ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، رنگ و اثرات ضد باکتریایی فیلم خوراکی کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی علیه لیستریا منوسیتوژنز

مهران مرادی [*]
حسین تاجیک [**]
سید مهدی رضوی روحانی [***]
عبدالرسول ارومیه ای [****]
حسن ملکی نژاد [*****]
سید سیاوش ساعی دهکردی [******]

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

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

[***] دکترای بهداشت مواد غذایی، استاد دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی

[****] دکترای شیمی پلیمر، دانشیار پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، گروه پلاستیک

[*****] دکترای سم‌شناسی، استادیار دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه

[******] دکترای بهداشت مواد غذایی، استادیار دانشگاه شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی و پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان ودام

تاریخ وصول:۱۳۸۹/۵/٦

تاریخ پذیرش:۱۳۸۹/۷/۲۰

مؤلف مسؤول: حسین تاجیک

پست الکترونیک: h.tajik@urmia.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: فیلم حاوی مواد ضد میکروبی، از انواع بسته‌بندی فعال بوده که به منظور کنترل فساد میکروبی در مواد غذایی استفاده می‌گردد. هدف از این تحقیق، بررسی اثرات اسانس آویشن شیرازی برروی ویژگی‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و رنگ فیلم خوراکی کیتوزان بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۸۹ــ ۱۳۸۸ در دانشگاه ارومیه انجام شد. در این مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی‌شناسایی گردید. فیلم کیتوزان حاوی اسانس در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد، با روش کاستینگ تهیه گردید. در فیلم، میزان فنل کل، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، رنگ و اثرات ضد میکروبی علیه لیستریا منوسیتوژنز، ارزیابی شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و گراف پد و آزمون آماری دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین میزان فنل کل مربوط به فیلم حاوی اسانس ۲ و سپس به ترتیب مربوط به فیلم حاوی ۱، ۰/۵ و ۰ درصد اسانس بود. قدرت آنتی‌اکسیدانی فیلم کیتوزان با افزودن اسانس افزایش می‌یابد. این افزایش در اسانس ۱ و ۲ درصد نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<0/05$). مقایسه نتایج شاخص شفافیت، نشان از عدم تغییر معنی‌دار شفافیت فیلم کیتوزان خالی در اثر اضافه کردن اسانس داشت. در حالی که افزودن اسانس به طور معنی‌داری باعث کاهش شاخص زردی فیلم‌ها گردید. نتایج نشان داد که فیلم‌های حاوی اسانس، موجب افزایش معنی‌دار در ویژگی ضد لیستریایی فیلم کیتوزان گردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که می‌توان بسته و فیلم فعال کیتوزان، با استفاده از اسانس آویشن شیرازی تهیه نمود. افزودن اسانس، موجب بهبود خصوصیات عملکردی و ضد باکتریایی فیلم می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فیلم کیتوزان، اسانس آویشن، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان

مقدمه

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه بسته‌بندی و با هدف بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی، میکروبی و ارگانولپتیک محصولات غذایی صورت گرفته است. در بسته‌بندی‌های معمول یا غیر فعال[۱]، هدف اصلی فراهم نمودن یک لایه نفوذ ناپذیر برروی محصول است، در حالی که در نوع دیگر، تحت عنوان بسته‌بندی فعال[۲]، به منظور بهبود خصوصیات پوشش و افزایش مدت ماندگاری ماده غذایی، از یک سری ترکیب‌های شیمیایی و فیزیکی در پوشش و فیلم بسته‌بندی استفاده می‌گردد. در این ارتباط استفاده از فیلم‌های خوراکی[۳] و زیست تخریب‌پذیر به عنوان یک ابزار برای دستیابی به بسته‌بندی فعال و به عنوان یک جایگزین مناسب برای پوشش‌های پلاستیکی غیر تخریب‌پذیر مورد توجه قرار گرفته است(۲و۱).

ماهیت اغلب فیلم‌های خوراکی، بیوپلیمرهای لیپیدی(واکس‌ها و اسیدهای چرب)، پلی‌ساکاریدی (کیتوزان، سلولز، آلژینات ونشاسته) و یا پروتئینی (پروتئین‌های آب پنیر، سویا و ذرت) است(۳). یکی از این ترکیب‌ها کیتوزان می‌باشد که به عنوان پلی‌ساکاریدی پلی‌کاتیونی، به دنبال استیل‌زدایی از کیتین تهیه می‌گردد. منبع عمده و تجاری کیتین، پوسته سخت پوستان است. این پلی‌ساکارید دارای ویژگی‌هایی از جمله زیست تخریب‌پذیری، سازگاری با محیط و غیر سمی بودن است، هم‌چنین ویژگی‌های عملکردی شامل؛ خصوصیات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و تشکیل فیلم را نیز به آن نسبت می‌دهند. امروزه از کیتوزان هم به عنوان یک افزودنی سالم و هم به صورت فیلم استفاده می‌گردد (۴). فیلم کیتوزان اولین بار در سال ۱۹۳۶ به وسیله ریگبای[۴] به روش کاستینگ[۵] تهیه شد. فیلم تهیه شده انعطاف‌پذیر، محکم، شفاف، بی‌رنگ و با قدرت کشش ۹۰۰۰ پوند بر اینچ مربع بود. بررسی‌های سایر پژوهشگران بر روی فیلم‌های تهیه شده به روش یاد شده، نشان داد که چنین فیلم‌هایی دارای ویژگی‌های مکانیکی و نفوذ ناپذیری مناسب در برابر گازها می‌باشند(٦ و۵).

امروزه استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی با منشاء گیاهی و حیوانی به خاطر توانایی بالقوه آنها به عنوان افزودنی‌های سالم، به منظور کنترل میکروبی، شیمیایی و افزایش ماندگاری، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در حال حاضر تمایل مشتریان مواد غذایی بیشتر به استفاده از مواد غذایی سالم فاقد افزودنی‌های مصنوعی، دارای کیفیت و ماندگاری مناسب‌تر معطوف شده است(۷). گیاهان خوراکی و دارویی و مشتقات آنها (اسانس‌ها، هیدروسل و عصاره‌های گیاهی) به دلیل داشتن ترکیبات ضد میکروبی قوی و گوناگون، به طور گسترده‌ای برای جلوگیری از رشد عوامل میکروبی بیماری‌زا استفاده می‌شوند(۸).

1-Passive Packaging
2-Active Packaging
3-Edible Films
4-Rigby
5-Casting

آویشن شیرازی، گیاهی درختچه‌ای و متعلق به تیره نعناعیان است که به طور سنتی به عنوان افزودنی و چاشنی در مواد غذایی استفاده می‌شود. این گیاه معطر از نظر جغرافیایی بومی مناطق گرم کشورهای ایران، پاکستان و افغانستان است. اسانس آروماتیک این گیاه، به دلیل داشتن ترکیبات منوترپنی‌فنلی، یکی از مؤثرترین اسانس‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به شمار می‌رود(۹). تیمول یکی از مهم‌ترین ترکیبات منوترپنی اکسیژنه با خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی و جلوگیری کننده از رشد و تولید مایکوتوکسین است که در اسانس آویشن، پونه کوهی، مرزه، مریم گلی و تعداد زیادی از گیاهان یافت می‌شود(۸).

روش‌های مختلفی برای استفاده از اسانس‌ها در مواد غذایی وجود دارد. روش معمول استفاده از اسانس در غذا، اضافه نمودن مستقیم و یا اسپری محلول اسانس در یک غلظت مشخص بروی سطح خارجی ماده غذایی است. به دلیل عدم کنترل میزان تماس و رهایش اسانس اسپری شده در سطح ماده غذایی، میزان اسانس مصرفی در این روش بسیار بالا است(۱۰). روش دیگری که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، وارد کردن اسانس در فیلم های زیست تخریب پذیر و خوراکی و تولید فیلم‌های تحت عنوان فیلم ضد میکروبی است. فیلم ضد میکروبی، یکی از انواع بسته‌بندی فعال بوده که در آن به منظور کنترل عوامل بیماری‌زا، فساد میکروبی و شیمیایی، از یک سری افزودنی‌های غذایی همچون مواد ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان و سایر مواد با خصوصیات بیولوژیک دیگر، در داخل پوشش و یا بسته غذایی استفاده می‌گردد تا امکان فساد به حداقل برسد (۱۲و۱۱).

هدف از این مطالعه تهیه فیلم ضدمیکروبی- آنتی‌اکسیدان کیتوزان با استفاده از اسانس روغنی آویشن شیرازی و ارزیابی اثرات غلظت‌های مختلف اسانس بر روی خصوصیات ضد میکروبی، فنل کل، آنتی‌اکسیدان و رنگ فیلم خوراکی کیتوزان در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۸۹ــ ۱۳۸۸ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد.

بخش‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی[1] خشک از استان اصفهان خریداری و پس از شناسایی گونه و جنس (شماره هرباریم۱۳-۲۱)، اسانس روغنی آن به روش تقطیر با آب[2] با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه گردید. اسانس حاصل به رنگ متمایل به زرد با بوی منحصر به فرد گیاه، با سولفات سدیم آنهیدروز آب گیری و از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و تا زمان استفاده در شیشهٔ مخصوص درب دار تیره رنگ، در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی روغن فرار گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به

1-Zataria multiflora Boiss
2-Hydrodistillation

طیف‌سنج جرمی[1] استفاده گردید(۱۳).

کیتوزان با وزن ملکولی متوسط، درجه استیل زدایی مساوی و یا بیشتر از ۷۵ درصد از شرکت سیگما آلدریچ[2] خریداری گردید. برای تهیه محلول کیتوزان ابتدا محلول اسید استیک یک درصد حجمی تهیه و سپس محلول کیتوزان دو درصد وزنی/حجمی، در اسید مذکور تهیه شده و پس از حل شدن کامل، محلول در شرایط خلاء و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید. سپس به میزان ۰/۵ گرم گلیسرول به ازاء هر گرم کیتوزان به محلول اضافه و همگن شد.

برای تهیه فیلم تیمارهای لازم با استفاده از اسانس آویشن در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد در محلول کیتوزان تهیه گردید. لازم به ذکر است، که در مطالعه‌های مقدماتی صورت گرفته، مشخص شد که فیلم کیتوزان حاوی کمتر از ۰/۵ درصد اسانس، دارای اثرات ضد میکروبی مناسب نبوده است، لذا غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ درصد انتخاب گردید. سپس محلول با ۱۳۰۰۰ دور دقیقه به مدت دو دقیقه به وسیله دستگاه هموژنیزاتور، به هم زده شد. سپس حباب‌های هوای داخل آن در شرایط خلاء و نیز با استفاده از گاز نیتروژن گرفته شد. برای تهیه فیلم، از روش کاستینگ و در قالب‌هایی از جنس پلی تترا فلوروواتیلن استفاده گردید. نهایتاً جهت خشک شدن فیلم، قالب‌ها در یک سطح کاملاً صاف و در دمای اتاق، به مدت ۳۶ ساعت نگهداری گردید. پس از خشک شدن کامل، فیلم‌ها به آرامی از داخل قالب جدا شده، و قبل از انجام آزمایش‌های مربوطه، در شرایط ثابت رطوبت و دما در داخل دسیکاتور حاوی محلول اشباع بروماید سدیم به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید.

باکتری لیستریا منوسیتوژنز[3] از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. باکتری قبل از استفاده به طور متوالی دو بار در محیط تریپتوز سوی براث [4] تجدید کشت گردید. کشت دوم با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط مذکور تهیه و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت نگهداری گردید. سپس از کشت ۲۰ ساعته رقت لازم را تهیه و هم‌زمان با تعیین میزان جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر، در رقت‌های تهیه شده، شمارش باکتریایی به روش شمارش صفحه‌ای سطحی انجام گردید. در نهایت جذب نوری معادل تقریبی ۱×۱۰^{۶} باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص گردید.

قبل از ارزیابی اثرات ضد میکروبی و به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی، فیلم در داخل لامینار فلو به مدت ۲ دقیقه در معرض اشعه ماوراء بنفش قرار گرفت. برای بررسی فعالیت ضد میکروبی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۰ ساعته باکتری که حاوی ۱×۱۰^{۶} باکتری در هر میلی‌لیتر است، در محیط کشت تریپتوز سوی آگار[5] تلقیح نموده و

1-Gas chromatography- Mass Spectrometers
2-Sigma- Aldrich
3-Listeria monocytogenes PTCC1163
4-Triptic Soy Broth
5-Triptic Soy Agar

سپس در شرایط استریل، یک عدد دیسک گرد ازفیلم به قطر ۱۰ میلی متر را در پلیت قرار داده، و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت جهت تعیین میزان بازدارندگی فیلم‌های مورد مطالعه برروی باکتری، مساحت هاله بازدارندگی[۱] تشکیل شده با کولیس دیجیتال تعیین و از مساحت فیلم کسر گردید. برای ارزیابی رشد باکتری در سطح زیر فیلم، پس از قرائت مساحت هاله، دیسک فیلم از روی پلیت برداشته و رشد و یا عدم رشد ناحیه پوشیده شده با فیلم به صورت چشمی بررسی گردید.

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی فیلم، از روش رنگ سنجی فولین سیوکالتو[۲] استفاده شد. مقدار ۲۵ میلی‌گرم از فیلم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده و به مدت ۵ دقیقه به آرامی به هم زده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره فیلم، با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر را در داخل لوله آزمایشگاهی ریخته و در مرحله بعد، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین را اضافه کرده و محتویات با هم مخلوط شد. پس از ۸ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس مقدار جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. اسید گالیک به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

درصد به دام اندازی رادیکال ۲ و ۲ دی‌فنیل، ۱ پیکریل هیدرازیل[۳] با استفاده از روش تغییر یافته سیریپاتراون و هارت[۴] (۲۰۱۰) انجام گرفت(۱۴).

شاخص‌های رنگ هانتر (L^*, a^*, b^*) به وسیله دستگاه رنگ سنج مینولتا اندازه‌گیری شد.L^*؛ شاخص شفافیت نمونه (۰= سیاه و ۱۰۰= سفید)،a^*؛ شاخص قرمزی (۶۰- = سبز و ۶۰+ = قرمز) و b^* شاخص زردی (۶۰-= آبی و ۶۰+= زردی) می‌باشند. ارزیابی رنگ در چهار نقطه از فیلم (یکی در وسط و سه نقطه در کنار) انجام گردید.

کلیه آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام گرفت. آنالیز بر اساس مدل فاکتوریال صورت گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS[۵] و گراف پد[۶] و آزمون آماری دانکن[۷] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، ۲۹ ترکیب که ۹۸/۳۸ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌شود، شناسایی گردید. در بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی، تیمول بیشترین میزان (۶۴/۸۷ درصد) را داشت و سپس ترکیباتی همچون گاما ترپینن[۸] (۹/۱۱ درصد)، پاراسیمن[۹]

1-Inhibition Zone
2-Folin- Ciocalteu
3-2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)
4-Siripatrawan & Harte
5-Statistical Package for Social Sciences
6- GraphPad
7- Duncan s' test
8-γ-Terpinene
9-p-Cymene

(۵/۶۳ درصد)، کارواکرول[1] (۴/۶۵ درصد) و ترانس کاریوفیلن[2] (۳/۴۱ درصد) قرار داشتند.

فیلم‌های ضد میکروبی کیتوزان تهیه شده در این مطالعه، انعطاف‌پذیر و تا حدودی محکم بوده و به راحتی از قالب جدا می‌شدند. میزان ثبات امولسیون محلول کیتوزان متأثر از میزان اسانس بود. در غلظت‌های پایین(۰/۵ و ۱ درصد) جداشدن فاز، متعاقب هموژنیزاسیون مشاهده نگردید. در حالی که در غلظت بالای اسانس (۲ درصد) جداشدن فاز به خصوص مدت کوتاهی بعد از هموژنیزاسیون مشاهده شد.

اثرات فیلم‌های ضد میکروبی بر روی رشد لیستریا منوسیتوژنز در محیط آگار، در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن موجب افزایش معنی‌داری در افزایش مساحت هاله بازدارندگی رشد باکتری گرم مثبت لیستریا در محیط کشت در مقایسه با فیلم کیتوزان بدون اسانس شد($p<0/05$). این تغیر، متأثر از میزان اسانس اضافه شده است. به طوری که اثرات فیلم کیتوزان حاوی اسانس، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد در کاهش رشد لیستریا، معنی‌دار است ($p < 0/05$). هم‌چنین نتایج نشان داد که در تمامی فیلم‌های مورد مطالعه، در ناحیه تماس فیلم و آگار، کلنی باکتریایی مشاهده نگردید.

فنل کل فیلم کیتوزان حاوی اسانس در نمودار ۱ آورده شده است. ترتیب میزان فنل فیلم‌ها نشان داد که با افزایش درصد اسانس میزان فنل بیشتر می‌شود. میزان فنل کل فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس ۰/۵ و ۱ درصد(۶ـ۵ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم فیلم) اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد ($p >0/05$).

فعالیت آنتی‌اکسیدان فیلم‌ها به صورت درصد به دام اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل بیان گردید. بر اساس نتایج، تمامی‌فیلم‌های تهیه شده، دارای توانایی به دام‌اندازی رادیکال دی فنیل پیکریل هیدرازیل بودند. فیلم کیتوزان همانند خود کیتوزان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی(۱۲/۳٤ درصد) مناسبی است(نمودار۲). قدرت آنتی‌اکسیدان فیلم کیتوزان با افزودن اسانس افزایش یافت. این میزان افزایش در استفاده از ۱ درصد (۳۳/۹۸ درصد) و ۲ درصد (۳۷/۷۷ درصد) معنی‌دار بود($p <0/05$)، به طوری که به ترتیب باعث افزایش ۲/۷و ۳ برابری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با گروه کنترل شد.

اثرات افزودن اسانس آویشن برروی شاخص‌های رنگ هانتر و تغییرات کلی رنگ در جدول ۲ آورده شده است. مقایسه نتایج شفافیت، نشان از عدم تغییر معنی‌دار شفافیت فیلم کیتوزان خالی در اثر اضافه کردن اسانس دارد($p<0/05$)، در حالی که افزودن اسانس به فیلم به طوری معنی‌داری باعث کاهش شاخص زردی فیلم‌های حاوی اسانس شد ($p<0/05$). هم‌چنین شاخص زردی با افزایش میزان غلظت اسانس نیز کاهش یافت.

1-Carvacrol
2-Trans-Caryophyllene

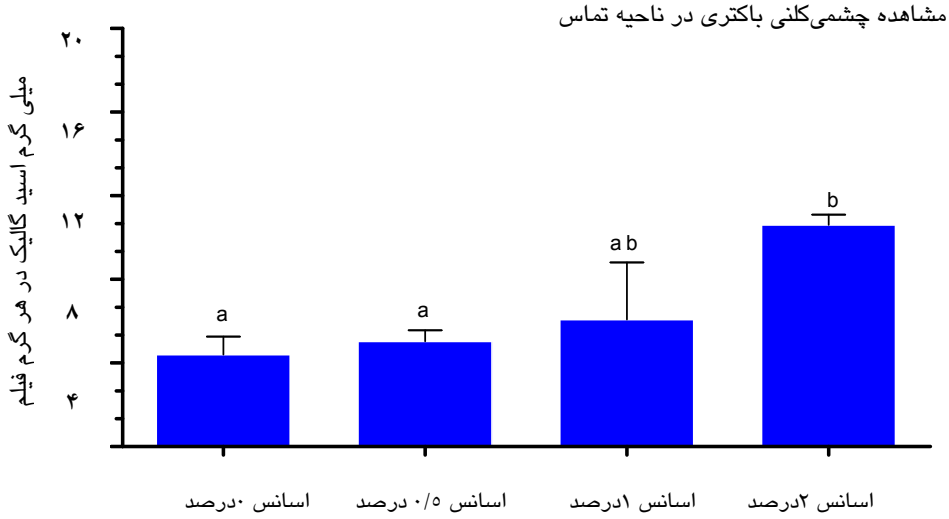
جدول۱ : خواص ضدمیکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی علیه لیستریا منوسیتوژنز در محیط کشت تریپتوز سوی آگار

میزان اسانس (درصد)	مساحت هاله بازدارندگی(میلی متر مربع)	ناحیه تماس*
۰	۲۳/۹٤±۱/۳^{a**}	–***
۰/۵	۹۱/۱۷±۳/۲^{b}	–
۱	۱۵۳/۸±۵/۹^{c}	–
۲	۲۷۱/۹±۷/۵^{d}	–

* سطحی از محیط آگار که در معرض فیلم قرار می‌گیرد.

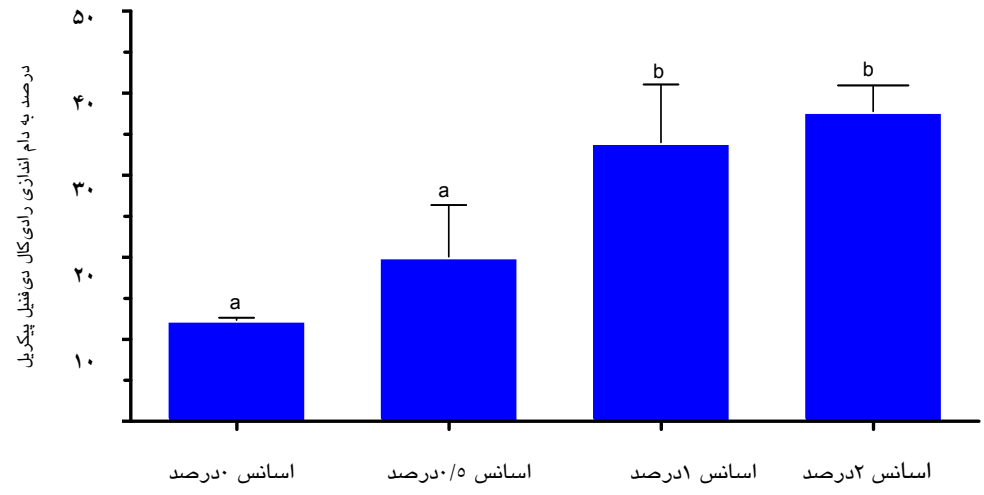
** حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است($p<۰/۰۵$).

*** عدم مشاهده چشمی‌کلنی باکتری در ناحیه تماس



نمودار۱ : میزان فنل کل فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی

(حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داراست($p<۰/۰۵$))



نمودار ۲ : میزان به دام اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی

(حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است($p<۰/۰۵$))

جدول۲ : پارامترهای مربوط به رنگ فیلم کیتوزان حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی

میزان اسانس(درصد)	شاخص شفاقیت	شاخص قرمزی	شاخص زردی	تغییرات کل رنگ
۰	۷۷/۰۸±۱/۳٤^{a*}	-۰/۷٤±۰/۹۷^{a}	۲۹/۳۹±۱/۹۹^{a}	٦۲/٤۱±۰/۱۳^{ab}
۰/۵	۷٤/۲۹±۰/۳۵^{a}	۰/۸±۰/۰۹^{a}	۲٦/۳۲±۰/٤۱^{ab}	۵۸/۱۳±۰/۳۵^{abc}
۱	۷۵/۵۲±۱/٦۱^{a}	۰/۱۹±۰/٦٦^{a}	۲۵/۰۲±۰/۸۱^{b}	۵۵/۸۷±۰/٤۳^{bc}
۲	۷٦/۹۷±۲/۰٦^{a}	-۰/۰۸±۰/۵۷^{a}	۲۰/۵٤±۱/۱٤^{c}	٤٤/۷۹±۰/٤۸^{c}

*حروف غیر مشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی داراست($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

مهم‌ترین هدف استفاده از اسانس‌های گیاهی در فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر، بهبود اثرات ضدمیکروبی ـ آنتی‌اکسیدان فیلم، بهبود خصوصیات نفوذپذیری فیلم‌های هیدروفیل و کاهش از دست رفتن ترکیبات فرار اسانس در طول زمان نگهداری است، لذا اسانس در یک غلظت بالا و برای مدت طولانی در سطح فرآورده باقی می‌ماند(۴). این مطالعه با هدف تولید فیلم کیتوزان با خصوصیت ضد میکروبی- آنتی‌اکسیدان و ارزیابی خصوصیات عملکردی آن انجام شد.

از میان ترکیبات شیمیایی شناسایی شده، بیشترین درصد ترکیب‌های مربوط به دسته مونوترپن‌های اکسیژنه و هیدروکربن‌های مونوترپنی بود و سایر ترکیب‌ها از لحاظ درصدی در مقادیر کمتری موجود بودند. نتایج مشابهی به وسیله شریف‌فر و همکاران(۲۰۰۷) گزارش گردید(۱۵)، ولی در مطالعه‌ای که به وسیله میثاقی و بستی (۲۰۰۷) بر روی ترکیبات شیمیای اسانس آویشن شیرازی انجام گرفت، نشان داده شد که در بین ۲۱ ترکیب شناسایی شده به جای تیمول، کارواکرول ترکیب اصلی اسانس است(۱۶).

زمانی که ترکیبات ضد میکروبی به فیلم‌های خوراکی اضافه می‌گردند، این ترکیبات در محیط کشت آگار منتشر گردیده و ایجاد هاله بازدارندگی مشخص در اطراف فیلم می‌کنند(۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که فیلم کیتوزان حاوی اسانس، اثرات مناسبی بر روی کاهش رشد باکتری لیستریا منوسیتوژنز دارد. لیستریا منوسیتوژنز مهم‌ترین باکتری با خاستگاه غذایی است که از نظر بهداشتی از اهمیت بسیار زیادی به خصوص در واحدهای تولید و بسته‌بندی مواد غذایی برخوردار می‌باشد. دل نوبیل و همکاران[1] (۲۰۰۸) در مطالعه مشابه، تأثیر فیلم ژئین حاوی تیمول (ماده موثره آویشن) بر روی باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و پسودوموناس‌ها به روش رسم منحنی رشد بقاء باکتری در محیط مایع را بررسی نموده و نشان دادند که اثرات ضد باکتریایی فیلم حاوی تیمول تابعی از زمان است و با افزایش زمان اثرات ضد باکتریایی نیز افزایش می‌یابد (۱۸). حسینی و همکاران(۲۰۰۹) نشان

1- Del Nobile et al

دادند که افزودن اسانس آویشن در کیتوزان نسبت به اسانس میخک و دارچین، اثرات ضدمیکروبی بیشتری را نشان می‌دهند. در مورد اسانس آویشن نیز، اثرات بستگی به میزان اسانس داشته و با افزایش میزان اسانس، هاله بازدارندگی نیز بزرگتر می‌گردد(۱۹). هم‌چنین این محققان نشان دادند که باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس) حساس‌تر از باکترهای گرم منفی (سالمونلا آنتریدیدیس و پسودوموناس آئروژینوزا) می‌باشند. از طرفی میزان حساسیت، تابعی از نوع و میزان اسانس است(۱۹). شیدم و ساریکوس[1] (۲۰۰۶) نشان دادند که فیلم آب پنیر ایزوله حاوی اسانس پونه کوهی (۲۰ گرم در لیتر) و اسانس سیر(۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر) دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجهی بر روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس و لیستریا منوسیتوژنز است(۲۰)، که با نتایج به دست آمده در این مطالعه، که نشان دهنده اثرات ضد میکروبی مناسب اسانس آویشن علیه باکتری‌های گرم مثبت است، مشابه است.

برای ارزیابی رشد باکتری در سطح تماس فیلم و آگار، فیلم مورد نظر را برداشته و رشد و عدم رشد کلنی باکتری به صورت چشمی بررسی گردید. عدم رشد کلنی در این ناحیه، احتمالاً به علت ایجاد پیوستگی بین سطح آگار تلقیح شده و فیلم و نیز خاصیت ضد میکروبی ذاتی کیتوزان در ناحیه تماس با باکتری است(۱۰)، اما نکته جالب توجه، وجود هاله بازدارندگی در فیلم کیتوزان خالی(۲۳/۹۴ میلی‌متر مربع) است. این یافته مغایر با نتایج مطالعه‌های قبلی است که نشان دادند کیتوزان قابلیت انتشار در محیط کشت آگار مجاور خود را ندارد. آنها نشان دادند، از آنجا که فیلم کیتوزان به صورت جامد می‌باشد، بنابراین فقط ارگانیسم‌هایی که تماس مستقیم با نواحی فعال کیتوزان داشته باشند مهار می‌شوند (۲۱و۱۹، ۱۷). این در حالی است که رهایش گلوکز آمین (واحد اصلی کیتوزان) در محیط‌های کشت میکروبی، در مطالعه‌های ضد میکروبی اثبات شده است(۲۲). مشاهده چنین اختلافاتی ممکن است تحت تأثیر یک سری عوامل مرتبط با کیتوزان و روش ارزیابی خصوصیات ضدمیکروبی باشد.

یافته جالب توجه که در این مطالعه مشاهده گردید، وجود مقدار کمی(۴/۴ میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم فیلم) فنل کل در فیلم کیتوزان فاقد اسانس است. این یافته شاید به دلیل تشکیل یک کمپلکس رنگی در اثر واکنش معرف فولین سیوکالتو با یک سری ترکیبات احیاء کننده غیر فنلی کیتوزان باشد. هم‌چنین با وجود این که، اسانس آویشن مورد استفاده در این مطالعه، حاوی مقدار زیادی ترکیبات فنلی به ویژه منوترپن‌های اکسیژنه است، ولی میزان فنل کل فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس ۰/۵ و ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد. این حالت ممکن است به دلیل خاصیت آب گریزی اسانس باشد که می‌تواند رهایش ترکیبات فنلی را تحت

1-Seydim & Sarikus

تأثیر قرار دهد.

فیلم کیتوزان همانند خود کیتوزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی نشان داد. در بین پلیمرهای زیستی مختلف، این خاصیت تا حدودی منحصر به کیتوزان و برخی از فیلم‌های پروتئینی می‌باشد (۲۴و۲۳). ترکیباتی همچون تیمول، کارواکرول، گاما ترپن، تیمول متیل اتر و کارواکرول متیل اتر، مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس آویشن شیرازی با خاصیت آنتی‌اکسیدان است(۹)، لذا بالا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدان فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن در این مطالعه به دلیل بالا بودن ترکیبات مذکور در اسانس مورد استفاده در این تحقیق است.

پارامترهای رنگی فیلم های مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی، به دلیل اثرات آنها در مقبولیت مصرف کننده ماده غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. میزان تغییرات کل رنگ در فیلم‌های حاوی اسانس، احتمالاً به دلیل عدم وجود تداخلات بین اسانس و کیتوزان، بسیار متفاوت است، به طوری که تنها فیلم حاوی ۲ درصد اسانس، تفاوت معنی‌داری با سایر فیلم‌ها نشان داد.

نتایج این مطالعه که در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفت، نشان داد که می‌توان بسته و فیلم فعال کیتوزان را با استفاده از اسانس آویشن شیرازی تهیه نمود. افزودن اسانس، موجب بهبود خصوصیات بیولوژیک همچون؛ ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان، فنل کل و خصوصیات ظاهری فیلم می‌گردد. برای استفاده از چنین فیلمی در مواد غذایی، در کنار بررسی جامع تر ویژگی‌های مذکور، نیاز به بررسی خصوصیات فیزیکی ــ مکانیکی، حرارتی، رئولوژیک و ریزبینی فیلم‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از حوزه تحصیلات تکمیلی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین هزینه اجرای این طرح، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. هم‌چنین از همکاری‌های هادی قاسم مهدی، شهین زمردی، لطفعلی ناصری و سید هادی طباطبایی قدردانی می‌گردد.

Antioxidant, Color and Antibacterial Properties of Edible Chitosan Film Incorporated with Zataria Multiflora Boiss Essential Oil against Listeria Monocytogenes

Moradi M[*], Tajik H[**], Razavi Rohani SM[***], Oromiehie A[****], Malekinejad H[*****], Saei-Dehkordi SS[******].

[*]Ph.D student majoring Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
[**]Associate Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
[***]Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
[****]Associate Professor of Polymer Chemistry, Department of Plastics, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran
[*****]Assistant Professor of Toxicology, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
[******]Assistant Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received:28/07/2010
Accepted:12/10/2010

Corresponding Author: Hossein Tajik
Email: h.tajik@urmia.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: The film containing antimicrobial agents are a type of active packaging which is mainly designed to control microbial and chemical spoilage of food. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial, antioxidant and color properties of chitosan film incorporated with essential oil of Zataria multiflora Boiss. (ZEO).

Materials & Methods: In this experimental study which was conducted at Urmia University of Medical Sciences between 2009-2010, the chemical composition of ZEO was analyzed using GC-MS. Chitosan films containing 0, 0.5, 1 and 2% ZEO, were obtained by casting method and subsequently, total phenol (TP), antioxidant, color (accordance with hunter system (L* (luminosity), * (redness), and b* (yellowness)) and antimicrobial characteristics of films on Listeria monocytogenes were studied. The collected data was analyzed by the SPSS software.

Results: The order of TP for all films in the experiment was 2% ZEO>1% ZEO> 0.5% ZEO> unsupplemented chitosan film, respectively. It was also concluded that the antioxidant activity of chitosan films was increased by adding various concentrations of ZEO. These increases were significant for film containing 1% (33.98%) and 2% (37.77%) ZEO ($p<0.05$). Regarding the color luminosity (L*) of the chitosan film, results indicated no significant changes by incorporating ZEO, whereas the incorporation of ZEO into films had a significant effect on film yellowness, evidenced by lower b* values. Finally, it was shown that the presence of ZEO in chitosan films significantly modified the anti- listerial activity of chitosan, ($p<0.05$).

Conclusion: The results indicated that an active film from chitosan could be achieved by incorporating ZEO. Addition of ZEO improves functional and antibacterial characteristics of chitosan film.

Key words: Chitosan Film, Multiflora Boiss, Essential Oil, Antioxidant.

REFERENCES:

1.Dainelli D, Gontard N, Spyropoulos D, Zondervan-van den Beuken E, Tobback P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. Trends in Food Science & Technology 2008; 19: S99-S108.

2.Rooney ML. Introduction to active food packaging technologies. In: Han J (editor). Innovations in food packaging. 1st ed. Elsevier Ltd; 2005; 63-79.

3.Quintero-Salazar B, Ponce-Alquicira E. Edible Packaging for Poultry and Poultry Products. In: Handbook of Food Products Manufacturing. 1st ed. John Wiley & Sons: Inc; 2007; 797-815.

4.Moradi M, Tajik H, No HK, Razavi Rohani SM, Oromiehie A, Ghasemi S. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. Journal of Chitin and Chitosan 2010; 15: 35-45.

5.Bégin A. Calsteren MRV. Antimicrobial films produced from chitosan. International Journal of Biological Macromolecule 1999; 26: 63-7.

6.Suyatma NE, Copinet A, Tighzert L, Coma V. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. Journal of Polymers and Environment 2004; 12: 1–6.

7.Davidson PM, Zivanovic S. The use of natural antimicrobials. In: Food preservation techniques. Woodhead Publishing Limited and CRC Press. 1st ed. CRC press: Washington; 2003; 5-8.

8.Tiwari BK, Valdramidis VP, Donnell CPO, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. Application of natural antimicrobial for food preservation. Journal of Agricultural Food Chemistry 2009; 57: 5987-6000.

9.Saei-Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Khalighi-Sigaroodi F. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss from different parts of Iran and their antioxidant and antimicrobial efficacy. Food and Chemical Toxicology 2010; 48: 1562-7.

10.Royo M, Fernández-Pan I, Maté J. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. Journal of the Science of Food and Agriculture 2010; 90:1513–9.

11.Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. Meat Science 2008; 78: 90–103.

12.Franssen LR, Krochta JM. Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. In: Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. 1st ed. CRC Cambridge: Boca Raton FL; 2003; 250 – 62.

13.Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 1st ed. Allured: Carol Stream; 1989; 469.

14.Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. Food Hydrocolloids 2010; 24: 770-5.

15.Sharififar F, Mosha MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control 2007; 18: 800–5.

16.Misaghi A, Basti AA. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food Control 2007; 18: 1043–9.

17.Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. Food Chemistry 2010; 122: 161–6.

18.Del Nobile MA, Conte A, Incoronato AL, Panza O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. Journal of Food Engineering 2008; 89: 57–63.
19.Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan- based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. Journal of Food Processing and Preservation 2009; 33: 227-43
20.Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International 2006; 39: 639–644.
21.Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Deschamps A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of Food Science 2002; 67: 1162–9.
22.Fernandez-Saiz P, Lagaron JM, Hernandez-Muñoz P, Ocio MJ. Characterization of the antimicrobial properties against *S. aureus* of novel renewable blends chitosan and gliadins of interest in active food packaging and coating applications. International Journal of Food Microbiology 2008; 23: 913–21.
23.Gomez-Estaca J, Gimnez B, Montero P, Gomez-Guillén MC. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. Journal of Food Engineering 2009; 92: 78-85.