مجله سلامت و محیط زیست، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره یازدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۷، صفحات ۱۱۱ تا ۱۲۲

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir
مقاله پژوهشی

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

مطالعه تاثیر اسانس پونه کوهی و عصاره اتانولی بره‌موم بـر ویژگی‌های ضد باکتریایی و برخی ویژگی‌های فیزیکی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر پلی‌لاکتیک اسید

علی میثاقی*، معصومه سعیدی، نگین نوری، محمدرضا رضایی گلستانی
گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۲۲
تاریخ ویرایش: ۹۶/۱۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۹
تاریخ انتشار: ۹۷/۰۳/۳۰

واژگان کلیدی: اسانس پونه کوهی، بسته‌بندی مـواد غذایـی، پلی‌لاکتیـک اسـید، بره‌مـوم، پاتوژن‌های غذایی

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
amisaghi@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات ضد میکروبی طبیعی دارای ظرفیت ارزشـمندی برای استفاده در انواع مواد غذایی جهت مقابله با میکروارگانیسـم‌های بیماری‌زا و عامل فسـاد هستند. اهداف این مطالعه شامل تولید فیلم‌های زیسـت‌تخریب‌پذیر به کمک ترکیب پلی‌لاکتیک اسـید با غلظت‌های مختلف اسانس پونه کوهی و یا عصاره اتانولی بره‌موم و بررسـی ویژگی‌هـای فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم‌های حاصل بودند.

روش بررسـی: فیلم‌های فعال بر پایه پلی‌لاکتیک اسـید به کمک روش قالب‌گیری تولید شـدند و ضخامت و مهمترین پارامترهای رنگی آنها به ترتیب به کمک میکرومتر دیجیتال و دستگاه رنگ‌سنج اندازه‌گیری شـدند. در ادامه اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های حاصل علیه چهار باکتری بیماری‌زای رایج غذازاد شامل استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، ویبریو پاراهمولیتیکوس و لیستریا مونوسایتوژنز، بوسیله روش انتشار دیسک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌هـا: نتایج ارزیابی‌های فیزیکی نشـان دادند که اولا با اضافه شـدن غلظت‌های مختلف دو ماده فعال، غالبا ضخامت فیلم‌های حاصل بصورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < ۰/۰۵$)، و ثانیا، حضور این ترکیبات در سـاختار فیلم‌ها همزمان باعث کاهش روشـنایی و افزایش میزان زردی و قرمزی فیلم‌ها شد. هیچ‌یک از فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید خالص و یا حاوی عصاره بره‌موم، اثر ضدمیکروبی به جای نگذاشـتند، اما تمامی فیلم‌های حاوی درصدهای بالاتر اسـانس پونه کوهی (۵ و ۱۰ درصد) به‌صورت وابسـته بـه غلظت علیه هر ۴ سـویه باکتریایی موثر بودند، و این اثـرات در رابطه با باکتری‌های گرم مثبت شدیدتر ثبت شد. بیشترین هاله عدم رشد هم در مورد فیلم شماره حاوی ۱۰ درصد اسانس و ۲ درصد بره‌موم ثبت شـد که مقادیر آن به ترتیـب ۵۶/۶۶، ۴۵/۴۶، ۱۷/۹۱ و ۱۷/۶۵ mm در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوژنز، ویبریو پاراهمولیتیکوس و اشرشیا کلی بودند.

نتیجه‌گیری: براسـاس یافته‌های این مطالعه، حضور عصاره اتانولی بره‌موم به تنهایی در فرمولاسیون اولیه فیلم‌های پلی لاکتیک اسـید علیه چهار پاتوژن غذازاد مورد مطالعه تاثیرگذار نبوده، در حالی‌که اضافه شـدن این ترکیب به فیلم‌های حاوی اسـانس پونه کوهی موجب افزایش ویژگی‌های موثر ضد باکتریایی فیلم‌های حاصل شـد. در نتیجه، اسـتفاده همزمان از این دو ترکیب در سـاختار فیلم‌های آبگریز مانند فیلم پلی لاکتیک اسید برای تولید فیلم‌های فعال بسته‌بندی مواد غذایی توصیه می‌گردد.

Please cite this article as: Misaghi A, Saeedi M, Noori N, Rezaeigolestani MR. Study of effect of oregano essential oil and ethanolic extract of propolis on antibacterial properties and some physical characteristics of biodegradable poly-lactic acid films. Iranian Journal of Health and Environment. 2018;11(1):111-22.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

مقدمه

اسانس‌های گیاهی به‌عنوان دسته مهمی از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی ظرفیت مناسبی را برای استفاده در انواع مواد غذایی جهت مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد دارا هستند. این ترکیبات زیست فعال عصاره‌های فرار و معطری هستند که از بخش‌های مختلف گیاهان شامل گل، دانه، غنچه، ریشه و برگ بدست می‌آیند (۱). بدلیل ویژگی‌های شناخته شده زیستی و طعم‌دهندگی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی، این دسته از ترکیبات در میان پرمصرف‌ترین مواد افزودنی (به اشکال مختلف) در انواع مواد غذایی محسوب می‌شوند. در میان اسانس‌های گیاهی، اسانس گیاه پونه کوهی به دلیل ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی شناخته شده خود بارها به صورت موفقیت آمیز برای نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است (۲). معمولا این اسانس حاوی درصد قابل توجهی از ترکیبات فنولیک ضد میکروب مانند تیمول و کارواکرول و همچنین میزان کمتری از پی-سایمن و گاما ترپینن است (۳).

بره‌موم ترکیب ضدمیکروبی طبیعی دیگری است که نقش ساختمانی و محافظتی در کندوهای زنبور عسل ایفا می‌کند (۴). مهمترین ترکیبات ضدمیکروبی بره‌موم فلاونوییدها و ترکیبات فنولیک هستند که در اصل از مشتقات ترکیبات گیاهی محسوب می‌شوند که توسط زنبور عسل جمع‌آوری شده‌اند (۵). در تحقیقاتی که تا به امروز در رابطه با اثرات مختلف بره‌موم صورت گرفته عمدتا از عصاره اتانولی آن استفاده شده است (۷-۵).

از آنجایی‌که تداخلات بین اجزا موجود در مواد غذایی با اسانس‌های گیاهی و سایر مواد فعال ضدمیکروب ممکن است قابلیت این مواد فعال را کاهش دهد، بنابراین غلظت‌های بالاتری از این ترکیبات باید به ماده غذایی افزوده شوند تا فعالیت مورد نیاز تامین شود (۸). در چنین مواردی تاثیر منفی غلظت‌های بالاتر اسانس و ماده ضدمیکروب بر خصوصیات حسی ماده غذایی، چالش جدی است که باید در نظر گرفته شود. در میان اصلی‌ترین راه‌حل‌های ارائه شده برای مشکل مذکور، ادغام این ترکیبات فعال با فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی اخیرا توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۱-۹). در همین رابطه مواد بسته‌بندی مختلفی به‌عنوان پلی‌مر پایه جهت تولید بسته‌بندی‌های فعال مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. از بین این پلی‌مرها، ویژگی‌های استثنایی پلی‌لاکتیک اسید (PLA) از جمله زیست‌تخریب‌پذیری، خصوصیات قابل قبول فیزیکی-مکانیکی و قیمت مناسب (در مقایسه با سایر پلی‌مرهای زیست‌تخریب‌پذیر) (۱۲)، آن را به گزینه جذابی برای استفاده در بسته‌بندی‌های فعال مواد غذایی تبدیل کرده‌اند.

اگرچه تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با کاربرد مستقیم ترکیبات فعال طبیعی در مواد غذایی منتشر شده‌اند، اما تمایل به استفاده غیر مستقیم از این نوع مواد در قالب بسته‌بندی‌های مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است.

در همین راستا، هدف از این مطالعه طراحی و تولید فیلم‌های فعال زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی‌لاکتیک اسید در ترکیب با غلظت‌های مختلف دو ترکیب ضدمیکروبی طبیعی اسانس پونه کوهی و عصاره اتانولی بره‌موم بوسیله روش قالب‌گیری، و بررسی اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های حاصل علیه چهار باکتری بیماریزای رایج غذازاد بوسیله روش انتشار دیسک بوده است.

مواد و روش‌ها

- مواد

چگالی گرانول‌های پلی‌لاکتیک اسید مورد استفاده ۱/۳ g/cm^3 و وزن مولکولی آنها ۱۹۷۰۰۰ g/mol بود. گیاه پونه کوهی و نمونه‌های خام بره‌موم از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. برای تهیه فیلم‌ها از دستگاه هموژنایزر مدل دیجیتال T25 و جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت ضدمیکروبی از کالیپر دیجیتال بهره گرفته شد. تمامی حلال‌ها و معرف‌ها با درجه کیفیت آزمایشگاهی تهیه شدند.

- روش‌ها

استخراج اسانس پونه کوهی و عصاره بره‌موم

استخراج اسانس و عصاره در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صورت گرفت. اسانس پونه

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

کوهی به روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر طی مدت ۳ h از برگ‌های خشک شده و خرد شده این گیاه تهیه شد. جهت خشک کردن اسانس از سولفات سدیم استفاده و اسانس بدست آمده تا زمان آزمون‌ها در شرایط یخچالی (دمای ۴ °C) و در تاریکی نگهداری شد.

برای تهیه عصاره اتانولی برەموم از روش معرفی شده در مطالعه Bodini و همکاران (۲۰۱۳) بهره گرفته شد (۱۳). به‌طور خلاصه، ۳۰ g برەموم به خوبی خرد شده و بعد از اضافه شدن ۱۰۰ mL اتانول (۸۰ درصد) استخراج روی استیرر انجام گرفت. در مرحله بعد مخلوط بدست آمده در درون بن‌ماری در دمای ۵۰ °C به مدت ۳۰ min همزده و با کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد تا عصاره اتانولی به‌دست آید. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در شرایط یخچالی و در تاریکی نگهداری شد.

آنالیز اجزا اساسی اسانس پونه کوهی و عصاره برەموم

جهت آنالیز اجزا اساسی اسانس و عصاره برەموم، نمونه‌های به‌دست آمده به پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی ارسال گردید. ترکیب شیمیایی اسانس پونه کوهی و عصاره اتانولی برەموم براساس روش Khatibi و همکاران (۲۰۱۵) و به کمک دستگاه GC/MS (Gas Chromatogeraphy/ Mass Spectrometery) اندازه‌گیری شد (۱۴). دستگاه GC/MS مورد استفاده مجهز به ستون مویینه به طول ۳۰ m متر و قطر ۰/۲۵ mm بود. برنامه ریزی حرارتی ستون از ۵۰ °C شروع و با سرعت ۵ °C/min تا دمای ۲۴۰ °C افزایش یافت. از گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل (با سرعت ۱ mm/min) در طول ستون استفاده شد. برای هر یک از اجزا اسانس و عصاره یک الگوی شکست خاص وجود دارد که براساس اطلاعات بدست آمده از این طریق و همچنین اطلاعات ثبت شده در کتب مرجع، شناسایی ترکیبات اصلی اسانس پونه و عصاره برەموم صورت گرفت (۱۵).

آماده‌سازی فیلم‌ها

مراحل تولید فیلم‌های فعال و تعیین ویژگی‌های فیزیکی آنها به ترتیب در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و آزمایشگاه گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انجام شدند. تهیه فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید طبق روش Abdulkhani و همکاران (۲۰۱۴) و به کمک روش قالب‌گیری صورت گرفت (۱۶). گرانول‌های پلی‌لاکتیک اسید به نسبت (g) ۱ به (mL) ۱۰۰ کلروفرم اضافه شدند و جهت حل شدن کامل گرانول‌ها در کلروفرم مخلوط حاصل به کمک استیرر به مدت ۸ h همزده شد. برای ارتقاء فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید به فیلم‌های فعال ضد میکروب، اسانس پونه کوهی به نسبت ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰ mL و عصاره اتانولی برەموم هم به نسبت ۰، ۱ و ۲ mL به ۱۰۰ mL از محلول پلی‌لاکتیک اسید در کلروفرم اضافه شدند. غلظت‌های فوق الذکر براساس مطالعات قبلی و آزمون پایلوت انتخاب شدند (۱۷). پس از اضافه شدن غلظت‌های مختلف مواد فعال، مخلوط‌های حاصل به کمک هموژنایزر به مدت ۲ min در دور ۸۰۰۰ (دور در دقیقه) به خوبی هموژن شدند. در مرحله بعدی، هر یک از مخلوط‌های بدست آمده درون پلیت‌های شیشه‌ای با عمق ۱۵ mm و قطر ۱۰۰ mm ریخته و برای تبخیر حلال به مدت ۲۴ h در هود شیمیایی قرار داده شدند. پس از تبخیر کلروفرم، فیلم‌های تشکیل شده از سطح پلیت‌ها جدا و در ابعاد دایره‌های ۹ mm بریده شدند.

اندازه‌گیری ضخامت و رنگ‌سنجی فیلم‌ها

ضخامت فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید با استفاده از یک میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ mm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و برای هر نمونه فیلم ۱۰ نقطه اندازه‌گیری و میانگین آنها گزارش شد (۱۵).

تعیین رنگ فیلم‌ها با اندازه‌گیری L^* (روشنایی: از ۰ نشان‌دهنده سیاهی تا ۱۰۰ نشان‌دهنده سفیدی)، a^* (قرمزی: از ۸۰- نشان دهنده سبز بودن تا ۱۰۰ نشان دهنده قرمز بودن) و b^* (زردی: از ۸۰- نشان دهنده آبی بودن تا ۷۰ نشان دهنده زرد بودن) و به کمک یک رنگ‌سنج انجام گرفت. یک صفحه سفید رنگ استاندارد (L^*: ۹۳/۴۹، a^*: ۰/۲۵-، b^*: ۰/۰۹-) برای کالیبراسیون رنگ‌سنج مورد استفاده قرار گرفت. این آزمون در مورد هر نمونه فیلم سه بار تکرار شد و میانگین مقادیر بدست آمده گزارش شد (۱۵).

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌ها

چهـار باکتری پاتوژن رایج در مواد غذایی جهت بررسـی اثرات ضد باکتریایی فیلم‌ها مورد اسـتفاده قرار گرفتند که شـامل دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) و لیسـتریا مونوسایتوژنز (ATCC ۱۹۱۱۱)، و دو باکتری گرم منفـی ویبریو پاراهمولیتیکوس (ATCC ۴۳۹۹۶) و اشرشـیا کلـی (ATCC ۴۳۹۹۶) بودند. تمامی سـوش‌های مذکور از آزمایشـگاه بهداشت مواد غذایی دانشـکده دامپزشکی دانشگاه تهران تامین شده و ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های فعال نیـز در همان آزمایشـگاه صورت گرفت. از محیط کشـت آگار قلـب و مغـز (Brain Heart Infusion) برای آماده‌سـازی کشـت‌های اسـتوک باکتری‌های مورد مطالعـه و در زمان یک شـب قبل از انجـام آزمون‌های اصلی در دمـای ۳۷ °C بهره گرفته شد. جهت آماده سازی میزان تلقیح سویه‌های باکتریایی، باکتری‌های مورد نظر به لوله‌های حاوی محیط آبگوشـت قلب و مغز منتقل شـدند (محیط کشـت ذکر شـده بـرای ویبریو پاراهمولیتیکوس حاوی ۱/۵ درصد کلرید سـدیم بود) و بعد از ۱۸ h گرمخانه‌گـذاری در دمای ۳۵ °C (زمان گرمخانه‌گذاری بـرای ویبریـو پاراهمولیتیکـوس ۶ h بود) از سوسپانسـیون باکتریایـی حاصل در داخل کووت اسـتریل بـه میزانی ریخته شـد تا تراکم باکتریایی حدود ۱۰۸ × ۱ واحد تشـکیل دهنده کلنی در هر mL با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ nm حاصل شود. برای تخمین تعداد سلول‌های باکتریایی در سوسپانسـیون‌ها، از محیط کشـت آگار قلب و مغز استفاده شد.

ارزیابـی فعالیـت ضدمیکروبی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسـید به کمک روش انتشار از دیسک به آگار انجام گرفت (۱۸). به طور خلاصه، ابتدا از هرکدام از سوسپاسیون‌های باکتریایی ۱۰۰ µL (حاوی ۱۰۷ × ۱ واحد تشـکیل دهنده کلنی) به سطح محیط مولـر هینتـون آگار (Muller Hinton Agar) انتقال داده شـد و بعد از ۲۴ h گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ °C، دیسـک فیلم‌ها بر روی محیط کشـت قرار داده شـد. فیلم پلی‌لاکتیک اسید خالص به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و با کمک کالیپر قطر هاله عدم رشـد تشـکیل شـده در اطراف دیسـک فیلم‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تجزیه تحلیل آماری

از نرم افـزار SPSS. 16 برای انجام آنالیز آماری نتایج و از آنالیز واریانـس یک طرفـه (ANOVA) به همـراه آزمون Tukey برای مقایسـه داده‌ها استفاده شد. در این مطالعه از لحاظ آماری اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

ترکیب شیمیایی اسانس پونه کوهی و عصاره بره‌موم

آنالیز ترکیب شـیمیایی اسـانس پونه کوهی نشان داد که اجزا اصلی آن عبارت است از ۲۲/۶۷ درصد پولگون (Pulegone)، ۹/۳۴ درصـد پیپریتنون اکسـید (Piperitenone oxide)، ۸/۴۷ درصـد اوکالیپتول و ۸/۰۴ درصد تیمول. اجزاء اساسـی عصاره اتانولی بره‌موم نیز شـامل ۱۸/۵ درصـد پرنیل کافیات، ۱۰/۵ درصد پینوبانکسـین استات، ۴/۳۵ درصد پینوبانکسین و ۷/۴۵ درصد ساکورانتین بود.

ضخامت و رنگ‌سنجی فیلم‌ها

جدول ۱ تاثیر اضافه شدن ترکیبات فعال مورد مطالعه بر تغییرات رنگی و ضخامت فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسـید را نشـان می‌دهد. ضخامـت فیلـم خالص پلی لاکتیـک اسـید ۰/۰۳ mm بود و همان‌طور که مشخص اسـت با اضافه شدن غلظت‌های مختلف بره‌موم و اسـانس پونه کوهی، ضخامت فیلم‌های حاصل بصورت معنـی‌داری افزایش یافت ($p < ۰/۰۵$). از طرف دیگر به اسـتثنا غلظت ۱۰ درصد اسـانس، این افزایش ضخامت بصورت وابسته به غلظت بود و بیشـترین ضخامت در رابطه با فیلم شـماره ۹ با ۵ درصد اسانس و ۲ درصد بره‌موم با قطر ۰/۲۲ mm ثبت شد.

برای ارزیابی ویژگی‌های ظاهری فیلم‌های فعال، سه فاکتور L*، a* و b* مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند که نتایج نشـان دهنده تاثیـر معنی‌دار حضور بره‌موم (در هـر دو غلظت ۱ و ۲ درصد) و اسـانس (در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد) بر سه فاکتور مذکور بودند ($p < ۰/۰۵$). بیشـترین روشنایی با مقدار ۸۹/۸۴ مربوط به فیلم پلی‌لاکتیک اسـید خالص بود که با اضافه شدن اسانس

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

و عصاره از میزان آن کاسته و در نهایت در رابطه با فیلم حاوی بیشـترین مقادیر ترکیبات فعال (۱۰ درصد اسانس و ۲ درصد برەموم)، کمترین مقدار *L با میزان ۶۷/۱۶ ثبت شـد. الگوی تغییرات دو فاکتور *a و *b تقریبا مشابه با هم بود، به صورتی کـه با اضافه شـدن هر دو ترکیب فعال مقـدار زردی و قرمزی فیلم‌هـا افزایش پیدا کرد که در مورد حضور عصاره برەموم این افزایش شـدیدتر بود. مقدار ثبت شده *a و *b در مورد فیلم خالص ۰/۱۵ و ۱/۸۸ بود که نشان دهنده قرمزی و زردی کمتر این فیلم در مقایسه با تمامی فیلم‌های فعال تولید شده بود.

ویژگی‌های ضدمیکروبی فیلم‌ها

جدول ۲ اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید تولیدی را علیـه ۴ سـویه باکتری بیماریزا نشـان می‌دهد. همانطور که مشخص است، هیچ یک از فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید خالص و یا به همراه غلظت‌های مختلف عصاره برەموم، اثر ضدباکتریایی از خـود بجـای نگذاشـتند. از طرف دیگر، حضـور غلظت‌های بالاتر از اسـانس پونه کوهی (۵ و ۱۰ درصد) در ساختار فیلم‌ها موجب مهار رشـد تمامی باکتری‌های مـورد مطالعه به صورت وابسـته به غلظت اسانس شد. همچنین باکتری‌های گرم مثبت (اسـتافیلوکوکوس اورئوس و لیسـتریا مونوسـایتوژنز) در برابر اثرات ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس حساسیت بیشتری داشـتند ($p < ۰/۰۵$)، فیلم حاوی غلظت پایین‌تر اسانس (۲/۵ درصـد) و غلظت ۲ درصـد عصاره برەموم توانسـت در محیط کشت استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسایتوژنز ۱۹/۵۴ و ۲۱/۴۵ mm هاله عدم رشـد ایجـاد نماید و درحالی‌که قادر به اثرگذاری بر دو سـویه گرم منفـی دیگر نبود. از طرف دیگر، هاله‌ی عدم رشـد تشـکیل شـده در اطراف دیسک‌های حاوی غلظت‌های بالای اسانس (۵ و ۱۰ درصد) در محیط کشت‌های سـویه‌های گرم مثبت مورد مطالعه بصورت معنی داری بزرگتر از هاله‌های تشـکیل شـده در محیط‌های حاوی سویه‌های گرم منفی بودند ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۱- ضخامت و ویژگی‌های رنگی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید تولیدی[۱]

نمونه فیلم	ترکیبات فعال موجود در فیلم‌ها (درصد)		ضخامت (mm)	شاخص‌های رنگ		
	اسانس پونه کوهی	عصاره اتانولی برەموم		L*	a*	b*
فیلم شماره ۱	۰	۰	$۰/۰۳ \pm ۰/۰۰۵۸^{a}$	$۸۹/۸۴ \pm ۱/۲۹^{i}$	$۰/۱۵ \pm ۰/۰۴^{a}$	$۱/۸۸ \pm ۰/۴۰^{a}$
فیلم شماره ۲	۰	۱	$۰/۰۵ \pm ۰/۰۰۵۷^{bc}$	$۷۸/۱۰ \pm ۰/۸۸^{efg}$	$۰/۷۲ \pm ۰/۰۵^{b}$	$۱۴/۹۸ \pm ۰/۴۸^{f}$
فیلم شماره ۳	۰	۲	$۰/۰۶ \pm ۰/۰۰۳۷^{bc}$	$۷۶/۴۹ \pm ۱/۲۱^{cdef}$	$۱/۸۵ \pm ۰/۰۵^{f}$	$۲۹/۰۸ \pm ۰/۷۱^{h}$
فیلم شماره ۴	۲/۵	۰	$۰/۰۶ \pm ۰/۰۰۵۲^{bc}$	$۸۰/۰۱ \pm ۰/۶۴^{fgh}$	$۰/۳۵ \pm ۰/۰۵^{a}$	$۹/۲۵ \pm ۰/۶۰^{de}$
فیلم شماره ۵	۲/۵	۱	$۰/۰۷ \pm ۰/۰۰۳۹^{c}$	$۷۷/۶۰ \pm ۱/۷۶^{defg}$	$۱/۰۲ \pm ۰/۰۶^{d}$	$۱۶/۲۴ \pm ۰/۴۳^{fg}$
فیلم شماره ۶	۲/۵	۲	$۰/۱۰ \pm ۰/۰۰۴۵^{de}$	$۷۳/۴۸ \pm ۱/۴۵^{bcd}$	$۲/۱۸ \pm ۰/۰۴^{g}$	$۲۹/۴۰ \pm ۰۸۱^{h}$
فیلم شماره ۷	۵	۰	$۰/۱۰ \pm ۰/۰۰۴۸^{de}$	$۷۹/۶۴ \pm ۱/۱۴^{fgh}$	$۰/۷۵ \pm ۰/۰۷^{bc}$	$۱۱/۸۹ \pm ۰/۵۶^{e}$
فیلم شماره ۸	۵	۱	$۰/۱۸ \pm ۰/۰۰۵۶^{g}$	$۷۳/۰۹ \pm ۰/۵۴^{bc}$	$۳/۵۶ \pm ۰/۰۴^{h}$	$۳۴/۹۹ \pm ۰/۳۶^{i}$
فیلم شماره ۹	۵	۲	$۰/۲۲ \pm ۰/۰۰۶^{h}$	$۷۲/۷۹ \pm ۱/۳۱^{bc}$	$۸/۱۰ \pm ۰/۰۷^{i}$	$۴۶/۱۹ \pm ۰/۴۴^{j}$
فیلم شماره ۱۰	۱۰	۰	$۰/۰۷ \pm ۰/۰۰۴۱^{c}$	$۷۱/۲۰ \pm ۰/۵۲^{ab}$	$۰/۳۳ \pm ۰/۰۵^{a}$	$۷/۲۹ \pm ۰/۶۵^{cd}$
فیلم شماره ۱۱	۱۰	۱	$۰/۱۲ \pm ۰/۰۰۳۶^{ef}$	$۶۸/۱۶ \pm ۰/۶۳^{a}$	$۰/۹۴ \pm ۰/۰۷^{cd}$	$۱۸/۶۸ \pm ۰/۹۴^{g}$
فیلم شماره ۱۲	۱۰	۲	$۰/۱۳ \pm ۰/۰۰۵۹^{f}$	$۶۷/۱۶ \pm ۰/۸۶^{a}$	$۱/۳۹ \pm ۰/۰۶^{e}$	$۱۸/۶۸ \pm ۰/۷۸^{g}$

[۱] انحراف معیار ± میانگین سه تکرار

[a-i] حروف کوچک لاتین متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$)

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

جدول ۲- فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید علیه چهار پاتوژن منتخب در دمای ۳۷ °C با روش انتشار از دیسک

نمونه فیلم	ترکیبات فعال موجود در فیلم‌ها (درصد)		قطر هاله عدم رشد (mm) *			
	اسانس پونه کوهی	عصاره اتانولی برەموم	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشرشیا کلی*	*ویبریو پاراهمولیتیکوس*	*لیستریا مونوسایتوژنز*
فیلم شماره ۱	۰	۰	-	-	-	-
فیلم شماره ۲	۰	۱	-	-	-	-
فیلم شماره ۳	۰	۲	-	-	-	-
فیلم شماره ۴	۲/۵	۰	-	-	-	۱۷/۴۹ ± ۰/۶۹^{a}
فیلم شماره ۵	۲/۵	۱	-	-	-	۲۰/۶۴ ± ۰/۹۱^{b}
فیلم شماره ۶	۲/۵	۲	۱۹/۵۴ ± ۰/۷۷^{a}	-	-	۲۱/۴۵ ± ۰/۶۳^{b}
فیلم شماره ۷	۵	۰	۵۰/۸۱ ± ۱/۱۵^{b}	۱۳/۴۲ ± ۰/۵۹^{a}	۱۱/۶۹ ± ۰/۹۷^{a}	۲۸/۵۹ ± ۰/۸۳^{c}
فیلم شماره ۸	۵	۱	۵۱/۵۷ ± ۰/۸۱^{b}	۱۴/۵۲ ± ۰/۷۴^{ab}	۱۲/۳۵ ± ۰/۵۰^{a}	۳۰/۴۱ ± ۰/۵۷^{c}
فیلم شماره ۹	۵	۲	۵۲/۹۷ ± ۱/۳۷^{bc}	۱۵/۴۷ ± ۰/۶۷^{bc}	۱۲/۵۷ ± ۰/۸۰^{a}	۳۲/۴۲ ± ۰/۵۹^{d}
فیلم شماره ۱۰	۱۰	۰	۵۲/۵۶ ± ۰/۹۲^{bc}	۱۶/۲۹ ± ۰/۴۱^{cd}	۱۷/۵۰ ± ۰/۷۱^{b}	۴۰/۴۱ ± ۰/۵۸^{e}
فیلم شماره ۱۱	۱۰	۱	۵۴/۴۷ ± ۰/۶۷^{cd}	۱۶/۹۴ ± ۰/۹۱^{cde}	۱۷/۹۴ ± ۰/۹۰^{b}	۴۲/۳۶ ± ۰/۵۲^{f}
فیلم شماره ۱۲	۱۰	۲	۵۶/۶۶ ± ۰/۹۳^{d}	۱۷/۶۵ ± ۰/۹۱^{de}	۱۷/۹۱ ± ۰/۴۳^{b}	۴۵/۴۶ ± ۰/۶۵^{g}

- : هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک‌ها دیده نشد

* انحراف معیار ± میانگین سه تکرار

$^{a-g}$ حروف کوچک لاتین متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$)

با وجود اینکه حضور برەموم به تنهایی فاقد اثر بود، اما ترکیب آن با اسانس پونه کوهی باعث افزایش فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های مربوطه شد و بیشترین هاله عدم رشد هم در مورد فیلم شماره ۱۲ (حاوی ۱۰ درصد اسانس و ۲ درصد برەموم) ثبت شد که مقادیر آن به ترتیب ۵۶/۶۶، ۴۵/۴۶، ۱۷/۹۱ و ۱۷/۶۵ mm در مورد استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوژنز، ویبریو پاراهمولیتیکوس و اشرشیا کلی بودند.

بحث

ضخامت و رنگ‌سنجی فیلم‌ها

ویژگی‌های ظاهری و کیفیت رنگی فیلم‌های بسته‌بندی مواد غذایی از کلیدی‌ترین فاکتورهایی هستند که در صورتی که یک فیلم فعال بسته‌بندی در عین داشتن ویژگی‌های مکانیکی و فعالیت مناسب، اگر وضعیت ظاهری نامطلوبی داشته باشد، قابلیت تجاری شدن را از دست می‌دهد. با توجه به اینکه فیلم خالص پلی‌لاکتیک اسید ویژگی‌های ظاهری مطلوبی دارد، اختلاف رنگ ایجاد شده در پارامترهای رنگی مورد مطالعه بین فیلم‌های فعال تولیدی و فیلم خالص نکته‌ای منفی محسوب می‌شود که در طراحی فیلم‌های بسته‌بندی بایستی آن را در نظر داشت و در حد امکان به حداقل رساند.

ادغام ترکیبات فعال به درون ساختار فیلم‌های شفاف از جمله پلی‌لاکتیک اسید و تاثیر آن بر ویژگی‌های ظاهری فیلم‌های حاصل در مطالعات گذشته مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در یک مطالعه Dias و همکاران (۲۰۱۳) غلظت‌های مختلف (۵ و ۱۰ mL در ۱۰۰ g) از اسانس لیمو را به کمک روش اکستروژن به فیلم پلی اتیلن اضافه نمودند و تاثیر این ترکیبات را بر ویژگی‌های رنگی فیلم‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که اضافه شدن اسانس لیمو موجب افزایش معنی‌دار کدورت و زردی (b^*) فیلم‌های تولیدی در مقایسه با فیلم خالص پلی اتیلن گردید ($p<۰/۰۵$)، به صورتی‌که به

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

ترتیب ۴ درصد و ۲۱ درصد افزایش در شاخص‌های کدورت و زردی فیلم‌های حاوی ۱۰ درصد اسانس لیمو گزارش شد (۱۰). Marcos و همکاران (۲۰۱۴) به کمک آلفا توکفرول و عصاره برگ درخت زیتون فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر بر پایه پلی‌لاکتیک اسید با خواص آنتی اکسیدان تولید نمودند (۱۹). آنها نیز مشابه با نتایج مطالعه حاضر اشاره کردند که هر دو ترکیب آنتی اکسیدان باعث افزایش روشنایی، زردی و قرمزی فیلم‌های فعال شدند، با این تفاوت که تاثیر عصاره برگ گیاه زیتون بیشتر از آلفا توکفرول بوده است. اثر اضافه شدن اسانس پونه کوهی بر کیفیت رنگی کامپوزیت‌های پلی لاکتیک اسید/ پلی‌تریمنتیلن کربنات توسط Liu و همکاران (۲۰۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌های مطالعه مذکور نشان دادند که در حالی‌که تفاوت بین شاخص روشنایی فیلم‌های تولیدی با غلظت‌های مختلف اسانس معنی‌دار بود ($p<0/05$)، اما این اختلاف‌ها بصورت وابسته به غلظت اسانس نبوده است. مقدار فاکتور *b نیز در این مطالعه همراه با افزایش اسانس افزایش یافته است (در غلظت‌های ۶ و ۹ درصد جرمی) اما بر خلاف مطالعه حاضر، حضور اسانس پونه کوهی تغییر معنی‌داری در مقادیر فاکتور قرمزی-سبزی (*a) کامپوزیت‌ها ایجاد نکرد ($p<0/05$) (۲۰). تنها استثنا در نتایج مربوط به فیلم‌های مذکور، فیلم حاوی بیشترین درصد از اسانس پونه کوهی بود (۱۲ درصد جرمی) که در این مورد تغییری در رابطه با شاخص زردی صورت نگرفت و میزان شاخص قرمزی نیز بر خلاف سایرین کاهش یافته بود.

در رابطه با ضخامت فیلم‌های حاوی بالاترین غلظت اسانس پونه، احتمالا به دلیل بالا بودن نسبت غلظت اسانس به غلظت پلی‌مر پلی لاکتیک اسید و همچنین ناکافی بودن هموژنیزاسیون مخلوط حاصل، توزیع اسانس در ساختار فیلم‌ها یکنواخت نبوده و ضخامت فیلم‌های مربوطه کمتر از انتظار ثبت شدند.

ویژگی ضدباکتریایی فیلم‌ها

استفاده از روش انتشار از دیسک به دلیل توانایی این روش در شبیه‌سازی بسته‌بندی مواد غذایی و کمی بودن روش (۲۱)، بیشتر برای ارزیابی فعالیت فیلم‌های فعال مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در واقع در این روش فیلم ضدمیکروب بواسطه آزادسازی ترکیبات فعال از فیلم در محیط کشت اثر خود را گذاشته و مورد سنجش قرار می‌گیرد. اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی علیه انواع میکروارگانیسم‌ها بویژه باکتری‌های گرم مثبت بارها مورد تاکید قرار گرفته است. در واقع وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی در اطراف سلول باکتری‌های گرم منفی آنها را نسبت به نفوذ اسانس‌های آبگریز و در ادامه به اثرات بازدارندگی آنها مقاوم‌تر می‌کند (۲۲). وجود ترکیبات فنولیک و مونوترپن‌ها مانند تیمول و 1/8-cineole در ترکیب شیمیایی اسانس پونه کوهی عامل اثرات ضدمیکروبی آنها هستند که در مطالعات گذشته نیز به این ارتباط متناوبا اشاره شده است (۲۴-۲۲). بطور خلاصه اثرات ضد باکتری اسانس‌ها را به مکانیسم‌هایی مانند آسیب به دیواره سلولی، اختلال در دو لایه فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی و آسیب به پروتئین‌های غشایی که در نهایت منجر به افزایش نفوذپذیری و از دست رفتن محتوای سلولی باکتری‌ها می‌شوند، نسبت می‌دهند (۹).

مطالعات زیادی برای بررسی میزان فعالیت فیلم‌های بسته‌بندی فعال در شرایط آزمایشگاهی و همچنین در مواد غذایی انجام شده است. اولویت این مطالعات عمدتا استفاده از ترکیبات طبیعی بوده است که در این راستا کاربرد ترکیباتی مانند عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و همچنین مواد فعال دیگری مانند بره‌موم مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در یک مطالعه عصاره برگ درخت زیتون به‌عنوان ماده ضدمیکروب به فیلم پلی‌لاکتیک اسید افزوده شد و فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های به دست آمده علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و با کمک روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸). افزایش میزان عصاره برگ گیاه زیتون در فیلم‌ها از ۰/۹ mg به ۵/۴ mg در هر دیسک، موجب یک افزایش معنی‌دار در هاله عدم رشد باکتری از ۹/۱ mm به ۱۶/۲۰ گردید ($p<0/05$). Javidi و همکاران (۲۰۱۶) نیز اسانس پونه کوهی را جهت تولید فیلم بسته‌بندی برای افزایش ماندگاری قزل آلای رنگین کمان، به میزان ۱/۵ درصد جرمی به پلی‌مر پلی‌لاکتیک اسید اضافه نمودند (۲۵). آنها اشاره کردند که

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

فیلم مذکور رشد گروه‌های باکتریایی شامل باکتری‌های هوازی عمومی، تولید کننده اسید لاکتیک، سرماگراها و آنتروباکتریاسه را در نمونه‌های ماهی کاهش داد. علاوه بر این آنها اشاره کردند که اضافه شدن ۱/۵ درصد جرمی از اسانس به فیلم‌ها باعث بوجود آمدن هاله عدم رشد با قطر mm ۳۰ در محیط کشت استاف اورئوس شد که تقریبا نزدیک به عدد گزارش شده در این مطالعه (mm ۱۹/۵۴) در مورد فیلم حاوی ۲/۵ درصد اسانس و ۲ درصد عصاره برەموم و در محیط کشت باکتری مذکور است.

گزارش‌های دیگری نیز از کاربرد موفقیت آمیز مواد مختلف ضدمیکروبی در ترکیب با انواع پلی‌مرهای بسته‌بندی وجود دارند که از جمله می‌توان به ترکیب تیمول و کارواکرول با پلی‌پروپیلن (۲۶)، اسانس پونه کوهی با پلی اتیلن ترفتالات و پلی‌پروپیلن (۲۷)، پدیوسین با پلی‌لاکتیک اسید (۲۸) و اسانس آویشن شیرازی با پلی‌لاکتیک اسید (۱۵)، اشاره نمود. عصاره برەموم نیز به‌عنوان ماده فعال ضدمیکروب در ترکیب با مواد بسته‌بندی مورد مطالعه قرار گرفته است. Bodini و همکاران (۲۰۱۳) فیلم‌های بر پایه ژلاتین آبدوست حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی برەموم (۰، ۵، ۴۰ و g ۲۰۰ همراه با g ۱۰۰ ژلاتین) تولید کردند و فعالیت ضدمیکروبی آنها را مورد بررسی قرار دادند (۱۳). نتایج آنها نشان دهنده موثر بودن غلظت‌های ۴۰ و g ۲۰۰ عصاره همراه با g ۱۰۰ ژلاتین علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. در این رابطه فیلم‌های حاوی ۴۰ و ۲۰۰ درصد عصاره اتانولی برەموم در روز اول نگهداری به ترتیب توانستند هاله عدم رشد به قطر ۲۳ و mm ۲۶/۵ ایجاد کنند. بنابراین، با توجه به اینکه غلظت‌های به کار رفته در مطالعه مذکور ۲۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از غلظت‌های به کار رفته در مطالعه حاضر است، تشکیل نشدن هاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه در اطراف فیلم‌های پلی‌لاتیک اسید حاوی تنها عصاره برەموم (۱ و ۲ درصد) در این مطالعه قابل توجیه است.

همچنین با وجود ترکیبات فعال ضدمیکروبی در ترکیب شیمیایی عصاره برەموم، عدم تاثیرگذاری این ماده در فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید در این مطالعه احتمالا به آبدوست بودن عصاره اتانولی و طبیعت آبگریز پلی‌مر پلی‌لاکتیک اسید هم مرتبط بوده است، جایی‌که ماده فعال بخوبی در ساختار فیلم آبگریز وارد نمی‌شود تا بتواند اثرگذار باشد. از طرف دیگر اثرات سینرژیستیک ضدباکتریایی بین اسانس پونه کوهی و عصاره برەموم نیز می‌تواند به آبگریز بودن اسانس و کمک احتمالی این ماده به عصاره برای ورود به ساختار فیلم‌ها ارتباط داشته باشد، که در مطالعات قبلی نیز این پدیده گزارش شده است (۲۸). در مطالعات گذشته نیز به اثرات قوی و موثر ترکیب عصاره اتانولی برەموم با اسانس‌های گیاهی مانند میخک، نعناع فلفلی، دارچین، آویشن شیرازی و کاکوتی علیه باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی اشاره شده است (۵، ۱۵، ۱۷). ذکر این نکته نیز حائز اهمیت است که با توجه به قیمت نسبتا بالای اسانس‌های گیاهی، بایستی در تولید ترکیبات تجاری بر پایه اسانس‌های گیاهی مسائل اقتصادی را هم در نظر داشت. فیلم‌های ضدمیکروبی تولیدی در این مطالعه نیز زمانی اثرات مطلوبی از خود نشان دادند که حاوی نسبت بالایی از اسانس و عصاره بودند که نیاز است تمرکز تحقیقات آینده در جهت بر طرف نمودن این ضعف باشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، حضور هر دو ترکیب فعال در درون ساختار پلی‌لاکتیک اسید باعث افت کیفیت ظاهری فیلم‌های حاصل شد، البته تاثیر اسانس پونه کوهی بر افت کیفیت ظاهری کمتر بود. ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها هم حاکی از آن بود که فیلم‌های حاوی درصدهای بالاتر اسانس پونه کوهی (۵ و ۱۰ درصد) علیه هر ۴ سویه پاتوژن مورد مطالعه موثر بودند، در حالی‌که سویه‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری از سویه‌های گرم منفی داشتند. از طرف دیگر، عصاره اتانولی برەموم تنها در صورت ترکیب با اسانس قادر به مهار رشد باکتری‌ها بود. در مجموع براساس نتایج این مطالعه، اسانس پونه کوهی می‌تواند به‌عنوان ماده ضدمیکروب جهت استفاده در بسته‌بندی‌های فعال مواد غذایی به‌خصوص در ترکیب با پلی‌مرهای آبگریز رایج مطرح باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شـامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه با عنوان "مطالعه اثر ضد میکروبی فیلم‌هـای بـر پایه PLA حـاوی غلظت‌های مختلف اسـانس پونـه کوهی و عصـاره اتانولی بره‌موم بر برخـی از باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد" در مقطع دکتری حرفه‌ای در سـال ۱۳۹۵ اسـت که با حمایت دانشـکده دامپزشکی دانشـگاه تهران اجرا شده است.

References

1. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012;17:3989-4006.
2. Rodriguez-Garcia I, Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramirez LA, Leyva JM, Siddiqui MW, Cruz-Valenzuela MR, et al. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2016;56:1717-27.
3. Karabagias I, Badeka A, Kontominas MG. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. Meat Science. 2011;88:109-16.
4. Maurício J, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology. 2011;133:253-60.
5. Probst I, Sforcin J, Rall V, Fernandes A, Fernandes Júnior A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2011;17:159-67.
6. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of Ethnopharmacology. 2007;113:278-83.
7. Bryan J, Redden P, Traba C. The mechanism of action of russian propolis ethanol extracts against two antibiotic resistant biofilm forming bacteria. Letters in Applied Microbiology. 2015;62:192-98.
8. Yadegarinia D, Gachkar L, Bagher M, Taghizadeh M. Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. Phytochemistry. 2006;67:1249-55.
9. Jayasena DD, Jo C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. Trends in Food Science & Technology. 2013;34:96-108.
10. Dias MV, de Medeiros HS, Soares NdFF, Melo NRd, Borges SV, Carneiro JdDS, et al. Development of low-density polyethylene films with lemon aroma. LWT - Food Science and Technology. 2013;50(1):167-71.
11. Molaee Aghaee E, Kamkar A, Akhondzadeh Basti A, Khanjari A, Kontominas MG. Effect of packaging with Chitosan biodegradable films formulated

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

with Garlic essential oil (Allium sativum L.) on the chemical properties of chicken fillet. Iranian Journal of Health and Environment. 2015;8:379-90 (in Persian).

12. Jamshidian M, Tehrany EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly-lactic acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2010;9:552-71.
13. Bodini RB, Sobral PJA, Favaro-Trindade CS, Carvalho RA. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. LWT - Food Science and Technology. 2013;51:104-10.
14. Khatibi SA, Misaghi A, Moosavy MH, Amoabediny G, Basti AA. Effect of preparation methods on the properties of Zataria multiflora boiss. Essential oil loaded nanoliposomes: Characterization of size, encapsulation efficiency and stability. Pharmaceutical Sciences. 2015;20:141-48.
15. Rezaeigolestani M, Misaghi A, Khanjari A, Basti AA, Abdulkhani A, Fayazfar S. Antimicrobial evaluation of novel poly-lactic acid based nanocomposites incorporated with bioactive compounds in-vitro and in refrigerated vacuum-packed cooked sausages. International Journal of Food Microbiology. 2017;260:1-10.
16. Abdulkhani A, Hosseinzadeh J, Ashori A, Dadashi S, Takzare Z. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. Polymer Testing. 2014;35:73-79.
17. Shavisi N, Khanjari A, Basti AA, Misaghi A, Shahbazi Y. Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and Ziziphora clinopodioides essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. Meat Science. 2017;124:95-104.
18. Özge Erdohan Z, Çam B, Turhan KN. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. Journal of Food Engineering. 2013;119:308-15.
19. Marcos B, Sárraga C, Castellari M, Kappen F, Schennink G, Arnau J, et al. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on polyesters containing α-tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications. Food Packaging and Shelf Life. 2014;1:140-50.
20. Liu D, Li H, Jiang L, Chuan Y, Yuan M, Chen H. Characterization of active packaging films made from poly(lactic acid)/poly(trimethylene carbonate) incorporated with Oregano essential oil. Molecules. 2016;21(6).
21. Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2002;3(2):113-26.
22. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. International Journal of Food Microbiology. 2004;94:223-53.
23. Van Haute S, Raes K, Van der Meeren P, Sampers I. The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. Food Control. 2016;68:30-39.
24. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (Origanum vulgare) extracts and essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013;93:2707-14.
25. Javidi Z, Hosseini SF, Rezaei M. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. LWT - Food Science and Technology. 2016;72:251-60.
26. Ramos M, Jiménez A, Peltzer M, Garrigós MC. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. Journal of Food Engineering. 2012;109:513-19.
27. Otero V, Becerril R, Santos Ja, Rodríguez-Calleja JM, Nerín C, García-López M-L. Evaluation of two antimicrobial packaging films against Escherichia coli O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). Food Control. 2014;42:296-302.
28. Woraprayote W, Kingcha Y, Amonphanpokin P,

Archive of SID

www.SID.ir

Kruenate J, Zendo T, Sonomoto K, et al. Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork. International Journal of Food Microbiology. 2013;167:229-35.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Available online: http://ijhe.tums.ac.ir

Original Article

Study of effect of oregano essential oil and ethanolic extract of propolis on antibacterial properties and some physical characteristics of biodegradable poly-lactic acid films

A Misaghi*, M Saeedi, N Noori, MR Rezaeigolestani
Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 13 December 2017
Revised: 5 March 2018
Accepted: 10 March 2018
Published: 20 June 2018

Keywords: Oregano essential oil, Food packaging, Poly lactic acid, Propolis, Foodborne pathogens

***Corresponding Author:**
amisaghi@ut.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objective: Natural antimicrobial compounds have a valuable capacity to be used in a variety of foods to inhibit growth of foodborne pathogens and spoilage bacteria. The aims of this study were to produce active biodegradable films by incorporation of different percentage of oregano essential oil (OEO) and ethanolic extract of propolis (EEP) into poly-lactic acid (PLA) films, and to evaluate physical and antimicrobial properties of the resulting films.

Materials and Methods: The active films were produced by solvent casting method, and their thickness and major color parameters were measured using a digital micrometer and a colorimeter instrument, respectively. Afterwards, antibacterial effects of the films were assessed against four common foodborne pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*, by means of disk diffusion test.

Results: Physical examinations showed that thickness of resultant films significantly was increased ($p<0.05$) by addition of different concentrations of active agents. Additionally, the presence of them in the structure of films decreased the lightness and increased the redness and yellowness, simultaneously. While none of the neat PLA film or films with just EEP had no antibacterial effect, all films containing higher percentages of OEO (5 and 10%) were effective against all four tested bacterial strains, and these effects were more significant in case of the gram-positive bacteria. The maximum inhibition zone was recorded for the film containing 10% of OEO and 2% of EEP, which the relevant values were 56.66, 45.46, 17.91 and 17.65 mm for *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*, respectively.

Conclusion: Based on the findings of this study, the presence of just EEP in the initial formulation of poly-lactic acid films was not effective against the four tested foodborne pathogens, while the addition of this compound to the films containing OEO increased the effective antibacterial properties of the resulting films. As a result, the simultaneous use of these two compounds in the structure of hydrophobic films, such as poly-lactic acid film, can be used to produce active food packaging films.

Please cite this article as: Misaghi A, Saeedi M, Noori N, Rezaeigolestani MR. Study of effect of oregano essential oil and ethanolic extract of propolis on antibacterial properties and some physical characteristics of biodegradable poly-lactic acid films. Iranian Journal of Health and Environment. 2018;11(1):111-22.

Downloaded from ijhe.tums.ac.ir at 7:08 IRDT on Tuesday July 17th 2018

Archive of SID

www.SID.ir