

اثر ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن علیه *Escherichia coli* و

listeria innocua طی نگهداری سالاد الویه

محبوبه کشیری*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۴

چکیده

بسته بندی ضد میکروبی یک فناوری نوین نگهداری است که بر اساس رهائش عوامل فعال ترکیب شده با پلی مر بسته بندی، به درون محصول غذایی یا محیط اطراف بسته بندی برای افزایش کیفیت و امنیت غذایی طراحی شده است. با هدف استفاده از اسانس گیاهان بعنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، فعالیت ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora Boiss.*) در محیط مایع (تماس مستقیم) و جامد (فاز بخار) علیه *Escherichia coli* و *listeria innocua* مورد مطالعه قرار گرفت. فیلم های زیست فعال زئین حاوی ۵ و ۱۰٪ وزنی اسانس آویشن شیرازی تولید و فعالیت ضد باکتریایی فیلم ها در محیط مایع و جامد آزمایشگاهی ارزیابی شدند. فعالیت ضد باکتریایی فیلم های زئین دارای ۱۰٪ اسانس آویشن شیرازی برای بسته بندی سالاد الویه بعنوان یک مدل غذایی طی مدت ۶ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که خواص ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در تماس مستقیم در مقایسه با فاز بخار از کارایی بهتری برخوردار بود. از لحاظ آماری اختلاف معنی داری در سطح آماری ۵ درصد بین اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست فعال زئین حاوی ۵٪ اسانس آویشن در تماس مستقیم علیه *Escherichia coli* و *listeria innocua* وجود نداشت. همچنین با افزایش غلظت اسانس در فیلم زیست فعال زئین اندیس کاهش لگاریتمی باکتریایی در محیط مایع افزایش یافت. علی رغم نتایج مطلوب ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی در فیلم های زئین در تماس مستقیم، فیلم های زیست فعال زئین جهت کاهش آلودگی سالاد الویه بسته بندی شده از کارایی لازم برخوردار نبودند.

واژه های کلیدی: سفتی بسته بندی ضد میکروبی، زئین، اسانس آویشن شیرازی، سالاد الویه

مقدمه

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی یکی از قدیمی ترین روش های نگهداری مواد غذایی محسوب می گردد. ترکیبات ضد میکروبی در تماس مستقیم ماده غذایی و یا بطور غیرمستقیم با قرار دادن در بسترهای پلی مری قادر به کاهش یا به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم ها می باشند (Guarda et al., 2011). بسته بندی ضد میکروبی نوعی بسته بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می سازد، بطوری که تداوم رهائش ترکیبات ضد میکروبی، اجازه رشد به سلول های ترمیم یافته میکروبی را نخواهد داد. بنابراین از بسته بندی ضد میکروبی به عنوان تکنولوژی هردل جهت افزایش امنیت و بهبود کیفیت مواد غذایی یاد می شود (Muriel- Galet et al., 2012).

اسانس های روغنی از متداول ترین ترکیبات قابل استخراج از

برگ، ساقه، غده و گل گیاهان هستند (Tajkarimi et al., 2010). آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora Boiss.* گیاهی معطر از تیره نعنائیان و بومی مناطق گرم ایران، پاکستان و افغانستان می باشد (Moradi et al., 2012). مهم ترین ترکیبات اسانس آویشن کارواکرول و تیمول می باشند (Shojaee-Aliabadi et al., 2014). این ترکیبات به عنوان ترکیبی ایمن و سالم مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا قرار گرفته است (Guarda et al., 2011). اثر ضد میکروبی این اسانس بر *Escherichia coli* و *listeria salmonella typhimurium* (Salarbashi et al., 2014) و *shigella* (Razavilar et al., 2006) و *listeria monocytogenes* (Abdollahi et al., 2004) کپک و مخمر (Suhr et al., 2003) مورد بررسی قرار گرفته است. از یافته های علمی در حوزه کاربرد اسانس در تولید فیلم های ضد میکروبی نیز می توان به تأثیر اسانس آویشن شیرازی در کیتوزان (Moradi et al., 2012)، پلی ساکارید محلول سویا (Salarbashi et al., 2014) و کاپا کاراگینان (Shojaee-Aliabadi et al., 2014)

۱- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* نویسنده مسئول: Email: kashiri.m@gmail.com)

غذایی (سالاد الویه) در مواجهه با باکتری‌های تهدید کننده سلامت مصرف کنندگان بود.

مواد و روش

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش آزمایشگاهی شامل زئین شرکت تولیدی مواد شیمیایی نیپون (اوساکا، ژاپن)، گلیسرول (اسکارلب، اسپانیا)، گیاه آویشن شیرازی (مزارع استان فارس)، اتانول (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی برات (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی آگار^۱ (اسکارلب، اسپانیا)، ویولت رد بایل آگار^۲ (اسکارلب، اسپانیا)، لیستریا پالکام آگار^۳ (مرک، آلمان) بودند. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل *listeria innocua* CECT (ATCC 19114) 934 از دسته باکتری‌های گرم مثبت و *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) از دسته باکتری‌های گرم منفی که از مرکز کلکسیون میکروبی اسپانیا تهیه شد.

استخراج اسانس

سرشاخه‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی استان فارس قبل از گل‌دهی برداشت و پس از تأیید گروه گیاه‌شناسی پژوهشگاه گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با نام علمی آن *Zataria multiflora* Boiss خشک گردید و به روش تقطیر با بخار آب در مدت ۳ ساعت با استفاده از سیستم کلونجر اسانس‌گیری شد. آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها توسط دستگاه طیف سنج جرمی با ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، دمای اتافک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (*et al.*, 2013 Elizaquíel).

(*et al.*, 2014) و نیز کاربرد کارواکرول در بستر کیتوزان (Rubilar *et al.*, 2013)، تیمول و کارواکرولدر بستر پلی‌پروپیلن (Guard *et al.*, 2011) اشاره کرد. هم‌چنین اثر افزودن اسانس پونه کوهی در بسترهای پلی‌مری نظیر اتیلن وینیل الکل (Muriel- Galet *et al.*, 2012)، ایزوله سویا (Zinoviadou *et al.*, 2009)، ژلاتین (Hosseini *et al.*, 2013)، تریتیکاله (Aguirrea *et al.*, 2013) گزارش شده است.

در جوامع امروزی با تغییر روش زندگی، فرهنگ استفاده از غذاهای آماده به مصرف نیز رواج فراوانی یافته است. سالاد الویه نوعی غذای سرد شامل گوشت مرغ و سیب‌زمینی و تخم مرغ آب‌پز به همراه سس مایونز، خیارشور و دیگر سبزیجات است که بدون اعمال فرایند حرارتی بسته‌بندی عرضه و در دمای یخچال نگهداری می‌شود. اختلاف درجه حرارت سطح و درون گوشت مرغ طی فرایند پخت گوشت مرغ منجر به حذف بار میکروبی سطحی و زنده ماندن برخی از پاتوژن‌های درونی می‌گردد. هم‌چنین نقص در فرایند حرارتی در آماده‌سازی گوشت مرغ و تخم‌مرغ خطرات ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی واقع در تخم مرغ و درون گوشت مرغ را فراهم می‌کند (Luber, 2009). *Escherichia coli* و *Listeria* از جمله باکتری‌های تهدید کننده سلامت مصرف کنندگان می‌باشند.

Listeria در طیف وسیعی از محصولات غذایی آماده به مصرف بسته‌بندی نگهداری شده در شرایط سرد گزارش شده است (Beaufort, 2011 و Newel *et al.*, 2010). با توجه به تنوع ترکیبات در فرمولاسیون محصولات آماده به مصرف، تعیین شرایط مناسب برای رشد هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با چالشی همراه است. بدین مفهوم که در فرمولاسیون هر یک از این محصولات افزایش یا کاهش یک ماده می‌تواند تشدید یا محدودیت رشد میکروارگانیسم‌های شاخص راسبب گردد. لذا در این خصوص یکی از راه‌های ارزیابی پتانسیل رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات فرموله شده، تلقیح تعداد مشخصی از آن‌ها و ارزیابی توانایی رشد در محصول است (Beaufort, 2011). روش‌های مختلفی جهت به حداقل رساندن مصرف مواد افزودنی شیمیایی برای مهار رشد میکروبی در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفته است که در این بین استفاده از فیلم‌های ضد میکروبی همراه با سایر هردل‌ها ضمن حفظ کیفیت و طراوت محصول بعنوان یک مهار کننده نهایی رشد میکروارگانیسم‌ها معرفی شده است (Muriel- Galet *et al.*, 2012).

فیلم‌های ضد میکروبی علاوه بر نوآوری در بخش علمی، در مقیاس صنعتی مورد استقبال مصرف کنندگان و تولید کنندگان جهت به تضمین سلامت مصرف کنندگان قرار گرفته است. لذا هدف از این پژوهش تولید فیلم زیست‌فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی و ارزیابی اثر عملکرد فیلم تولیدی در محیط آزمایشگاهی و یک مدل

1 Tryptone Soy Agar (TSA)

2 Violet Red Bile Agar

3 Listeria Palcam Agar

آماده‌سازی فیلم

بر اساس آزمایشات اولیه محلول ۱۶ درصد وزنی- وزنی زئین در اتانول ۸۰ درصد تهیه و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه حرارت داده شد. در ادامه گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده (۱۵/۰ درصد وزن زئین) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاملاً همگن شد. محلول حاصل روی صفحه شیشه‌ای پوشیده از ورقه نازک پلی‌پروپیلن پخش و در تونل مجهز به منبع حرارتی به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد. فیلم زئین فعال نیز مطابق روش فوق آماده شد، با این تفاوت که پس از افزودن گلیسرول به مدت ۸ دقیقه عمل هم زدن صورت گرفت و در ادامه اسانس آویشن در سطح ۵ و ۱۰ درصد نسبت به وزن زئین اضافه و به مدت ۷ دقیقه هم زدن انجام شد.

ارزیابی خواص ضد باکتریایی اسانس به‌روش میکرو پلیت

به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس آویشن از روش رقیق‌سازی در چاهک‌های در میکرو پلیت استفاده شد (NCCLS, 2000).

ارزیابی خواص ضد باکتریایی بخار اسانس آویشن شیرازی و

فیلم زیست فعال زئین

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی *Escherichia coli* و *listeria innocua* با استفاده از سوآپ استریل، روی محیط کشت تریپتون سوی آگار پخش گردید. دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۴ سانتی‌متر در سطح فوقانی پلیت‌ها چسبانده و اسانس آویشن در مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. در ادامه جهت کاهش خروج ترکیبات فرار موجود در اسانس، هر یک از پلیت‌ها با پارافیلیم محصور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند (Muriel- Galet et al., 2012).

فیلم‌های زیست فعال بر پایه زئین به قطر ۴ و ۸ سانتی‌متر مشابه روش اشاره شده در فوق آماده و به درب پلیت‌ها برای ارزیابی خاصیت بازدارندگی بخار اسانس آویشن، بدون تماس مستقیم با میکروارگانیسم، چسبانده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. نتایج فعالیت ضد میکروبی در فاز بخار نیز بر اساس شدت تأثیرگذاری ترکیب ضد میکروبی با اصطلاحاتی نظیر بازدارندگی کامل (+++) در شرایطی که رشد باکتری‌ها بطور کامل متوقف گردد، بازدارندگی نسبی (++) در مواردی که اندکی رشد میکروبی مشاهده گردد، کاهش قابل مشاهده در دانسیته میکروبی (+) زمانی که در مقایسه با نمونه شاهد رشد باکتری‌های اندکی تقلیل یابد و در نهایت فاقد بازدارندگی (-) بدین مفهوم که باکتری‌ها بطور کامل رشد نمایند (Gomez- Esteca et al., 2010).

ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین در محیط

مایع آزمایشگاهی

۰/۲۵ گرم از فیلم زیست‌فعال زئین حاوی اسانس آویشن در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تریپتون سوی برات قرار داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی (جمعیت میکروبی تقریبی ۱۰^۸ CFU/ml) اضافه و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد میکروب‌ها شمارش شدند (Muriel- Galet et al., 2012).

ارزیابی خواص ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین در مدل غذایی

به‌منظور ارزیابی کارایی فیلم زیست فعال زئین حاوی ۱۰ درصد اسانس در مدل غذایی (سالاد الویه) نمونه‌های به شرح زیر آماده شدند.

سالاد الویه بسته‌بندی شده در فیلم زئین فاقد اسانس (نمونه شاهد)

سالاد الویه بسته‌بندی شده فیلم زئین حاوی اسانس آویشن (نمونه فاقد تلقیح باکتریایی)

سالاد الویه بسته‌بندی شده در فیلم زئین حاوی اسانس آویشن (نمونه حاوی تلقیح باکتریایی)

پس از آماده‌سازی بسته‌ها در دمایی خچال به مدت ۶ روز نگهداری و آزمون‌های میکروبی مطابق روش Muriel Galat و همکاران (۲۰۱۲) در روز اول، سوم و ششم انجام شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد و تجزیه و تحلیل نتایج آن با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح آماری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

بر اساس طیف‌سنجی جرمی انجام شده ۱۴ ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی از شناسایی و در جدول ۱ خلاصه شد. کارواکرول (۳۷/۲۲ درصد) بیش‌ترین ترکیبات اصلی شناسایی شده اسانس بود. پس از آنتیمول (۲۸/۴۱ درصد)، گاماترپین (۷/۱۴ درصد) و آلفاپینن (۴/۲۶ درصد) بودند. مشتقات فنیل پروپانویدها بیش‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. خواص ضد میکروبی آویشن و پونه‌کوهی به‌حضور ترکیبات فنولی به‌ویژه تیمول و کارواکرول بستگی دارد.

می شود که در نهایت منجر به بی ثباتی غشاء سلولی باکتری می گردد (Elizaquível et al., 2013).

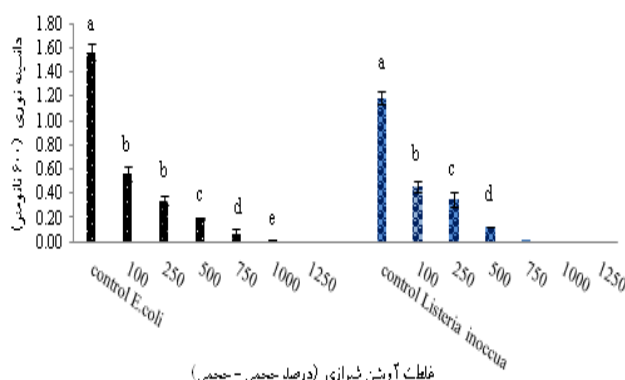
خواص ضد باکتریایی بخار اسانس آویشن در محیط آزمایشگاهی

تبخیر ترکیبات ضد میکروبی و مهاجرت آن به فضای خالی بسته بندی یک مزیت ویژه برای کاهش بار میکروبی مواد غذایی در مقایسه با ترکیبات ضد میکروبی غیر فرار محسوب می گردد (Han., 2000). نتایج حاصل از تأثیر بخار اسانس آویشن شیرازی در محیط جامد در جدول ۲ نشان داده شده است. همان طوری که جدول ۱ مشاهده می شود، بازدارندگی ناشی از تبخیر اسانس آویشن شیرازی بر *listeria innocua* در غلظت ۵۰ و ۷۵ میکرولیتر بیش از *Escherichia coli* بود. در تفسیر علت این پدیده می توان بوجه دیواره لیپوپلی ساکارید در باکتری های گرم منفی اشاره کرد که از ورود ترکیبات فعال به غشاء سیتوپلاسمی ممانعت به عمل می آورد (Bozin et al., 2007). همچنین وجود آنزیم ها در فضای پری پلاسمیک باکتری های گرم منفی سبب شکستن ترکیبات ضد میکروبی و جلوگیری از ورود آن به درون سلول می گردد. این در حالی است که باکتری های گرم مثبت فاقد فضای پری پلاسمیک هستند و ترکیبات ضد میکروبی به آسانی دیواره سلول و غشاء سیتوپلاسمی را تخریب و منجر به خروج سیتوپلاسم از سلول می گردد. ترکیبات ضد میکروبی بسته به ماهیت آن ها، مکان هایی خاصی از میکروارگانیسم را مورد هدف قرار می دهند (Burt., 2004). اسانس ها با اتصال به بخش های لیپیدی باکتری ها، نفوذ پذیری غشاء سیتوپلاسمی را افزایش می دهند که این پدیده منجر به خروج یون ها و اجزاء سلولی می گردد (Estaca et al., 2010). نتایج پژوهش حاضر حاکی از کاهش قابل مشاهده در دانسیته (+) دو باکتری فوق با استفاده از ۲۵ میکرولیتر اسانس آویشن شیرازی بود. محدوده بازدارندگی در برابر باکتری *listeria innocua* با افزایش مقدار اسانس مصرفی به ۵۰ میکرولیتر افزایش (++) یافت. در حالی که در باکتری *Escherichia coli* تنها کاهش دانسیته میکروبی (+) مشاهده گردید. حداقل غلظت لازم اسانس برای بروز اثرات ضد میکروبی مطلوب در برابر *Escherichia coli* بیش از ۵۰ میکرولیتر بود. محدوده بازدارندگی بخار حاصل از ۷۵ میکرولیتر اسانس در برابر *listeria innocua* (+++) بیش از *Escherichia coli* بود. بیشترین محدوده بازدارندگی باکتریایی ناشی از بخار اسانس، بازدارندگی کامل (+++)، در غلظت ۱۰۰ میکرولیتر مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بازدارندگی بخار اسانس علیه *Escherichia coli* در محیط جامد با افزایش غلظت اسانس از ۵۰ به ۱۰۰ میکرولیتر افزایش یافت که از این حیث با گزارش Tajkarimi و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت.

جدول ۱- ترکیبات قابل شناسایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از طیف سنج جرمی

ترکیب	مقدار (%)	شاخص بازداری
توژن	۰/۲۹	۹۳۰
آلفا پینن	۴/۲۶	۹۳۷
بتا پینن	۰/۱۶	۹۷۶
بتا میرسین	۰/۸۵	۹۸۵
پی سیمن	۳/۲۷	۱۰۲۴
گاما ترپینن	۷/۱۴	۱۰۵۵
آلفا ترپینن	۲/۲۳	۱۰۶۱
لینالول	۱/۶۳	۱۰۹۰
آلفا ترپینول	۰/۷۷	۱۲۰۹
تیمول متیل استر	۱/۴۷	۱۲۳۶
کارواکرول متیل استر	۳/۴۹	۱۲۴۳
کارواکرول	۳۷/۲۲	۱۳۱۴
تیمول	۲۸/۴۱	۱۴۱۸
گلوبوبول	۲/۳۲	۱۵۸۲
مجموع	۹۳/۹۵	-

بر اساس داده های دانسیته نوری، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در برابر *Escherichia coli* و *listeria innocua* به ترتیب ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین گردید (شکل ۱).



شکل ۱- متوسط جذب نور ناشی از *Escherichia coli* و *listeria innocua* در غلظت های مختلف اسانس آویشن

با مقایسه نتایج حاصل با گزارش Elizaquível و همکاران (۲۰۱۳) می توان بیان داشت که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در مقایسه دارچین، میخک و پونه کوهی علیه *monocytogenes listeria* و *Escherichia coli* پایین تر بود. اثر ضد میکروبی اسانس آویشن به ساختار کارواکرول و تیمول، توانمندی این ترکیبات در برقراری پیوندهای هیدروژنی، ترکیب آن ها با سایر مونوترپن ها نظیر گاماترپینن ها و بروز اثرات سینرژیستی نسبت داده

جدول ۲- تأثیر مقدار اسانس آویشن بر مهار رشد باکتریایی در فاز بخار

مقدار اسانس آویشن (میکرولیتر)	<i>Escherichia coli</i>	<i>listeria innocua</i>
۲۵	+	+
۵۰	+	++
۷۵	++	+++
۱۰۰	+++	+++

در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها در تماس مستقیم با محیط جامد، ضریب نفوذپذیری و قدرت انحلال آن‌ها تعیین کننده شدت اثر می‌باشد، درحالی‌که در تماس غیرمستقیم اسانس با محیط جامد، میزان فراریت ترکیبات اسانس نقش مهم ایفا می‌کنند. اثرات ضد باکتریایی فاز بخارهای اسانس مرکبات در محیط جامد، *et al.*, (Tyagi (2010)، پونه کوهی (Muriel- Galet *et al.*, 2012)، آویشن و مرزنجوش (Lopez *et al.*, 2007) و (Suher *et al.*, 2003) مورد ارزیابی قرار گرفته است. حداقل غلظت بخارات اسانس پونه کوهی (۵۰ میلی گرم) برای بروز بازدارندگی کامل باکتریایی (+++) در مقایسه با اسانس مرکبات (۷ میلی گرم) بیش تر گزارش شده است (Muriel- Galet *et al.*, 2012). لذا بر این اساس می‌توان بیان داشت که حداقل غلظت مورد نیاز اسانس آویشن شیرازی برای بروز اثرات بازدارندگی در تماس غیرمستقیم (فاز بخار) نسبت به اسانس مرکبات و پونه کوهی بالاتر بود.

خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین

خواص ضدباکتریایی بخار اسانس فیلم زیست فعال زئین

نتایج تأثیر غلظت ۵ و ۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی در فاز بخار در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طوری که مشاهده می‌شود، فاز بخار اسانس فیلم زیست فعال زئین حاوی ۵ درصد اسانس آویشن شیرازی در قطر ۴ سانتی متری، فاقد اثرات بازدارندگی در مقابل *Escherichia coli* و *listeria innocua* بود. با افزایش غلظت اسانس (۱۰ درصد) و سطح مقطع (۸ سانتی متر) فیلم زیست فعال زئین، در مقایسه با نمونه شاهد کاهش دانسیته میکروبی در برابر *Escherichia coli* و *listeria innocua* مشاهده شد. لازم به ذکر است که فیلم زئین بدون اسانس، فاقد هرگونه فعالیت ضد باکتریایی بود.

یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج Muriel-Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش شدت ضد میکروبی فاز بخار اسانس پونه کوهی در بستر اتیلن وینیل الکل در مقایسه با دیسک‌های کاغذی حاوی اسانس مطابقت نداشت. در خصوص تفسیر نتایج فوق، ضمن

در نظر گرفتن شدت فراریت ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آویشن و با استناد به استدلال‌های Murirel- Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبتنی بر تأثیر بستر الحاق اسانس در قدرت فراریت و انتشار می‌توان بیان داشت که به سبب ماهیت آب‌گریزی پلی‌مر زئین، ترکیبات مؤثر اسانس آویشن در ساختار فیلم محبوس و قدرت رهایش در محیط اطراف کاهش و در نتیجه اثرات ضد میکروبی در فاز تبخیر نیز کاهش یافت. علی‌رغم عدم مطابقت نتایج این تحقیق با Murirel- Galet و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر افزایش اثرات ضد میکروبی فاز بخار اسانس در ترکیب با فیلم زیست فعال، اما در اصل مبحث که همانا نقش بستر در بروز عوامل ضد میکروبی اتفاق نظر وجود داشت. بدین مفهوم که محققان فوق اختلاف ماهیت دیسک‌های کاغذی و اتیلن وینیل الکل بر مهار نسبی تبخیر اسانس اثرگذار معرفی کردند. در حالی‌که در تحقیق حاضر احتمالاً آب‌گریزی بیش‌تر زئین در مقایسه با دیسک‌های کاغذی (سلولزی)، سبب مهار تأثیر ضد میکروبی در فاز بخار اسانس گردیده است.

جدول ۳- تأثیر غلظت اسانس در ترکیب فیلم زئین بر مهار رشد

باکتریایی در فاز بخار

قطر فیلم	نوع باکتری	محدوده بازدارندگی
۴ سانتی متر	<i>listeria innocua</i>	فیلم فاقد اسانس
	<i>Escherichia coli</i>	فیلم حاوی ۱۰٪ اسانس
۸ سانتی متر	<i>listeria innocua</i>	فیلم فاقد اسانس
	<i>Escherichia coli</i>	فیلم حاوی ۵٪ اسانس

(-) فاقد اثر بازدارندگی، (+) کاهش قابل مشاهده در دانسیته میکروبی.

خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین در محیط مایع

اثر ضد باکتریایی فیلم‌های زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی در محیط تلقیح شده *listeria innocua* و *Escherichia coli* پس از ۶ روز نگهداری در محیط مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن بود که تعداد کلنی‌های قابل شمارش *listeria innocua* و *coli* در محیط مایع حاوی فیلم زیست فعال زئین با ۵ درصد اسانس آویشن شیرازی به ترتیب دارای $7/06 \text{ Log CFU/ml}$ و $7/73$ بود که با شمارش تعداد باکتری‌های تلقیح شده در نمونه شاهد، اندیس کاهش لگاریتمی *Escherichia coli* و *listeria innocua* به ترتیب $1/14$ و $1/39$ محاسبه گردید. با افزایش غلظت اسانس در فیلم زئین فعال، اندیس کاهش لگاریتمی در برابر *listeria innocua* و *Escherichia coli* به ترتیب به $2/75$ و $3/07$ افزایش یافت. همان طوری که در جدول ۴ مشاهده می‌شود از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین

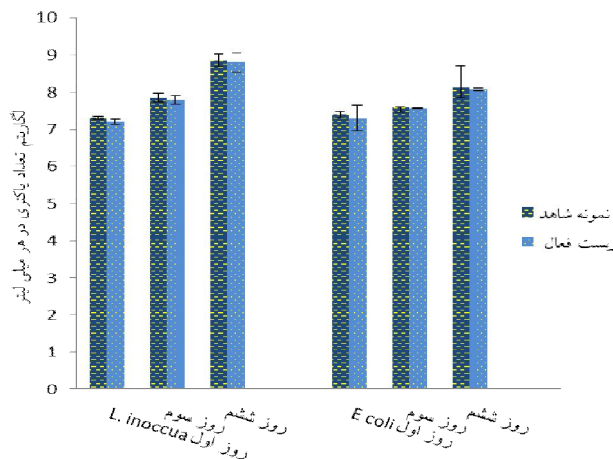
اندیس کاهش *Escherichia coli* و *listeria innocua* در سطح احتمال ۵ درصد وجود نداشت. جدول ۴- اثر ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین در برابر *listeria innocua* و *Escherichia coli* در محیط مایع

<i>Escherichia coli</i>		<i>listeria innocua</i>		
LRV	Log CFU/ml	LRV	Log CFU/ml	
	۷/۷۳±۰/۳۶		۷/۰۶±۰/۲۴	شاهد میکروبی* (A)
۱/۳۹ ^a	۶/۳۴±۰/۱۲	۱/۴ ^{a***}	۵/۹۲±۰/۲۱	۵٪ اسانس آویشن
	۶/۲۰±۰/۷۷		۷/۳۵±۰/۱۵	شاهد میکروبی* (B)
۳/۰۷ ^b	۳/۱۲±۰/۴۹	۲/۷۵ ^b	۴/۶۰±۰/۳۲	۱۰٪ اسانس آویشن

**حروف غیرمشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است (P<۰/۰۵)

*شاهد میکروبی A و B به ترتیب نمونه شاهد بار میکروبی فیلم حاوی ۵ و ۱۰ درصد فیلم حاوی اسانس

الویه حاوی پروتئین (سیب زمینی و گوشت مرغ) و چربی (سس مایونز) می باشد، ترکیبات فعال اسانس می توانند به سبب برهم کنش هایی با مواد تشکیل دهنده سالاد الویه خنثی گردند. از طرفی دیگر کاهش مقدار آب در مدل غذایی در مقایسه با محیط کشت مایع آزمایشگاهی می تواند دسترسی ترکیب ضد میکروبی را به باکتری کاهش دهد (Smith-Palme et al., 2001). همچنین حضور منبع غنی و قابل دسترس ترکیبات مغذی در مدل غذایی می تواند در ترمیم سلول های آسیب دیده باکتری کمک نماید (Gill et al., 2002). ضمن آن که بر اساس گزارش Marcos و همکاران (۲۰۱۳) نوع فیلم بسته بندی، ماهیت غذا، نوع و غلظت ترکیب ضد میکروبی در کارایی بسته بندی فعال نیز مؤثر می باشد. همچنین کاهش خواص ضد میکروبی فیلم زئین فعال به عنوان یک پلی مر پروتئینی آب گریز را می توان به محبوس شدن احتمالی ترکیبات فعال اسانس در بستر پلی مری و کاهش رهایش آن ها نیز نسبت داد.



شکل ۲- ارزیابی خواص ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین (۱۰٪ اسانس آویشن) در مدل غذایی (سالاد الویه)

خواص ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین در مدل غذایی

در راستای ارزیابی اثر بخشی فیلم زئین فعال در بسته بندی سالاد الویه، در گام نخست آزمون های میکروبی عدم حضور *Escherichia coli* و *listeria innocua* در محصول اولیه تایید شد. همان طوری که در شکل ۲ مشاهده می شود، تعداد *listeria innocua* قابل شمارش نمونه شاهد آلوده در روز نخست پس از تلقیح برابر $7/33 \pm 0/2$ CFU/ml بود. مقایسه اندیس لگاریتم کاهش فیلم زیست فعال حاوی ۱۰ درصد اسانس آویشن ($0/8$ CFU/ml) با نمونه شاهد حاکی از عدم کاهش معنی دار بود. نتایج بررسی سالاد الویه تلقیح شده به *listeria innocua* و بسته بندی شده با فیلم فعال زئین در روز سوم حاکی از افزایش $0/56$ لگاریتمی جمعیت میکروبی ($7/79 \pm 0/11$ CFU/ml) نسبت به روز اول بود. مقایسه اندیس کاهش لگاریتمی با نمونه شاهد ($7/86 \pm 0/10$ CFU/ml) نشان داد که جمعیت میکروبی $0/06$ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. جمعیت و *listeria innocua* در روز ششم نگهداری سالاد الویه بسته بندی شده در فیلم فعال زئین و فیلم شاهد به ترتیب $8/240 \pm 0/17$ و $8/81 \pm 0/24$ CFU/ml و شمارش شد. همان طوری که در شکل ۲ نشان داده شده است جمعیت *Escherichia coli* در طی شرایط نگهداری کاهش معنی دار در سطح آماری ۵ درصد مشاهده نشد. بنابراین بر اساس نتایج تحقیق حاضر می توان اظهار داشت که فیلم فعال زئین علی رغم اثر بخشی در محیط آزمایشگاهی از کارایی لازم به منظور کنترل جمعیت باکتریایی در مدل واقعی غذایی برخوردار نبود. در تفسیر علت کاهش کارایی خواص ضد میکروبی در یک سیستم واقعی غذایی می توان بیان داشت که عوامل متعددی علاوه بر نوع میکروارگانیسم هدف در بروز این پدیده دخالت دارند که در این میان ویژگی های محصول غذایی نظیر pH، فعالیت آبی، مقدار چربی و پروتئین، آنتی اکسیدان، نمک و همچنین عوامل خارجی (دمای نگهداری و ترکیبات اتمسفر) نقش به سزایی دارند (Burt., 2004) و (Quintavalla et al., 2002). با توجه به این که سالاد

نتیجه‌گیری

نقش ماهیت پلی‌مر در بروز فعالیت ضد باکتریایی از طریق بخارات اسانس آویشن شیرازی مورد تایید قرار گرفت. فعالیت ضدباکتریایی بخارات اسانس آویشن در ترکیب با زیست پلی‌مر زئین کاهش یافت. علی‌رغم نتایج ضدمیکروبی ضعیف فاز بخار فیلم فعال در محیط جامد، این ترکیب به‌عنوان یک افزودنی طبیعی در ترکیب با پلی‌مر زئین در تماس مستقیم در محیط مایع از کفایت لازم برخوردار بود. نظر به اهمیت کنترل جمعیت میکروبی و تضمین امنیت مواد غذایی با تکیه بر رهائش ترکیبات فعال در مدل‌های واقعی غذایی می‌توان اظهار کرد که فیلم زئین حاوی اسانس به‌عنوان تکنولوژی هردل در کنترل رشد لگاریتمی *Escherichia coli* و *listeria innocua* تلقیح شده در سالاد الویه مثبت ارزیابی نگردید و نقش نوع

منابع

- Abdollahi, M., Rezaei, M & Farzi, G., 2012, A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 343-350.
- Aguirrea, A., Borneoa, R. B & Leon, A. E., 2013, Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2-9.
- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H & Abdollahi, M., 2014, Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogen. *Food Control*, 36, 1-7.
- 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 *Shigella flexner*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42.
- Beaufort, A., 2011, The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22(9), 1498-1502.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I & Jovin, E., 2007, Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Elizaquível, P., Azizkhani, M., Sánchez, G & Aznar, R., 2013, Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. *Food Control*, 34(2), 770-776.
- Gill, A., Delaquis, P., Russo, P & Holley, R., 2002, Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73(1), 83-92.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C & Montero, P., 2010, Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Guarda, A., Rubilar, J. F., Miltz, J & Galotto, M. J., 2011, The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 144-150.
- 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.
- Han, J. H., 2000, Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54, 56-65 .
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M & Ghavi, F. F., 2013, Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1490-1495.
- Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R & Nerin, C., 2007, Vapor-Phase Activities of Cinnamon, Thyme, and Oregano Essential Oils and Key Constituents against Foodborne Microorganisms. *Journal of Agriculture and Food*

فیلم، خواص و ماهیت ترکیبات ضد میکروبی و هم‌چنین ماهیت ماده غذایی مورد هدف در چگونگی عملکرد فیلم‌های فعال ضدمیکروبی قابل توجه معرفی گردید.

قدردانی

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و گروه بسته‌بندی IATA والنسیا به‌ویژه دکتر رافائل گابارا، گرسیا لویز-کارابایو و ویرجینیا موریل‌گلت که با فراهم آوردن امکانات تحقیق و حمایت‌های علمی مرا یاری کردند، سپاسگزاری می‌گردد.

- Chemistry*, 55(11), 4348-4356.
- Luber, P., 2009, Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs—which risks need to be managed first? *International Journal of Food Microbiology*, 134(1-2), 21-28.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga M. & Arnau, J., 2013, Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control*, 30(1), 325-330.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J & Hadian, M., 2012, Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT- Food Science and Technology*, 46(2), 477-484.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R & Hernández-Muñoz, P., 2012, Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 195-201.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H & Kruse, H., 2010, Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15.
- Quintavalla, S & Vicini, L., 2002, Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3), 373-380.
- Razavilar, V., Akhoundzadeh Basti, A., Abbasifar, R & Radmehr, B., 2006, Effect of zataria multiflora Boiss. essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probabl growth of salmonella typhimurium in Brain heart infusion broth. *Journal of veterinary research*, 61(2), 135-141.
- Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A. A., Khmelinskii, I & Vieira, M. C., 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466-474.
- Salarbashi, D., Tajik, S., Aliabadi, S. S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R & Shahidi Noghabi, M., 2014, Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated Zataria multiflora Boiss. and Mentha pulegium essential oils. *Food Chemistry*, 146, 614-622.
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S. M & Khaksar, R., 2014, Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 101(0), 582-591.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J & Fyfe, L., 2001, The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18(4), 463-470.
- Suhr, K. I & Nielsen, P. V., 2003, Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4), 665-674.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A & Cliver, D. O., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199-1218.
- Tyagi, A. K & Malik, A., 2010, Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against Pseudomonas fluorescens. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 205-210.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P & Biliaderis, C. G., 2009, Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345.



Performance of antimicrobial bio active zein film against *Escherichia coli* and *Listeria innocua* during storage of Olivier salad

M. Kashiri¹

Received: 2014.09.05

Accepted: 2015.01.04

Introduction: Antimicrobial packaging is a novel preservation technology that is designed base on releasing of active agents incorporated with the packaging polymer into the packaged food or the surrounding environment for improving the quality and food safety. Zein, water insoluble protein of corn of corn, reported to be thermoplastic material with high tensile strength, excellent hydrophobic film, biodegradability. *Zataria multiflora* Boiss. (Z) is a thyme-like plant belonging to the Lamiaceae family that geographically grows wild in central and southern parts of Iran. Antimicrobial activity of Z essential oil (ZEO) has been successfully tested against foodborne pathogens. Most of the studies on antimicrobial packaging mainly focused on the initial screening of newly developed films for ZEO in laboratory media and quantifying the bacterial reductions obtained during storage for different types of packaged food products. It is really important to know the variation in antibacterial activity of the agents when incorporated into the packaging film from its original activity in order to establish the levels that need to be incorporated for effective bacteria inhibition, hence the aims of the present study were to investigate the antimicrobial potential of ZEO incorporated zein film against pathogenic microorganisms inoculated in olivier salad to provide evidence of their applicability in the design of active food packaging systems.

Materials and method: Z was collected in the Shiraz province of Iran and extracted by using cleverger type apparatus. Chemical composition ZEO was analyzed by gas chromatography. Antibacterial activity of ZEO was studied in the liquid (direct contact) and solid media (vapour phase) against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. Zein powder was dissolved in a hydro alcoholic solution to obtain 16% (w/w) films forming solutions. The solution was stirred for at 80 °C using a magnetic stirrer hotplate. Glycerol (15%) was added to the solution and stirred again for 8 min at 30°C, then ZEO was added to the polymer solutions in 5% and 10% with respect to polymer content and stirred for 8 min. Films were obtained by casting, the film forming solutions were extended over it using an extension bar and introduced in a drying tunnel equipped with a heat of 2500 W during 20 min. Control zein films were prepared without active agent. To evaluate the efficacy of developed zein films was tested against two bacteria. Prior to the experiment, a loop of each strain was transferred to 10 ml of TSB and incubated at 37 °C for 18 h to obtain early stationary phase cells and 100 µl of microorganism were inoculated into tubes with 10 ml of TSB. The tubes were then incubated at 37 °C for 18 h and 4 °C for 5 days. As control, zein film without active agent was also used in every experiment. Antibacterial activity of zein films containing 10% ZEO were evaluated for packaging of olivier salad as a real food model for 6 days, by performing serial dilutions with peptone and subsequent plating in Palcam Listeria Selective Agar and Brilliant Green Agar for *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. Plates were incubated at 37 °C for 48 hours.

Results and Discussion: GC-MS analysis showed that the major compound of ZEO was carvacrol (45.22%). The antimicrobial effects of ZEO in the vapor phase against *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by using the disk diffusion method showed that the 25 µg of ZEO produced a visible decrease in microbial density retraction zone (+). No inhibition was observed with the addition of lower amounts of the antimicrobial agents, therefore 25 µg was the minimum inhibitory concentration (MIC). Active zein films containing 5% ZEO weren't able to inhibit the growth of the two bacteria in the vapour phase. When the concentrations of ZEO was increased to 10%, only active films with a diameter of 80 mm (50.24 cm²) provided a retraction zone (+) against *Listeria innocua* and *E. coli*. These values were indicative that incorporation of the agent in the zein films produced weaker vapor phase inhibition than its incorporation in the paper disk. The results of this study showed that films with 5% ZEO caused a growth reduction of 1.17 log against *Listeria innocua* and 1.14 log against *Escherichia coli*, while 10% ZEO produced reductions of 2.16 and 2.64 log against *Listeria innocua*, *Escherichia coli* respectively. There was no significant difference between log reduction values of ZEO incorporated in zein films against *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. And also in the liquid media with

1- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

(*Corresponding author: kashiri.m@gmail.com)

increasing the concentration of ZEO in zein films, the log reduction values were increased against both bacteria. Despite of the excellent antibacterial effect of ZEO in zein films in direct contact, bio active zein films were not effective enough for reducing the contamination of packaged Olivier.

Keywords: Antibacterial packaging; Zein; Essential oil