterization of moulds associated with spoilage of bread sold in Ilaro, Yewa-South, Nigeria. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(1), 426-433. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i1.33>
- Fattahi, R., Ghanbarzadeh, B., Dehghannya, J., Hosseini, M., & Falcone, P. M. (2020). The effect of Macro and Nano-emulsions of cinnamon essential oil on the properties of edible active films. *Food Science & Nutrition*, 8(12), 6568-6579. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1946>

- Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A. A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A., & Javan, A. J. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2397-2400. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.05.024>
- Golkar, P., Mosavat, N., & Jalali, S. A. H. (2020). Essential oils, chemical constituents, antioxidant, antibacterial and in vitro cytotoxic activity of different *Thymus* species and *Zataria multiflora* collected from Iran. *South African Journal of Botany*, 130, 250-258. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.005>
- Guynot, M., Ramos, A., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., & Marin, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899 .
- Jideani, V. A., & Vogt, K. (2016). Antimicrobial packaging for extending the shelf life of bread—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1313-1324. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.768198>
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Kordsardouei, H., Barzegar, M., & Sahari, M. A. (2013). Application of *Zataria multiflora* Boiss. and *Cinnamon zeylanicum* essential oils as two natural preservatives in cake. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(3), 238-247 .
- Krepker, M., Zhang, C., Nitzan, N., Prinz-Setter, O., Massad-Ivanir, N., Olah, A., . . . Segal, E. (2018). Antimicrobial LDPE/EVOH Layered Films Containing Carvacrol Fabricated by Multiplication Extrusion. *Polymers*, 10(8) .
- Mahmoudvand, H., Mahmoudvand, H., Olliaee, R. T., Kareshk, A. T., Mirbadie, S. R., & Aflatoonian, M. R. (2017). In vitro protoscolicidal effects of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil and its toxicity in mice . *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 3), S652. https://doi.org/10.4103%2Fpm.pm_280_16
- Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., & Nerin, C. (2013). Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food control*, 30(2), 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.018>
- Mazkour, S., Shekarforoush, S. S., & Basiri, S. (2019). The effects of supplementation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* spores on the intestinal microflora and growth performance in rat. *Iran J Microbiol*, 11(3), 260-266 .
- Moghadam, Z. A., Hosseini, H., Hadian, Z., Asgari, B., Mirmoghtadaie, L., Mohammadi, A., . . . Javadi, N. H. S. (2019). Evaluation of the antifungal activity of cinnamon, clove, thymes, *Zataria multiflora*, cumin and caraway essential oils against Ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus*. *J. Pharm. Res. Int.*, 26(1), 1-16 .
- Muhalidin, B. J., Hassan, Z., & Saari, N. (2013). Lactic acid bacteria in biopreservation and the enhancement of the functional quality of bread. *Lactic acid bacteria R & D for food, health and livestock purposes. InTech, Rijeka*, 155-172. <https://doi.org/10.5772/51026>
- Naderi, G. A., Jafari, D. N., Jafarian Dehkordi, A., Asgary, S., & Shami, R. (2010). Analysis of essential oil components from four food spices and determination of their in vitro fibrinolytic activity. *Physiology and Pharmacology*, 13(4), 423-429 .(in Persian)
- Neffati, N., Aloui, Z., Karoui, H., Guizani, I., Boussaid, M., & Zaouali, Y. (2017). Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the Tunisian flora. *Natural Product Research*, 13(3), 1583-1588. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1280490>
- Pacher, N., Burtscher, J., Jöhler, S., Etter, D., Bender, D., Fieseler, L., & Domig, K. J. (2022). Ropiness in Bread—A Re-Emerging Spoilage Phenomenon. *Foods*, 11(19), 3021. <https://doi.org/10.3390/foods11193021>
- Palermo, M., Pellegrini, N., & Fogliano, V. (2014). The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1057-1070. <https://doi.org/doi/abs/10.1002/jsfa.6478>

- Paventi, G., de Acutis, L., De Cristofaro, A., Pistillo, M., Germinara, G. S., & Rotundo, G. (2020). Biological activity of *Humulus lupulus* (L.) essential oil and its main components against *Sitophilus granarius* (L.). *Biomolecules*, 10(8), 1108. <https://doi.org/10.3390/biom10081108>
- Prasad, K. N., Yang, B., Dong, X., Jiang, G., Zhang, H., Xie, H., & Jiang, Y. (2009). Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 627-632. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.009>
- Raeisi, M., Mohammadi, M. A., Coban, O. E., Ramezani, S., Ghorbani, M., Tabibiazar, M., . . . Noori, S. M. A. (2021). Physicochemical and antibacterial effect of Soy Protein Isolate/Gelatin electrospun nanofibres incorporated with *Zataria multiflora* and *Cinnamon zeylanicum* essential oils. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1116-1126. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00700-0>
- Rahman, M. M., & Simsek, S. (2020). Go clean label: replacement of commercial dough strengtheners with hard red spring wheat flour in bread formulations. *Journal of Food science and Technology*, 57(10), 3581-359. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04390-w>
- Ravimannan, N., Sevel, P., & Saarutharshan, S. (2016). Study on fungi associated with spoilage of bread. *Int J Adv Res Biol Sci*, 3(4), 165-167. <http://s-o-i.org/1.15/ijarbs-2016-3-4-23>
- Razavi, M. S., Golmohammadi, A., Nematollahzadeh, A., Ghanbari, A., & Davari, M. (2020). Optimizing the antifungal effects of *Cinnamomum zeylanicum*, *Zataria multiflora*, and *Satureja khuzestanica* essential oils against the blue mold fungus (*Penicillium expansum*) using Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 51(1), 67-78. <https://doi.org/10.22059/ijpps.2020.291689.1006917> (in Persian)
- Riehle, P., Vollmer, M., & Rohn, S. (2013). Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions -Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International*, 53(2), 891-899. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.020>
- Saadati Ardestani, N., Rojas, A., Esfandiari, N., Galotto, M. J., Babhadiashar, A., & Sajadian, S. A. (2022). Supercritical fluid extraction from *Zataria multiflora* boiss and impregnation of bioactive compounds in PLA for the development of materials with antibacterial properties. *Processes*, 10(9), 1787. <https://doi.org/10.3390/pr10091787>
- Sharaf, E. F., & Al-Zaidi, H. S. (2021). In vitro Antifungal Activity of Some Indigenous Medicinal Plant Extracts against Five Isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(4), 695-700. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.820>
- Sharafati-chalesshtori, R., Sharafati-chalesshtori, F., Sharafati-chalesshtori, A., & Ashrafi, K. (2010). Antimicrobial effects and evaluation of total phenols flavonoids and flavonols contents of ethanolic extracts of *Scrophularia striata*. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 11(4), 32-37. (in Persian)
- Sun, H., Li, S., Chen, S., Wang, C., Liu, D., & Li, X. (2020). Antibacterial and antioxidant activities of sodium starch octenylsuccinate-based Pickering emulsion films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 696-703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.118>
- Sun, Q., Li, J., Sun, Y., Chen, Q., Zhang, L., & Le, T. (2020). The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food Chemistry*, 317, 126405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126405>
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., & Saija, A. (2005). Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89(4), 549-554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.011>
- Watkins, E. (1906). Ropiness in flour and bread and its detection and prevention. *J. Soc. Chem. Ind*, 25, 350-357.
- Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, K., Pei, H., & Tao, F. (2020). The Efficacy of Composite Essential Oils against Aflatoxigenic Fungus *Aspergillus flavus* in Maize. *Toxins*, 12(9), 562. <https://doi.org/10.3390/toxins12090562>
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., & Lu, Y. (2010). Original article: Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1837-1842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02342.x>

- Yu, T., Yao, H., Qi, S., & Wang, J. (2020). GC-MS analysis of volatiles in cinnamon essential oil extracted by different methods. *Grasas y Aceites*, 71(3), e372-e372. <https://doi.org/10.3989/gya.0462191>
- Zamanian Chaleshtori, Z., Bonyadian, M., Moshtaghi, H., & Ebrahimi, A. (2021). Antifungal effects of essential oils of *Zataria multiflora*, *Mentha pulegium*, and *Mentha piperita*. *Journal of food quality and hazards control*. <https://doi.org/10.18502/jfqhc.8.1.5462>
- Zomorodian, K., Ghadiri, P., Saharkhiz, M. J., Moein, M. R., Mehriar, P., Bahrani, F., . . . Fani, M. M. (2015). Antimicrobial activity of seven essential oils from Iranian aromatic plants against common causes of oral infections. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2). <https://doi.org/10.5812%2Fjjm.17766>

Investigating the Effect of Heat Treatment on the Compounds and Antimicrobial Properties of Shirazi Thyme and Cinnamon Essential Oils

Sayyed Javad Hosseini¹, Mahboobe Sarabi-Jamab³, Mostafa Shahidi Noghabi²,
Hossein Zamani⁴, Gholam hossein Zohuri⁵

1- Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Industry, Mashhad, Iran

2- Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology Mashhad, Iran

* Corresponding author (m.sarabi@rifst.ac.ir)

3- Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

4- Department of Food Machineries, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

5- Department of Polymer, Chemistry, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Nowadays if essential oils can remain stable in food processing conditions, they can be used as an alternative to synthetic preservatives in food products. In this research, in addition to investigating the compounds of *Zataria multiflora* and cinnamon essential oils by gas chromatography-mass spectrometry, the antimicrobial properties of two essential oils before and after heat treatment (200 °C; 10 min) against *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger* were evaluated. Based on the obtained results, the thermal process did not significantly affect the main compounds of the essential oils. Cinnamaldehyde and eugenol were the main constituents of cinnamon essential oil, while phenolic compounds (thymol and carvacrol) made up 61.5% of *Z. multiflora* essential oil. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of *Z. multiflora* and cinnamon essential oils against *Aspergillus niger* were 250 and 4000 µL/mL, respectively, while the minimum fungicidal concentrations (MFCs) were 250 and 16,000 µL/mL, respectively. Against *Bucillus subtilis*, the MIC and minimum bactericidal concentrations (MBC) values were 7.8 and 15.6 µL/mL for *Z. multiflora*, and 16,000 and 32,000 µL/mL for cinnamon, respectively. The inhibition zones of heated *Z. multiflora* and cinnamon essential oils were 20.5 and 16.05 mm against *A. niger* and 29.00 and 17.00 mm against *B. subtilis*, respectively. In general, the results demonstrated that the thermal process did not significantly affect the antimicrobial activity of the essential oils, meaning that they are suitable for use as antimicrobial agents in products that undergo thermal processing.

Keywords: Cinnamon, Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Minimum Bactericidal Concentrations, Minimum Inhibitory Concentration, *Zataria multiflora*

