مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی فیلم خوراکی زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی و مونولورین بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157: H7 در شرایط آزمایشگاهی

دکتر حسین تاجیک[۱،۲]*، دکتر سید مهدی رضوی روحانی[۳]، دکتر مهران مرادی[۴]، دکتر عذرا فرهنگ فر[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۸

چکیده

پیش زمینه و هدف: هدف این مطالعه تهیه و ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی فیلم خوراکی زئین حاوی مونولورین و اسانس آویشن شیرازی به صورت تنهایی و ترکیبی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش کار: فیلم زئین حاوی مونولورین (۱ درصد) و اسانس (۲ و ۳ درصد) به روش کاستینگ تهیه و خصوصیات ضد باکتریایی فیلم‌های تهیه شده علیه لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157: H7 به دو روش disc covering و disc surface spreading ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که فیلم‌های زئین حاوی اسانس و منولورین، موجب افزایش معنی‌داری در اثرات ضد باکتریایی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد ($P < ۰/۰۵$). این افزایش متأثر از میزان ترکیب ضد میکروبی و نوع باکتری است، به طوری که لیستریا منوسیتوژنز حساس تر از اشریشیا کلی O157: H7 بود. در هر دو روش ارزیابی، تمامی فیلم‌ها به جز فیلم زئین خالی، اثرات ضد باکتریایی مناسبی علیه لیستریا منوسیتوژنز نشان دادند در حالی که تنها فیلم‌های حاوی اسانس اثرات ضد باکتریایی علیه اشریشیا کلیO157: H7 را نشان دادند. از لحاظ اثر بخشی، فیلم زئین حاوی ۳ درصد اسانس، بهترین اثر ضد باکتریایی را علیه هر دو باکتری داشت. همچنین نتایج نشان داد که در تمامی فیلم‌های مورد مطالعه، در ناحیه تماس فیلم و آگار، کلنی باکتریایی مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان داد که به جای استفاده مستقیم ترکیبات ضد میکروبی مونولورین و اسانس آویشن برای جلوگیری از رشد عوامل میکروبی، می‌توان با وارد کردن این ترکیبات در فیلم خوراکی زئین، اثرات ضد میکروبی آن‌ها را تقویت کرد.

کلید واژه‌ها: فیلم زئین، مونولورین، آویشن شیرازی، لیستریا منوسیتوژنز، اشریشیا کلیO157: H7

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره سوم، ص ۲۴۰-۲۳۲، مرداد و شهریور ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، صندوق پستی:۵۷۱۵۳۱۱۷۷، تلفن:۰۴۴۱۲۷۷۰۵۰۸

Email: h.tajik@urmia.ac.ir

مقدمه

بر اساس آمار سازمان فائو، حدود ۵۰ درصد محصولات کشاورزی به دلیل عدم بسته بندی مناسب از بین می‌روند. این چالش همراه با گسترش شیوع بیماری‌های باکتریایی، قارچی و انگلی با خواستگاه غذایی، باعث توجه بیشتر محققان و دانشمندان برای تحقیقات در زمینه ایجاد یکسری روش‌های کنترلی جهت حفظ کیفیت، تازگی و

[۱] استاد گروه بیوتکنولوژی گیاهان دارویی و صنعتی، پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

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

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

[۴] دانش آموخته دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۵] دانش آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

نموده شده است. در حال حاضر عمده روش بسته‌بندی مواد غذایی استفاده از پوشش‌هایی از جنس پلاستیک، شیشه، فلز و کاغذ بوده که با استفاده از منابع تجدید نشدنی و غیر قابل تجزیه تهیه شده و مشکلات زیست محیطی زیادی نیز به همراه دارند. در سالیان اخیر، اهمیت استفاده از فیلم‌های خوراکی[1] در مواد غذایی به عنوان جایگزین پوشش‌های پلاستیکی و کاغذی وارد مرحله جدیدی شده به طوری که بر اساس گزارشات موجود، در ۱۰ سال آینده استفاده از این نوع فیلم‌ها جایگزین فیلم‌های معمول بسته‌بندی قرار خواهد گرفت. این نوع بسته‌بندی جدیدترین زمینه دربارهٔ بسته‌بندی مواد غذایی به شمار رفته و همچنان در حال پیشرفت است (۱). بیو پلیمرهای مورد استفاده در تهیه فیلم‌های خوراکی را می‌توان بر اساس نوع تهیه آن‌ها به سه دسته، لیپیدی (واکس‌ها و اسیدهای چرب)، پلی ساکاریدی (کیتوزان، سلولز، آلژینات و نشاسته) و پروتئینی (پروتئین‌های آب پنیر، سویا و ذرت) تقسیم بندی نمود (۲). زئین[2] پروتئین طبیعی در ذرت است و تنها پروتئین ذرت است که به صورت تجاری استخراج می‌شود و در کشورمان به طور وسیعی یافت می‌گردد. این پروتئین در آب نامحلول و در الکل محلول است. در صورت حل کردن آن در اتانول و حرارت، فیلم زردرنگ، درخشان، شفاف و الاستیک مانند ایجاد می‌گردد. فیلم زئین دارای نفوذپذیری کمتری به بخار آب در مقایسه با سایر فیلم‌های تهیه شده از پروتئین‌های گیاهی است (۳،۴).

مزیت اصلی فیلم‌های خوراکی، استفاده از آن‌ها به عنوان حامل افزودنی‌های غذایی بیواکتیو GRAS[3] و غیر GRAS همچون طعم دهنده‌ها، مواد ضد میکروبی (نیسین، لیزوزیم، کیتوزان، مونولورین، اسیدهای خوراکی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی)، آنتی اکسیدان، مواد مغذی، آنزیم‌ها و رنگ‌ها است. ایده افزودن ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان به چنین فیلم‌هایی، علاوه بر بهبود خصوصیات فیزیکی- مکانیکی، کنترل فساد شیمیایی و کنترل عوامل بیماری‌زا و فساد باکتریایی و بهبود طعم و رنگ است. در نتیجه امکان فساد ماده غذایی به حداقل می‌رسد (۵). در این روش، ترکیب بیواکتیو، به صورت افزودنی به طور مستقیم به ماده غذایی اضافه نمی‌گردد و لذا امکان تغییر در ترکیب ضدمیکروبی در حین فرآوری که در روش استفاده مستقیم افزودنی اتفاق می‌افتد، مشاهده نمی‌گردد. مزیت دیگر این روش، رهایش آهسته و تدریجی ترکیبات بیواکتیو، به داخل غذا است (۱).

تحقیقات زیادی برای جایگزینی افزودنی‌های شیمیایی با ترکیبات ضد میکروبی طبیعی صورت گرفته شده است. اغلب این مطالعات در محیط کشت آزمایشگاهی انجام گرفته شده است و تعداد محدودی در مدل غذایی واقعی صورت پذیرفته است. اغلب ترکیبات طبیعی که برای ایجاد یک طعم مناسب، به غذا اضافه می‌شوند، دارای اثرات کنترلی بر روی رشد میکروبی می‌باشند. یک دسته مهم از ترکیبات طبیعی، عصاره، اسانس[4]، هیدروسل[5] و سایر سایر ترکیبات گیاهی خوراکی و پزشکی است. امروزه نشان داده شده که عصاره و اسانس‌های گیاهان، دارای اثرات مهاری علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشند. ترکیبات ضد میکروبی گیاهی و مکانیسم عمل آن‌ها به طور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته است. ولی با توجه به اینکه این ترکیبات دارای مواد شیمیایی مختلفی هستند، لذا بیان یک مکانیسم مشخص و واحد برای عمل ضد میکروبی این ترکیبات امکان پذیر نمی‌باشد (۶). آویشن شیرازی[6]، گیاهی درختچه‌ای و متعلق به تیره نعناعیان یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که گسترش جهانی دارد. از این گیاه به طور سنتی، به عنوان افزودنی و چاشنی در مواد غذایی استفاده می‌شود. این گیاه معطر از نظر جغرافیایی بومی ایران، پاکستان و افغانستان است. در ایران این گیاه انتشار وسیعی داشته به طوری که در بخش‌های مرکزی، جنوب و جنوب شرقی ایران دیده می‌شود. اسانس آروماتیک این گیاه، به دلیل داشتن ترکیبات منو ترپنی فنلی همچون کارواکرول، تیمول و پاراسیمن که در اسانس به دست آمده از اندام‌های مختلف گیاه وجود دارد، یکی از مؤثرترین اسانس‌های گیاهی با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بشمار می‌رود (۶). مونولورین[7] مخلوطی از مونو-دی-تری گلیسرید اسید لوریک است که علاوه بر داشتن خصوصیات امولسیون کنندگی، گزارشات مختلفی از وجود خاصیت ضد میکروبی این اسید چرب علیه عوامل باکتریایی، ویروسی و قارچی وجود دارد. مونولورین در بین تمامی مشتقات اسیدهای چرب، یکی از قوی‌ترین خواص ضد میکروبی را دارا است. مونولورین مانند هر منواستر اسید چرب، یک ترکیب لیپوفیلیک می‌باشد و تأثیرات مهاری آن نیز ناشی از تداخل آن با غشاء سیتوپلاسمی میکروارگانیسم ها است (۷، ۸). این مطالعه که برای اولین بار انجام می‌گردد، با هدف بررسی اثرات فیلم ضد میکروبی زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی (۲ و ۳ درصد) و مونولورین (۱ درصد) به تنهایی و به صورت ترکیبی بر خصوصیات

[1] Edible films
[2] zein
[3] Generally recognized as safe

[4] Essential oils
[5] فرآورده جانبی استخراج اسانس
[6] Zataria multiflora Boiss
[7] Monolaurin

ضدباکتریایی علیه لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت.

مواد و روش کار

استخراج اسانس:

بخش‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی خشک از استان اصفهان خریداری و پس از شناسایی گونه و جنس توسط متخصص مربوطه (شماره هرباریم ۱۳۲۱)، اسانس روغنی آن به روش تقطیر با آب[1] با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه گردید. اسانس حاصل، از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی عبور داده و تا زمان استفاده، در شیشه‌ای مخصوص در دار تیره رنگ، در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

جهت شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس فرار گیاه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی[2] استفاده گردید. دستگاه گاز کروماتوگرافی از نوع Hewlet Packard 6890N با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به صورت زیر تنظیم گردید: دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد، توقف در این دما به مدت ۶ دقیقه، دمای انتهایی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه، دمای اتاقک تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌متر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مدل Hewlet Packard 5973N با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع (۹) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات با استفاده از برنامه کتابخانه نرم افزاری وایلی[3] صورت پذیرفت.

تهیه محلول مونولورین

مونولورین با نام تجاری لوریسیدین از شرکت لوریسیدین[4] خریداری گردید. محلول استوک این ماده در غلظت لازم در اتانول، به صورت روزانه تهیه و پس از عبور از میکرو فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی در داخل یخچال نگهداری گردید.

تهیه فیلم خوراکی زئین

ابتدا میزان لازم (۱/۴ گرم) پودر زئین تهیه شده از شرکت سیگما آلدریچ آلمان، در ۸/۱ میلی لیتر اتانول ۹۷ درصد ریخته و به مدت ۲۵-۴۰ دقیقه در دور پایین حل گردید. به منظور حذف ناخالصی، محلول زئین در شرایط خلأ و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف گردید سپس پلاستی سایزر مورد نظر اضافه و دمای محلول را افزایش داده تا بجوشد. سپس به مدت ۵ دقیقه در حالت جوش گذاشته و سپس در دمای اتاق سرد گردید (۱۰). سپس از فیلترهای ۰/۴۵ میکرونی عبور داده و به میزان لازم از دو ترکیب ضد میکروبی استریل شده اضافه گردید تا تیمارهای ذیل تهیه گردد: ۱) گروه کنترل حاوی زئین خالی، ۲) محلول زئین حاوی ۲ درصد اسانس، ۳) محلول زئین حاوی ۳ درصد اسانس، ۴) محلول زئین حاوی ۱ درصد مونولورین، ۵) محلول زئین حاوی ۲ درصد اسانس + ۱ درصد مونولورین و ۶) محلول زئین حاوی ۳ درصد اسانس + ۱ درصد مونولورین. لازم به ذکر است، میزان درصد ترکیبات مورد استفاده، بر اساس مطالعات مقدماتی صورت گرفته توسط نگارندگان، مشخص گردید. سپس محلول در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه هموژن شده و حباب‌های هوای داخل آن با صافی کردن محلول در شرایط وکیوم گرفته شد.

برای تهیه فیلم، از روش کاستینگ استفاده گردید (۱۰). برای این منظور، به میزان لازم از محلول، در قالب‌هایی از جنس پلی تترا فلورواتیلن ریخته و سپس قالب به منظور پخش یکنواخت محلول به آرامی تکان داده شد. نهایتاً جهت خشک شدن فیلم، قالب‌ها در یک سطح کاملاً صاف و در دمای اتاق، به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. پس از خشک شدن کامل، فیلم‌ها به آرامی از داخل قالب جدا شده، و قبل از انجام آزمایشات مربوطه، در شرایط ثابت رطوبت (۲±۵۰٪) و دما (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد) در داخل دسیکاتور حاوی محلول اشباع برومید سدیم به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید.

ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی فیلم

تهیه میزان تلقیح باکتریایی

باکتری لیستریا منوسیتوژنز[5] و اشریشیا کلی[6] O157:H7 از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. باکتری‌ها قبل از استفاده به طور متوالی دو بار در محیط تریپتوز سوی براث[7] (Lab M, UK) تجدید تجدید کشت گردید. کشت دوم با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰ میلی لیتر از محیط مذکور، تهیه و در ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت نگهداری گردید.

[1] Hydrodistillation
[2] Gas chromatography- Mass Spectrometers
[3] WILEY
[4] Lauricidin Inc., USA

[5] Listeria monocytogenes PTCC1163
[6] Escherichia coli O157:H7 ATCC 25922
[7] Triptic Soy Broth

سپس از کشت ۲۰ ساعته رقت لازم 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^{۹} باکتری در هر میلی لیتر مشخص گردید. در هر آزمایش از لوله حاوی ۱×۱۰^{۹} باکتری در هر میلی لیتر، رقت‌های ۱۰ تایی لازم را در آب پپتونه (Merck, Darmstadt, Germany) ۰/۱ درصد تهیه و از لوله حاوی تعداد تقریبی باکتری مورد نظر به عنوان دوز تلقیح استفاده گردید. برای این منظور پس از تعیین استوک اصلی باکتری و ثابت کردن جذب نوری آن، به روش رقت سازی در داخل آب پپتونه ۰/۱ درصد، میزان تلقیح لازم مورد استفاده، تهیه گردید.

بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش Disc covering

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 میلی لیتر است، در محیط کشت تریپتیک سوی آگار(Lab M, UK) تلقیح نموده و سپس در شرایط استریل، یک عدد دیسک گرد از فیلم به قطر ۱۰ میلی متر را در پلیت قرار داده، و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۱). در نهایت جهت تعیین میزان بازدارندگی فیلم‌های مورد مطالعه بر روی باکتری، مساحت هاله بازدارندگی[1] 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.

بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش Disc surface spreading

روش انجام، کاملاً مشابه روش Disc covering است(۱۱)، با این تفاوت که ابتدا دیسک فیلم مورد نظر بر روی پلیت تلقیح نشده قرار داده و سپس عمل تلقیح باکتری انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات، در قالب طرح کاملاً تصادفی و در حداقل سه تکرار انجام گردید. اطلاعات بدست آمده، توسط نرم افزار GraphPad (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تحلیل واریانس با پروسیجر ANOVA و تست Newman-Keuls post در سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ صورت گرفت.

یافته‌ها

نتیجه تحلیل ترکیبات اسانس روغنی آویشن شیرازی مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی در جدول۱ نشان داده شده است. از بین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، ۲۹ ترکیب که ۹۸/۳۸ درصد ترکیبات اسانس را شامل می‌گردید، شناسایی گردید. در بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی، تیمول بیشترین میزان (۶۴/۸۷ درصد) را داشت و سپس ترکیباتی همچون گاما ترپینن، پاراسیمن، کارواکرول و ترانس کاریوفیلن قرار داشتند.

از لحاظ ظاهری، فیلم زئین به رنگ زرد، بسیار انعطاف پذیر و محکم بوده و به راحتی از قالب جدا می‌شد. تمامی فیلم‌های ضد میکروبی زئین حاوی اسانس و مونولورین به دلیل رنگ مخصوص زئین، به رنگ زرد براق بودند. اضافه شدن این دو ترکیب در محلول زئین، تغییر واضحی در رنگ فیلم ایجاد نکرد. در غلظت‌های اسانس مورد استفاده، میزان ثبات امولسیون محلول زئین متأثر از میزان اسانس نبود. به طوری که در غلظت‌های (۲ و ۳ درصد) جدا شدن فاز، متعاقب هموژنیزاسیون مشاهده نگردید. این حالت به دلیل حل شدن مناسب اسانس در حلال زئین یعنی اتانول می‌باشد. همچنین استحکام بالای فیلم‌های زئین حاوی مونولورین ممکن است به دلیل ماهیت لیپیدی ترکیب اخیر باشد، که به عنوان یک پلاستی سایزر مناسب عمل می‌نماید.

اثرات فیلم‌های ضد میکروبی بر روی رشد لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157:H7 در محیط آگار، به روش Disc covering وDisc surface spreading در جداول۲ و ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که در هر دو روش مورد استفاده، فیلم زئین خالی اثرات ضد باکتریایی لازم بر روی دو باکتری مورد مطالعه نداشت (تصویر ۱). همچنین فیلم‌های حاوی مونولورین تنها بر روی لیستریا منوسیتوژنز اثر داشت و تأثیری بر روی اشریشیا کلی نداشت. این تغییرات، متأثر از نوع و میزان ترکیب ضد میکروبی اضافه شده است. در هر دو باکتری مورد مطالعه، بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به فیلم حاوی ۳ درصد اسانس بود. همچنین نتایج نشان داد که در تمامی فیلم‌های مورد مطالعه، در ناحیه تماس فیلم و آگار، کلنی باکتریایی مشاهده نگردید.

[1] Inhibition Zone

جدول شماره (۱): ترکیب‌های شیمیایی تشکیل دهنده اسانس آویشن شیرازی با استفاده از تحلیل GC/MS

ترکیب	شاخص بازداری	درصد	ترکیب	شاخص بازداری	درصد
α-Thujene	۹۳۱	۰/۵۷	Thymol	۱۳۰۰	۶۴/۸۷
α-Pinene	۹۳۹	۰/۸۸	Carvacrol	۱۳۱۴	۴/۶۵
Camphene	۹۵۳	۰/۹۲	Thymol acetate	۱۳۵۵	۰/۰۸
β-Pinene	۹۸۰	۰/۲	Trans-Caryophyllene	۱۴۲۲	۳/۴۱
β-Myrcene	۹۹۱	۱/۰۱	Aromandrene	۱۴۳۹	۰/۱۸
α-Phellandrene	۱۰۰۲	۰/۱۵	α-Humulene	۱۴۵۳	۰/۰۹
α-Terpinene	۱۰۱۵	۱/۶۳	γ-Muurolene	۱۴۷۶	۰/۱۱
p-Cymene	۱۰۲۴	۵/۶۳	Viridiflorene	۱۴۹۶	۰/۲
Sylvestrene	۱۰۲۸	۰/۳۱	β–Bisabolene	۱۵۰۷	۰/۱۱
1,8-Cineole	۱۰۲۹	۰/۸	γ-Cadinene	۱۵۱۳	۰/۰۹
γ-Terpinene	۱۰۶۱	۹/۱۱	δ-Cadinene	۱۵۲۲	۰/۲
Cis-Sabinene hydrate	۱۰۶۶	۰/۵۱	Spathlenol	۱۵۷۵	۰/۱
α-Terpinolene	۱۰۸۸	۰/۱۵	Caryophyllene oxide	۱۵۸۰	۰/۳۴
Borneol	۱۱۶۳	۱/۴۲	Carvacrol methyl	۱۲۴۲	۰/۵۵
α-Terpineol	۱۲۰۹	۰/۱۱			
جمع کل٪۹۸/۳۸					

جدول شماره (۲): خواص ضد میکروبی فیلم زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی و مونولورین علیه لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157:H7 در محیط کشت تریپتوز سوی آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به روش Disc covering

نوع فیلم	مساحت هاله بازدارندگی(میلی متر مربع)		ناحیه تماس[×]	
	لیستریا منوسیتوژنز	اشریشیا کلی O157:H7	لیستریا منوسیتوژنز	اشریشیا کلی O157:H7
کنترل	۰[a]**	۰[a]**	-***	-***
۲٪ اسانس	۸۶/۵۵±۶/۱۱[c]	۶۳/۸۳±۵/۹۱[b]	-	-
۳٪ اسانس	۱۴۵/۷۰±۶/۵۱[e]	۹۹/۰۲±۶/۱۸[c]	-	-
۱٪ مونولورین	۴۴/۴۲±۱/۳۹[b]	۰[a]	-	-
۲٪ اسانس + ۱٪ مونولورین	۷۲/۴۵±۶/۲۶[c]	۵۱/۴۱±۵/۲۳[b]	-	-
۳٪ اسانس + ۱٪ مونولورین	۱۰۱/۶۸±۶/۸۳[d]	۷۳/۳۳±۷/۹۶[b]	-	-

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

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

*** + و - به ترتیب نشان دهنده مشاهده و عدم مشاهده چشمی کلنی باکتری در ناحیه تماس است.

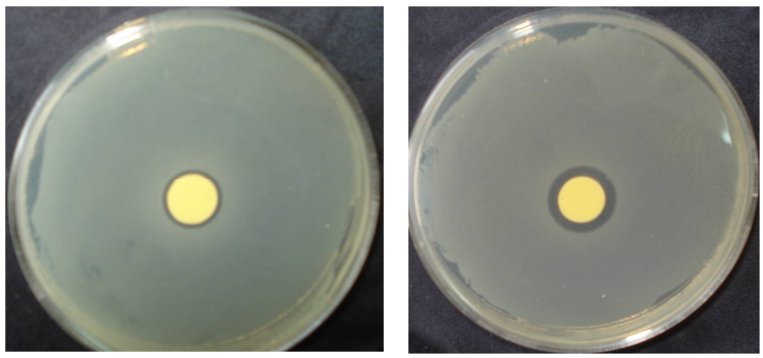
جدول شماره (۳): خواص ضد میکروبی فیلم زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی و مونولورین علیه لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیا کلی O157:H7 در محیط کشت تریپتوز سوی آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به روش Disc surface spreading

نوع فیلم	مساحت هاله بازدارندگی(میلی متر مربع)		ناحیه تماس[×]	
	لیستریا منوسیتوژنز	اشریشیا کلی O157:H7	لیستریا منوسیتوژنز	اشریشیا کلی O157:H7
کنترل	[a]**.	[a]**.	-***	-***
۲٪ اسانس	[c]۴/۷۰±۸۵/۳۶۵	[b]۴/۷۶±۶۷/۱۷	-	-
۳٪ اسانس	[e]۴/۸۲±۱۴۹/۲۸	[c]۶/۹۰±۹۸/۸۰	-	-
۱٪ مونولورین	[b]۰/۰۹±۱۵/۰۰	[a].	-	-
۲٪ اسانس + ۱٪ مونولورین	[c]۳/۹۱±۷۳/۶۲	[b]۴/۰۳±۵۶/۶۲	-	-
۳٪ اسانس + ۱٪ مونولورین	[d]۴/۹۶±۱۰۵/۹۹	[b]۵/۷۷±۷۴/۱۱	-	-

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

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

*** + و - به ترتیب نشان دهنده مشاهده و عدم مشاهده چشمی کلنی باکتری در ناحیه تماس است.



تصویر شماره (۱): نمونه‌ای از هاله بازدارندگی فیلم خوراکی ضد میکروبی زئین علیه لیستریا منوسیتوژنز (سمت راست) و اشریشیا کلیO157:H7 (سمت چپ) در محیط کشت آگار

بحث و نتیجه گیری

روش‌های مختلفی برای استفاده از اسانس، هیدروسل و سایر ترکیبات ضد میکروبی در مواد غذایی وجود دارد. روش معمول استفاده، اضافه نمودن مستقیم و یا اسپری محلول در یک غلظت مشخص بر روی سطح خارجی ماده غذایی است. به دلیل عدم کنترل میزان تماس و رهایش ترکیبات مذکور در سطح ماده غذایی، میزان مصرف ترکیب مورد نظر، در این روش بسیار بالا است (۱۲).

روش دیگری که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، وارد کردن ترکیبات ضد میکروبی در فیلم‌های زیست تخریب پذیر و خوراکی و تولید فیلم‌هایی تحت عنوان فیلم ضدمیکروبی است. مهم‌ترین هدف استفاده از این ترکیبات در فیلم‌های زیست تخریب پذیر، بهبود اثرات ضدمیکروبی- آنتی اکسیدان فیلم، بهبود خصوصیات نفوذپذیری فیلم‌های هیدروفیل و کاهش از دست رفتن ترکیبات فرار به خصوص در مورد اسانس در طول زمان نگهداری است، لذا در این صورت ترکیب مورد نظر، در یک غلظت بالا و برای مدت طولانی در سطح فرآورده باقی می‌ماند. این مطالعه با هدف تولید فیلم زئین با خصوصیت ضد میکروبی انجام گردید.

مقالات متعددی، در زمینه ترکیبات اسانس‌های مختلف ارائه شده است. تحلیل جزء به جزء ترکیبات از طریق کروماتوگرافی گازی امکان پذیر است. اسانس‌ها می‌توانند دارای بیشتر از ۶۰ ترکیب منحصر به فرد باشند. ترکیبات اصلی می‌توانند تا ۸۵ درصد اسانس را تشکیل دهند، در صورتی که سایر ترکیبات تنها به صورت ناچیز موجود می‌باشند. برخی شواهد نشان می‌دهد ترکیبات ناچیز دارای یک نقش ضروری در ایفای عملکرد ضد باکتریایی هستند که احتمالاً از طریق تولید یک اثر سینرژیستی با سایر ترکیبات، آن‌را ایفا می‌کنند. این مورد در برخی موارد شامل مریم گلی، برخی از گونه‌های آویشن و پونه کوهی یافت شده است (۱۳).

در بین ۲۹ ترکیب فعال اسانس آویشن شیرازی شناسایی شده در این مطالعه، برخی مثل تیمول، گاما ترپینین، پاراسیمن کارواکرول و ترانس کاریوفیلن دارای درصد بالا بوده در حالی که بقیه ترکیبات در حد ناچیز شناسایی شدند. عمده مواد فرار ثبت شده در اسانس آویشن، به گروه مونوترپن‌های آن تعلق دارند و یک مونوترپن فنلی (تیمول) در بین سایرین عملکرد اصلی را دارا است و بیش از ۶۰ درصد مواد را شامل می‌شود. 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 (۱۴). با طبقه بندی ترکیبات شناسایی شده در این مطالعه، نشان داده شد که بیشترین درصد ترکیبات مربوط به دسته مونوترپن های اکسیژنه (۷۲/۹۹ درصد) و هیدروکربن‌های مونوترپنی (۲۰/۵۶ درصد) بود و سایر ترکیبات از لحاظ درصدی در مقادیر کمتری موجود بودند. نتایج مشابهی توسط شریف فر و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش گردید (۱۵). ولی در مطالعه‌ای، که توسط میثاقی و بَستی(۲۰۰۷) بر روی ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی انجام گرفت، نشان داده شد که در بین ۲۱ ترکیب شناسایی شده (۷۱/۱۲ درصد)، و به جای تیمول، کارواکرول ترکیب اصلی اسانس است (۱۶).

ترکیبات دارای جزء فایتو[1] مانند کارواکرول، تیمول، اسید رزمارینیک و کارنوسیک اسید، مسئول بروز ویژگی عمده ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی ترکیبات گیاهی هستند (۱۳).

مطالعه اثرات ضد لیستریا منوسیتوژنز و اشریشیا کلی فیلم زئین، در محیط آگار به دو روشDisc covering و Disc surface spreading صورت گرفت. روش اول، شبیه سازی آزمایشگاهی حالتی از آلودگی میکروبی ماده غذایی است که در آن فیلم خوراکی بر روی ماده غذایی آلوده قرار داده می‌شود. در حالی که روش دوم، شبیه سازی حالتی از آلودگی ماده غذایی است که در آن فیلم خوراکی بر روی ماده غذایی غیر آلوده قرار داده شده و آلودگی پس از استفاده از فیلم اتفاق می‌افتد (۱۷).

زمانی که ترکیبات ضد میکروبی به فیلم‌های خوراکی اضافه می‌گردند، این ترکیبات در محیط کشت آگار منتشر و ایجاد هاله بازدارندگی مشخص در اطراف فیلم می‌گردد (۱۱). نتایج مطالعه در محیط آگار نشان داد که تمامی فیلم‌های زئین حاوی اسانس آویشن و مونولورین، موجب افزایش معنی‌داری در افزایش هاله بازدارندگی رشد باکتری گرم مثبت لیستریا در محیط کشت در مقایسه با فیلم زئین خالی دارد ($P < ۰/۰۵$). این تغییرات، متأثر از میزان ترکیبات اضافه شده داشت. ولی اختلاف مشخصی در مورد روش مورد استفاده برای ارزیابی خصوصیات ضد باکتریایی نبوده، به طوری که در برخی تیمارها کاهش و در برخی افزایش ناچیزی نشان دادند. اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های تهیه شده، بر روی باکتری اشریشیا کلی ضعیف‌تر از باکتری لیستریا منوسیتوژنز بود و یک اختلاف بین دو باکتری، عدم تأثیر فیلم حاوی مونولورین بر روی باکتری گرم منفی بود. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که مونولورین دارای اثرات قابل توجه مهاری بر روی لیستریا منوستوژنز است و بر روی باکتری گرم منفی مورد مطالعه اثرات مشخص ندارد. البته تأثیر مثبت مونولورین بر روی باکتری‌های گرم مثبت، توسط تعدادی از محققان مورد تائید قرار گرفته است طیف محدود تأثیرات ضد باکتریایی مونولورین بر روی لیستریا را، مانند سایر باکتری‌های گرم مثبت، مرتبط با ساختمان دیواره سلولی آن‌ها می‌دانند (۷). بنابراین یک محدودیت مونولورین این است که عمل آن روی باکتری‌های گرم منفی کم یا بدون اثر است. ولی در حضور مقدار خیلی کم مواد جاذب فلزات مانند EDTA، مونولورین باعث ممانعت باکتری‌های گرم منفی می‌شود (۷). رهیافت دیگر برای بهبود اثرات ضد باکتریایی مونولورین علیه باکتری‌های گرم منفی، استفاده از سایر ترکیبات طبیعی با طیف اثر بیشتر بر روی باکتری‌های گرم منفی است.

مطالعات قبلی نشان داد که ترکیبات فنلی همچون تیمول و کارواکرول، که ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی را تشکیل می‌دهند، مهم‌ترین ترکیبات ضد میکروبی به‌شمار می‌روند (۶)؛ لذا به نظر می‌رسد وارد کردن ترکیبات فرار مثل اسانس در فیلم‌های خوراکی، ضمن بهبود خصوصیات ضد میکروبی و حتی فیزیکی مکانیکی فیلم، مانع از دست رفتن ترکیبات فعال و فرار اسانس می‌گردد. دل نوبیل و همکاران در مطالعه مشابه، تأثیر فیلم زئین حاوی تیمول (ماده مؤثره آویشن) بر روی باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و سودوموناس ها 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). ایشان همچنین نشان دادند که میزان آزاد شدن تیمول از فیلم زئین به داخل محیط کشت وابسته به دما بوده ولی غلظت تیمول تأثیری در میزان آزاد شدن آن ندارد. مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس آویشن، وابسته به غلظت بوده به طوری که در غلظت‌های پایین، فنل ها با اثر بر روی فعالیت آنزیمی به خصوص آنزیم‌های مرتبط با تولید انرژی عمل نموده در حالی که در غلظت‌های بالا، این ترکیبات باعث دناتوراسیون پروتئین می‌شود (۱۴).

[1] phyto

حسینی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که افزودن اسانس آویشن در فیلمکیتوزان نسبت به اسانس میخک و دارچین، اثرات ضد میکروبی 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) حساس تر از باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا آنتریدیدیس و سودوموناس آئروژینوزا) هستند و از طرفی میزان حساسیت، تابعی از نوع و میزان اسانس است. سیدم و ساریکوس در سال ۲۰۰۶ نیز نشان دادند که فیلم آب پنیر ایزوله حاوی اسانس پونه کوهی (۲۰ گرم در هر 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 اسانس‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است، مشابه است.

برای ارزیابی رشد باکتری در سطح تماس فیلم و آگار در هر دو روش، فیلم مورد نظر را برداشته و رشد (+) و عدم رشد (-) کلنی باکتری به صورت چشمی بررسی گردید. نتایج نشان داد که در تمامی فیلم‌های مورد مطالعه، در ناحیه تماس فیلم و آگار کلنی باکتریایی مشاهده نگردید. عدم رشد کلنی در این ناحیه، احتمالاً به علت ایجاد پیوستگی بین سطح آگار تلقیح شده است، که مانع از رشد کلنی‌های باکتری در اندازه ایی می‌گردد، که با چشم غیر مسلح قابل تشخیص نیست (۱۲).

در این مطالعه، نتایج اثرات ضد میکروبی فیلم زئین حاوی اسانس آویشن و مونولورین در شرایط آزمایشگاهی که برای اولین بار صورت گرفت، نشان داد که وارد کردن ترکیبی هر دو ترکیب باعث بهبود قابل توجه خصوصیات ضد باکتریایی فیلم گردید. البته نشان داده شد که میزان خاصیت ضد باکتریایی، تابعی از نوع ارگانیسم، روش ارزیابی اثر ضد میکروبی، نوع و میزان ترکیبات ضد میکروبی مورد استفاده به صورت تکی و یا ترکیبی دارد. لازم است اثرات اضافه شدن ترکیبات ضد میکروبی بر روی خصوصیات فیزیکی- مکانیکی، حرارتی و رئولوژیک فیلم نیز بررسی گردد. از فیلم‌های تهیه شده در این مطالعه می‌توان به عنوان پوشش در فرآورده‌های غذایی از جمله محصولات گوشتی و لبنی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه به خاطر همکاری‌هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

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 Food Sci Tech 2008; 19: S99-S108.
2. Quintero-Salazar B, Ponce-Alquicira E. Edible packaging for poultry and poultry products. In: Hul HU, Editor. A handbook of food products manufacturing. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2007. P. 797-815.
3. Bastiol C. Handbook of biodegradable polymers. United Kingdom: Rapra Technology; 2005. P. 35-8.
4. Ildikó T. Alternative polymers and processes for coating [Dissertation]. Berlin: der Freien Universität; 2006.
5. Martín-Belloso O, Rojas-Graü MA, Soliva-Fortuny R. Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. In: Embuscado ME, Huber KC, Editors. Edible films and coatings for food applications. New York: Springer; 2009. P.295-314.
6. 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 Chem Toxicol 2010; 48: 1562-7.
7. Razavi Rohani SM, Griffiths MW. The effect of mono and poly glycerol laurate in spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. J Food Safety 1997; 14: 131-51.
8. Tajik H, Razavi Rohani SM, Shokoohi Sabet Jalali F, Bayani A. Laboratory assessment of

inhibitory properties of monolaurin against Staphylococcus aureus in beef. Iranian J Med Microbiol 2009; 3: 27-33.

9. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL; 1989.
10. Mecitoğlu Ç, Yemenicioğlu A, Arslanoğlu A, Elmaci ZS, Korel F, Çetin AE. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. Food Res Int 2006; 39: 12-21.
11. 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 Chem 2010; 122: 161-6.
12. Royo M, Fernández-Pan I, Maté JI. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper. J Sci Food Agr 2010; 90: 1513-19.
13. Peter KV. Handbook of herbs and spices. 1st Ed. New York: CRC Press; 2004.
14. Tiwari BK, Valdramidis VP, O Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen PJ. Application of natural antimicrobial for food preservation. J Agr Food Chem 2009; 57: 5987-6000.
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. Min S, Harris LJ, Krochta JM. Listeria monocytogenes inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. J Food Sci 2005; 70: M317-24.
18. Del Nobile MA, Conte A, Incoronato AL, Panza O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. J Food Eng 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. J Food Process Pres 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 Res Int 2006; 39: 639-44.