

به کارگیری پوشش خوراکی (Edible Coating) حاوی عصاره الکلی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی مغز پسته

مجید جوانمرد^{۱*}، یوسف رمضان^۲

۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع شیمیایی، پژوهشگاه فناوری های نوین، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران
 ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
 *آدرس مکاتبه: تهران، میدان فردوسی، خیابان شهید موسوی (فرست) پلاک ۷۱، گروه صنایع غذایی، پژوهشکده صنایع شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، صندوق پستی: ۳۵۳۸ - ۱۵۸۱۵
 تلفن و نمابر: ۸۸۸۳۸۳۲۴ (۰۲۱)
 پست الکترونیک: javanmard@irost.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۲/۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۴

چکیده

مقدمه: بسته بندی ضد میکروبی نوعی بسته بندی فعال محسوب شده که توانایی بهبود و افزایش ماندگاری غذا را داشته و موجب سلامت میکروبی این مواد جهت مصرف کنندگان می شود. به منظور کنترل میکروارگانیسم های ناخواسته بر روی سطوح غذاها، می توان عوامل ضد میکروبی فرار و غیر فرار را در ساختار پلیمرها وارد نمود. افزودن عصاره های گیاهی و سایر عوامل ضد قارچی در ترکیب پوشش ها و فیلم های خوراکی به عنوان بسته بندی ضد میکروبی، توانایی مهار رشد قارچی بر روی پسته و عدم تولید آفات توکسین را دارا می باشند.

هدف: هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره آویشن شیرازی^۱ بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس و امکان استفاده از آن در پوشش خوراکی بر پایه کنساتره پروتئین آب پنیر در مغز پسته بوده است.

روش بررسی: اثر ضد قارچی عصاره آویشن شیرازی با بررسی مهار رشد قارچ در سطح محیط کشت انجام شد. از طریق تاثیر عصاره به طور مستقیم (روش چاهک) و هم چنین استفاده از دیسک هایی که از فیلم های پروتئین آب پنیر و حاوی رقت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۲ (میکرو لیتر در ۱۰۰ میلی لیتر محلول پوشش دهی) از عصاره تهیه شده بودند، اثرات ضد قارچی عصاره بررسی شد. جهت بررسی اثر عصاره بر روی آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته از مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ ppm عصاره در ترکیب پوشش خوراکی مغز پسته استفاده شده و میزان مهار گسترش رشد دیسک تلقیح شده حاوی کشت ۹ روزه قارچ بر روی پسته های پوشش دیده اندازه گیری شد.

نتایج: در شرایط آزمایشگاهی حداقل غلظت مهاری رشد عصاره آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس ۹۰ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره الکلی تعیین شد. عصاره الکلی آویشن شیرازی به مقدار ۲۵۰۰ ppm (غلظت ۴۸ درصد) در ترکیب پوشش پروتئین آب پنیر در مغز پسته های سترون به طور کامل از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی این مغزها جلوگیری نمود.

نتیجه گیری: با توجه به جنبه های اقتصادی اهمیت کنترل آلودگی به قارچ های مولد توکسین در مغز پسته، به کارگیری عصاره آویشن شیرازی در ترکیب پوشش های خوراکی برای کنترل رشد قارچ ها و در نهایت جلوگیری از تولید توکسین در غذاها توصیه می شود.

کل واژگان: پسته، پوشش های خوراکی ضد میکروبی، آویشن شیرازی، پروتئین آب پنیر، آسپرژیلوس فلاووس

^۱ *Zataria multiflora*



مقدمه

از روش‌های بیولوژیکی جهت کنترل تولید این سموم، به کارگیری عصاره‌های گیاهی ضدقارچی می‌باشد [۲]. در سالیان اخیر، تحقیقات بر روی بسته‌بندی مواد غذایی بیشتر بر روی فیلم‌های زیست سازگار^۱ از جمله فیلم‌های تهیه شده از پروتئین‌های خوراکی با منشأ گیاهی و حیوانی (ژئین، گلوتن گندم، سویا و بادام زمینی، آلبومین، ژلاتین، کلاژن، کازئین و پروتئین‌های آب پنیر) استوار بوده است [۱۰]. به کارگیری پوشش‌های خوراکی یک رهیافت جایگزین برای بسته‌بندی، افزایش ماندگاری و بازاریابی بیشتر و هم‌چنین رفع معطل زیست محیطی ناشی از پسماندهای مواد بسته‌بندی محسوب می‌شود. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر^۲ دارای نفوذپذیری پایین نسبت به گاز اکسیژن می‌باشند [۱۱].

بسته‌بندی ضد میکروبی^۳ نوعی بسته‌بندی فعال^۴ محسوب شده که می‌تواند ماندگاری فرآورده‌های غذایی را افزایش داده و سلامت آن‌ها را از نظر میکروبی تأمین نماید [۱۲]. این نوع بسته‌بندی باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها در بسته‌بندی و مواد غذایی می‌شود. به منظور کنترل میکروارگانیسم‌های نامطلوب در سطوح مواد غذایی مواد ضد میکروبی فرار و غیرفرار می‌توانند در داخل پلیمرهای بسته‌بندی به کار گرفته شوند.

آویشن شیرازی^۵ متعلق به خانواده Laminaceae بوده و گیاه بومی ایران می‌باشد. این گیاه به طور سنتی به عنوان طعم‌دهنده در غذا به ویژه ماست به کار گرفته می‌شود [۱۳]. ترکیب اصلی اسانس روغنی این گیاه شامل ترکیبات فنلی همانند کارواکرول^۶ و تیمول^۷ می‌باشد [۱۴]. در سالیان اخیر علاقه فزاینده‌ای جهت به کارگیری از عصاره‌های گیاهی برای بهبود ماندگاری مواد غذایی، تاخیر رشد قارچ‌ها و جلوگیری از تولید سموم قارچی به وجود آمده است. مطالعات متعددی بر روی کارایی ضدقارچی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است

پسته یکی از شناخته شده‌ترین مغزهای درختی محسوب می‌شود [۱]. گیاه پسته درختی است که به گفته‌ای بومی آسیای مرکزی و به گفته دیگر بومی آسیای غربی و آسیای صغیر شناخته شده است. در میان گونه‌های مختلف درختان پسته، تنها میوه‌ی درخت پسته معمولی خوراکی، مطبوع و خوشمزه است. سرزمین ایران قرن‌ها بدون رقیب بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته جهان بوده است ولی در حال حاضر کشورهای دیگری نیز در زمینه تولید و تجارت پسته با ایران به رقابت برخاسته‌اند. ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان پسته محسوب می‌شود [۲]. ایران در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۴۵ هزار تن از پسته را به کشورهای مختلف صادر کرده و در سال ۲۰۰۶ بیش از ۲۵۰ هزار تن از این فرآورده را تولید نموده است [۳].

آسپرژیلوس فلاووس یکی از قارچ‌های مولد آفلاتوکسین در غذای انسان و حیوانات می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده گونه‌های آسپرژیلوس از روی پوسته نرم، پوسته سخت و مغز پسته ایران جدا شده است [۴]. از مهم‌ترین قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوکسین که از پسته جدا شده‌اند می‌توان از آسپرژیلوس پارازیتیکوس^۱ و آسپرژیلوس فلاووس^۲ نام برد. این دو گونه، سموم G1، B1، B2، G2 را تولید می‌کنند [۵]. تحقیقات نشان داد که در ایران [۶،۷] و سایر کشورهای تولیدکننده پسته [۹،۸] آلودگی پسته به گونه‌های آسپرژیلوس در طول مراحل رسیدگی محصول در باغ ایجاد می‌شود. برای داشتن فرآورده‌ی سالم و عاری از سموم قارچی موضوع از دو جهت قابل بررسی است. یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روش‌های پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روش‌های سالم‌سازی فرآورده آلوده به این گونه سموم است که در صورت عدم موفقیت در پیشگیری از تولید آفلاتوکسین لازم‌الاجرا هستند. بدیهی است برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها بهترین روش تولید پسته‌های استاندارد است. یکی

¹ Biodegradable³ Antimicrobial Packaging⁵ *Zataria multiflora* Boiss.⁷ Thymol² Whey Protein⁴ Active Packaging⁶ Carvacrol¹ *Aspergillus parasiticus*² *Aspergillus flavus*

کرده و پس از پودر کردن توسط آسیاب برقی، در داخل بشر با ۱۲۰ میلی‌لیتر حلال اتانول/ آب (۷۵ درصد الکل و ۲۵ درصد آب) به نسبت ۶ قسمت محلول الکلی به ۱ قسمت پودر اضافه شده و سپس داخل انکوباتور لرزاننده^۱ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت تا عصاره‌گیری انجام شود. سپس توسط خلاء بخش مایع از تفاله‌ها جدا و در دستگاه روتاری خلاء، حلال از عصاره جدا شد. پس از حذف کامل حلال در دستگاه روتاری تحت خلاء با توزین ماده خشک باقی مانده بازده استخراج عصاره الکلی آویشن شیرازی تعیین می‌شود. ماده خشک باقی مانده به منظور استفاده در آزمایش‌ها باید رقیق شود، برای این منظور از حلال اولیه که توسط روتاری حذف شده استفاده می‌شود پس از اضافه کردن حلال تا جایی که ماده خشک به طور کامل حل شود کار را ادامه می‌دهیم و در نهایت با محاسبه میزان حلال الکلی افزوده شده به ماده خشک غلظت عصاره الکلی محاسبه می‌شود که در پژوهش حاضر غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی ۴۸ درصد می‌باشد. عصاره الکلی تهیه شده در داخل یک بطری سترون و تیره تا زمان بررسی اثر بر روی قارچ در شرایط یخچال نگهداری شد.

میزان تاثیر عصاره الکلی آویشن شیرازی

الف) شمارش اسپرژیلوس فلاووس

برای بررسی تاثیر عصاره‌های گیاهی بر روی رشد قارچ ابتدا میزان مشخصی از اسپوره‌های قارچی تهیه شد. به همین منظور از کشت لیوفیلیزه قارچ اسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006) بر روی محیط کشت جامد شیب‌دار^۲ و گرمخانه گذاری آن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته صورت گرفت و سپس این محیط با استفاده از محلول توئین ۰/۵ درصد به منظور تهیه سوسپانسیون قارچی و شمارش اسپوره‌های قارچی شسته شد. برای شمارش اسپوره‌های قارچی از لام نئوبار استفاده شد. پس از شمارش تعداد ۱۰۶ از اسپور قارچی جهت بررسی انتخاب شد.

هدف از این تحقیق اولاً بررسی اثر ضدقارچی عصاره الکلی آویشن شیرازی بر علیه رشد قارچ توکسین‌زای اسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی و ثانیاً بررسی امکان استفاده از این عصاره در ساختار پوشش خوراکی تهیه شده از پروتئین آب پنیر جهت تولید پوشش خوراکی ضدقارچی به منظور جلوگیری از رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس بر روی مغز پسته بوده است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از رقم پسته اکبری استفاده شد. پسته خام پس از تهیه از بازار تا زمان خشک کردن در محیط تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر^۱ از شرکت Merck آلمان و کنسالتره پروتئینی آب پنیر نیز از شرکت Arla دانمارک خریداری شد. عصاره الکلی گیاه آویشن نیز در پژوهشکده صنایع شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. قارچ اسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006) از مرکز کلکسیون قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شد.

خشک کردن پسته

نمونه‌های پسته خام (بدون آفت‌زدگی و نارسی) پس از برداشت، جدا کردن پوسته نرم، خندان کردن و خشک کردن آماده پوشش دهی می‌شود. عملیات خشک کردن توسط دستگاه خشک کن با جابجایی هوای داغ (ساخت شرکت کروگ-آلمان) انجام شد. درجه حرارت خشک کن ۵۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان خشک کردن ۴۸ ساعت به طول انجامید.

روش عصاره‌گیری

عصاره‌گیری بر اساس روش دورلینگ^۲ و همکاران انجام شد [۱۷]. ۲۰ گرم از برگ و ساقه گیاه آویشن شیرازی را وزن

۱. Plasticizer: ترکیباتی با فراریت پایین هستند که در فیلم‌های پلیمری برای افزایش میزان انعطاف پذیری آنها اضافه می‌شوند.

۲ Durling

^۱ Shaker incubator

^۲ SDA



ب) تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی MIC

برای بررسی تاثیر عصاره بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ابتدا بر روی محیط سابورود دکستروز آگار از سوسپانسیون حاوی 10^6 از اسپور قارچی پخش نموده و سپس چاهک^۲ هایی با قطر ۵ میلی متر بر روی محیط کشت ایجاد نموده و مقداری از عصاره با غلظت ۳۰ درصد را تا میزانی که گوده‌ها پر شوند، در آن قرار دادیم. به عنوان شاهد در داخل گوده دیگر الکل (حلال) را ریختیم و پس از گرمخانه گذاری در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ تا ۵ روز میزان مهار یا عدم مهار رشد را از طریق اندازه گیری قطر ناحیه مهاري رشد اطراف چاهک در مقایسه با گوده حاوی الکل (شاهد) بررسی نمودیم.

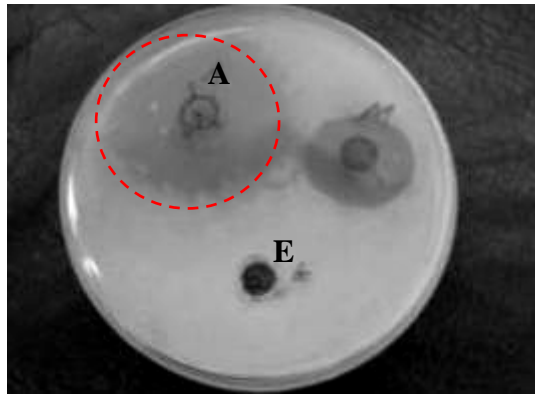
برای بررسی میزان حداقل غلظت مهاري از روش چاهک مشابه حالت ذکر شده استفاده نموده با این تفاوت که در این مرحله در داخل چاهک‌ها این باز از مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استفاده شد تا به حد تقریبی حداقل غلظت مهاري رسیدیم. در روش تکمیلی و دقیق تری میزان MIC با روش لوله ای تعیین شد. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش کشت لوله ای در لوله های سری استفاده شد. در هر لوله ۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع سابورود دکستروز ریخته و سپس $10^6 \times 5$ اسپور به هر لوله تلقیح شد تا در هر میلی لیتر 10^6 اسپور قارچی موجود باشد. بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچی به لوله های حاوی محیط کشت سترون، عصاره از کمترین غلظت به بالاترین غلظت در هر لوله توسط سمپلر ریخته شد. برخی از لوله ها را به عنوان کنترل (شاهد) در نظر گرفتیم. لوله های شاهد شامل: لوله ای حاوی محیط کشت، لوله ای شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی ولی بدون عصاره الکلی و لوله هایی که حاوی محیط کشت و مقادیر متفاوتی از عصاره الکلی بودند که از این لوله ها جهت مقایسه کدورت با لوله هایی که قارچ آسپرژیلوس فلاووس در آنها رشد نکرده ولی به همان مقدار عصاره الکلی همراه اسپور قارچی را داشته اند، استفاده شد. پس از گذشت ۳ روز از گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و با مشاهده لوله ها و تعیین آزمایش کدورت، حداقل غلظت

ممانعت کنندگی عصاره الکلی آویشن شیرازی در محیط کشت تعیین شد.

ج) تعیین فعالیت مهاري عصاره در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش انتشار از دیسک

ابتدا بر اساس روش طرح شده در تحقیق شاو^۱ و همکاران (۲۰۰۲) فیلم خوراکی از پروتئین آب پنیر تهیه شد [۱۸]. در این روش ابتدا یک محلول ۱۰ درصد از کنسانتره پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه شد. جهت حل شدن بهتر کنسانتره این مخلوط به مدت ۱ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس جهت دناتوره شدن پروتئین ها در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن تا دمای اتاق خنک شده و به وسیله سود ۱ نرمال pH آن روی ۷ تنظیم شد. گلیسرول به محلول تهیه کننده پوشش به گونه ای اضافه شد که نسبت گلیسرول/پروتئین برابر $1/6$ (وزن/وزن) حاصل شود. مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۳۰ درصد را به محلول تشکیل دهنده فیلم اضافه نمودیم. مقدار ۱۴ میلی لیتر از محلول فیلم را در داخل پلیت های پلاستیکی سترون با قطر ۱۰ سانتی متر وارد نموده و در زیر هود بیولوژیک قرار دادیم تا فیلم ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی خشک شوند. از هر کدام از فیلم های حاوی غلظت های مختلف عصاره، حاوی الکل و بدون عصاره و الکل دیسک هایی به قطر ۵ میلی متر نظیر دیسک های مورد استفاده در آزمون آنتی بیوگرام تهیه شد. این دیسک ها سپس در وسط چهار منطقه پیرامونی پلیت های تلقیح شده با 10^6 CFU قارچ آسپرژیلوس فلاووس قرار گرفته و فعالیت ضدقارچی را با استفاده از اندازه گیری قطر هاله مهاري اطراف دیسک ها تعیین نمودیم. بررسی ناحیه مهاري رشد بر روی محیط کشت جامد، جهت تعیین اثرات ضد میکروبی فیلم در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس استفاده شد. پلیت ها به مدت ۳ روز در ۲۵ درجه سانتی گراد در گرمخانه قرار گرفتند (شکل شماره ۱). سپس

¹ Shaw² Growth Inhibition Zone¹ Minimum Inhibition Concentration² Well



شکل شماره ۱- ناحیه مهار رشد (دایره قرمز با خط نقطه‌چین) کشت قارچ آسپرژیلوس فلاووس در حضور عصاره آویشن شیرازی (A) در

مقایسه با شاهد الکل (E)

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آن ۶۰ درجه به منظور تشکیل پوشش بر سطح مغز پسته خشک نمودیم (شکل شماره ۲). به عنوان شاهد ۲ گروه انتخاب شدند. گروه اول، مغز پسته‌هایی که هیچ‌گونه تیماری روی آن‌ها انجام نشده بود. گروه دوم شامل پسته‌هایی بوده که پوشش دیده اما در پوشش آن‌ها هیچ‌گونه عصاره‌ای افزوده نشد. مغز پسته‌های گروه تیمار و شاهد در داخل پلیت‌های سترون به صورت تک لایه قرار گرفته تا کل پلیت با مغز پسته در یک ردیف پر شود (شکل شماره ۳). در داخل تمامی پلیت‌ها، دیسکی (با قطر ۵ میلی‌متر) از محیط کشت ۹ روزه سابورود دکستروز آگار حاوی آسپرژیلوس فلاووس در وسط پلیت‌ها بر روی یک پسته (شکل شماره ۳) قرار داده شد. هر کدام از پلیت‌ها در داخل کیسه‌های پلاستیکی (زیپ کیپ) با میزان رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار گرفتند (شکل شماره ۲). این میزان رطوبت نسبی توسط نمک اشباع طعام ایجاد شد. میزان گسترش میسلای قارچی در وسط پلیت‌ها از طریق اندازه‌گیری شعاع در دو جهت ۹۰ درجه به عنوان شاخص رشد تعیین شد.

آنالیز آماری داده‌ها

برای هر کدام از تیمارها (مقادیر مختلف اسانس) و شاهد سه تکرار لحاظ شد. معنی‌دار بودن کارایی عصاره آویشن شیرازی بر اساس میزان مهار رشد محیط قارچی با به کارگیری از آنالیز واریانس یک طرفه^۱ در هر دو سطح ۱ و ۵ درصد

پلیت‌ها از نظر ناحیه مهاری^۱ که توسط دیسک‌های فیلم‌ها ایجاد می‌شدند، مورد بررسی و میزان هاله مهاری اندازه‌گیری شد. قطر این ناحیه توسط یک خط کش اندازه‌گیری شد. مساحت تمام ناحیه حاوی دیسک اندازه‌گیری و سپس از مساحت دیسک کم شده، باقیمانده به عنوان مساحت ناحیه مهار رشد بیان شد.

پوشش‌دهی مغز پسته

این مرحله بر اساس بررسی پیشین جوانمرد در سال ۲۰۰۸ انجام شد [۱۹]. تمام محلول‌های پوشش‌دهی حاوی ۱۰ درصد (وزن/وزن) از کنسانتره آب پنیر (۸۵ درصد پروتئین) در آب مقطر بودند. برای ایجاد محلول پوشش‌دهی پیش از افزودن عصاره آویشن، محلول ۱۰ درصد پروتئین آب پنیر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دیده تا پروتئین‌ها دناچوره شوند. سپس محلول دناچوره شده در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خنک شده و گلیسرول به عنوان عامل پلاستی‌سایزر به نسبت ۱ به ۱ میزان ماده پروتئینی به محلول پوشش‌دهی افزوده شد.

برای بررسی میزان اثر مهاری عصاره آویشن شیرازی در مغز پسته تیمارهایی از امولسیون پوشش و ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره (غلظت ۴۸ درصد) تهیه نموده و پسته‌هایی که به مدت یک شبانه روز توسط اشعه UV سترون شده بودند را پس از بررسی سترون بودن آن‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه در این محلول‌های پوشش‌دهی غوطه‌ور نموده و

¹ One way ANNOVA

¹ Inhibition zone



الکلی گیاهان آویشن شیرازی به خوبی باعث مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت شدند.

جدول شماره ۲ میزان گسترش عصاره از دیسک به محیط کشت حاوی آسپرژیلوس فلاووس را براساس میلی‌متر بر روی مغز پسته‌ها نشان می‌دهد. در پسته‌هایی که به عنوان گروه کنترل هیچ گونه تیماری (عدم پوشش‌دهی و عدم وجود عصاره) بر روی آن‌ها اعمال نشده است، میسلای قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از ۲ روز تمام سطح پلیت‌های حاوی مغز پسته را پوشاند. در گروه پوشش دیده (بدون عصاره) نیز میسلای قارچ به طور کامل سطح پلیت را فراگرفت. در گروه‌های پوشش دیده با مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm عصاره نیز تا پایان روز سوم محدودیت رشد (جدول شماره ۲) را شاهد بودیم. در مقادیر ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm به ترتیب تا پایان روز چهارم و ششم این محدودیت رشد مشاهده شد. در مقدار ۲۵۰۰ ppm هیچ‌گونه رشدی با ۳ تکرار مشاهده نشد.

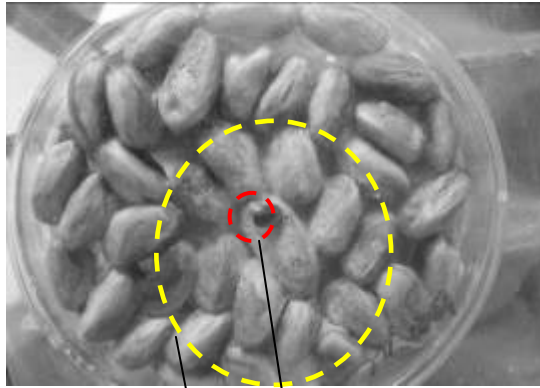
تعیین شد. میانگین‌ها با به کارگیری از آزمون Duncan's multiple range میانگین‌ها با کمک از نرم‌افزار SAS مقایسه شدند.

نتایج

ترکیبات عمده شیمیایی تشکیل‌دهنده عصاره روغنی آویشن شیرازی در جدول شماره ۱ ذکر شده است. در آزمون بررسی تعیین فعالیت مهار عصاره الکلی آویشن شیرازی میزان مهار رشد در غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد عصاره در دیسک حاصل از فیلم پروتئین آب پنیر به ترتیب ۱۱، ۱۳، ۱۸، ۲۳ و ۲۷ میلی‌متر بود. این میزان مهار رشد در گروه کنترل که فیلم‌های بدون عصاره را شامل می‌شد، صفر میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهار برای عصاره آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس ۹۰ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره تعیین شد. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد که عصاره‌های



شکل شماره ۲- طرح بسته‌بندی جهت بررسی اثرات ضدقارچی عصاره آویشن شیرازی در مغز پسته سترون پوشش دیده با پوشش‌های حاوی عصاره در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد



دیسک تلقیح شده (محیط کشت حاوی کشت ۹ روزه آ. فلاووس)

میزان گسترش رشد آ. فلاووس

شکل شماره ۳- میزان رشد میسلای اسپرژیلوس فلاووس (محدوده بیضی زرد رنگ) بر روی مغز پسته‌های پوشش دیده با پروتئین آب پتیر حاوی عصاره آویشن شیرازی، تلقیح شده با (دایره قرمز به قطر ۱۰ میلی‌متر) کشت ۹ روزه اسپرژیلوس فلاووس

جدول شماره ۱- درصد ترکیبات عمده شیمیایی تشکیل دهنده عصاره الکلی آویشن شیرازی

درصد	ترکیب
۲۵/۳۲۲۰	Thymol
۳/۸۳۴۳	α -Pinene
۱۱/۳۱۲۵	Paracine
۱۱/۹۵۷۰	Linalool
۷/۹۷۵۱	Carvacrol

جدول شماره ۲- میزان پیشرفت و گسترش میسلای اسپرژیلوس فلاووس موجود در دیسک (۵ میلی‌متری) محیط کشت ۹ روزه بر حسب میلی‌متر بر روی مغز پسته‌های پوشش ندیده، پوشش دیده با پروتئین آب پتیر بدون افزودن عصاره و حاوی مقادیر مختلف عصاره روغنی آویشن شیرازی در پلیت‌های سترون حاوی یک لایه از مغز پسته در مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

مدت گرمخانه گذاری (روز)	مغز پسته پوشش ندیده	مغز پسته پوشش دیده بدون عصاره	مغز پسته پوشش دیده با مقادیر مختلف عصاره (ppm)					
			۲۵۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰
۱	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
۲	۰/۰	۳۷/۵	۱۹/۵	۱۲/۵	۱۶/۵	۱۰	۸/۵	۰/۰
۳	۱۰۰	۱۰۰	۸۵	۷۵	۶۵	۵۵	۲۹	۰/۰
۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۰	۵۵	۰/۰
۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۵	۰/۰
۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۰	۰/۰
۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۰



بحث و نتیجه گیری

می نماید [۲۴]. اسانس روغنی زیره سیاه^۱ و رازیانه^۲ در غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم این تاثیر را داشته اند. پاراناگاما^۳ و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اسانس روغنی گیاه علف لیمو^۴ به ترتیب در غلظت های ۰/۶ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر در محیط کشت مایع اثر مهاری و کشندگی بر روی اسپرژیلوس فلاووس دارد. تولید آفلاتوکسین نیز به طور کامل در غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر مهار شد [۲۵]. سیدیم^۵ و ساریکیس^۶ در سال ۲۰۰۶ اثرات ضد میکربی فیلم های تهیه شده از آب پنیر حاوی عصاره های روغنی پونه^۷، اکلیل کوهی^۸ و سیر را بر روی برخی از باکتری های بیماری زای غذازاد مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیقات نشان داد که فیلم های حاوی عصاره های این ادویه باعث ایجاد ویژگی ضد میکربی در این فیلم ها می گردد [۱۲].

Viuda-Martos و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اسانس آویشن^۹ باعث کاهش رشد میسلای اسپرژیلوس فلاووس در مقادیر ۲، ۴ و ۶ میلی لیتر و همچنین مهار رشد در ۸ میلی لیتر می شود [۲۶]. تحقیقات امیددگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز نشان داد که عصاره های روغنی آویشن، میخک و مرزه^{۱۰} توانایی مهار رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس را در محیط کشت مایع و خمیر گوجه فرنگی داشته و عصاره روغنی آویشن و مرزه قوی ترین اثر مهاری را به ترتیب با ۳۵۰ و ۵۰۰ ppm غلظت نشان دادند. همچنین درصد مهار رشد در خمیر گوجه فرنگی نسبت به محیط مایع برای هر کدام از عصاره ها کمتر بود [۲۷].

همچنان که نتایج نشان داد مقدار مورد نیاز عصاره آویشن شیرازی جهت مهار رشد اسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی نسبت به مدل غذایی بسیار کمتر بوده است (مقدار ۲۵۰۰ در مقابل ۹۰ ppm میزان حداقل غلظت مهاری). هپ^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند غلظت تاثیر

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش های حاصل از پروتئین آب پنیر بر روی مغز پسته سترون حاوی عصاره الکلی آویشن شیرازی به طور معنی داری ($p < 0.01$) باعث جلوگیری از رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس بر روی خود در رطوبت نسبی ۷۵ درصد شدند. آنالیز آماری نشان داد که تاثیر این عصاره با توجه به افزایش غلظت عصاره در ترکیب پوشش بر روی مغز پسته و مدت زمان تلقیح معنی دار بوده است. تنها بالاترین غلظت به کار رفته عصاره در ترکیب پوشش (۲۵۰۰ ppm) توانایی فعالیت مهار رشد قارچ اسپرژیلوس را تا ۷ روز دارا بود. Thanaboripat و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که رشد اسپرژیلوس فلاووس در غلظت ۱ درصد اسانس روغنی سنبل هندی^۱ تنها به مدت ۳ روز مهار شد [۲۰]. Bluma و Etcheverry در سال ۲۰۰۷ میزان ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم در گرم از عصاره های Boldus، Poleo، میخک^۲ و بادیان رومی^۳ را برای کاهش رشد اسپرژیلوس فلاووس در دانه های سترون ذرت کافی دانستند [۲۱]. مطالعه کارین^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی مهار رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس در نان گندم و چاودار با استفاده از اسانس روغنی فرار خردل نشان داد، این قارچ نسبت به این اسانس بیشترین مقاومت را در شرایط اتمسفر معمولی دارا می باشد [۲۲].

پاستر^۵ و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثرات ضدقارچی اسانس روغنی پونه کوهی را بر روی قارچ های جنس اسپرژیلوس بررسی نموده و نتایج یافته های آن ها نشان داد که غلظت های ۲ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر اسانس بر روی میسلیم و هاگ های اسپرژیلوس نایجر، فلاووس و اوکراسئوس اثر مهاری دارد [۲۳]. سلیمان^۶ و بادا^۷ در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که اسانس روغنی بادیان رومی به طور کامل از رشد اسپرژیلوس فلاووس در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم جلوگیری

¹ Caraway
³ Paranagama
⁵ Seydim
⁷ Oregano
⁹ Thyme
¹¹ Hope

² Fennel
⁴ Lemon grass plant
⁶ Sarikis
⁸ Rosemary
¹⁰ Summer savory

¹ Citronella
³ Anise
⁵ Paster
⁷ Badaea
² Clove
⁴ Karin
⁶ Soliman



میزان مهار نسبت به عدم مهار رشد در گروه شاهد یعنی فیلم‌های بدون هرگونه عصاره کاملاً معنی‌دار بود ($p < 0.01$). پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده باید بر روی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی مختلف همراه با انواع فیلم‌های زیستی^۲ انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی شورای پژوهش‌های علمی کشور (توتک) و با همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در پژوهشکده کشاورزی انجام گرفته است. از سرکار خانم دکتر لیلا گلستان و مهندس روژین آهنگری به خاطر همکاری‌شان در مراحل تهیه فیلم و جناب آقای دکتر علیرضا بصیری به جهت در اختیار قرار دادن برخی از امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌شود.

اسانس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچ‌ها در شرایط مدل غذایی یکسان نمی‌باشد. به عنوان مثال این محققین دریافتند که در حالی که غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در گرم اسانس‌های روغنی در شرایط آزمایشگاهی بر روی فوزاریوم کولموروم^۱ موثر هستند، اما در روی دانه گندم مقادیر بسیار بیشتری (۵۰۰ میکروگرم در گرم) آن‌ها مورد نیاز می‌باشد [۲۸].

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش‌های حاصل از پروتئین آب پنیر حاوی مواد ضد میکروبی طبیعی، توانایی جلوگیری از آلودگی و رشد ثانویه قارچ‌ها را بر روی سطح مغز پسته خواهند داشت. علاوه بر این چنین پوشش‌هایی می‌توانند از تغییرات انبار مانی مغزهای خوراکی همانند کاهش وزن، فساد اکسیداتیو و جذب رطوبت کاسته [۹]، منجر به افزایش ماندگاری و سلامت مغزهای خوراکی در طی مدت زمان ذخیره‌سازی شوند. افزایش میزان عصاره الکلی در ترکیب فیلم خوراکی پروتئین آب پنیر باعث افزایش میزان مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی محیط کشت شد. این

منابع

1. Kashaninejad M, Mortazavi A, Safekordi A, and Tabil LG. Some physical properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) Nut and its kernel. *J. of Food engineering* 2006; 72: 30 - 8.
2. Tavakkolipour H. Effects of Processing conditions on Pistachio Drying and its shelflife, PhD Thesis in Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch. 1379: 8 - 31 & 37 - 8.
3. FAO. Statistical database. Available from <http://www.fao.org>. Access in 2007.
4. Rahimi P, Sharifnabi B and Bahar M. Detection of Aflatoxin in *Aspergillus Species* Isolated from Pistachio in Iran. *J. of Phytopathol.* 2008; 156: 15 - 20.
5. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP and Bennett W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Environmental Microbiol.* 2004; 70: 1253 - 62.
6. Ersahad D. Fungi of Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization. 1995, pp: 868 - 9.
7. Mojtahedi H, Rabie CJ, Lubben A, Steyn M and Danesh D. Toxic aspergilli from pistachio nuts. *Mycopathologia.* 1979; 67: 123 - 7.
8. Denizel T, Jarvis B and Rolfe EJ. A field survey of pistachio (*Pistacia vera* L.) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination. *J. of the Sci. Food Agriculture* 1976; 27: 1021 - 6.
9. Doster MA and Michailides TJ. *Aspergillus* molds and aflatoxin in pistachio nuts in California. *Phytopathol.* 1994; 84: 583 - 90.
10. Tharanathan R N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future.



- Trends in Food Science Technol.* 2003; 14: 71 – 8.
11. Krochta, JM. Film edible. In: Brody AL, March KS, editors. The Wiley encyclopedia of packaging technology. New York: John Wiley & Sons Inc. 1997, pp: 397 - 401.
 12. Seydim AC and Sarkis G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. International.* 2006; 39 (5): 639 - 44.
 13. Ali M, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem.* 2000; 55: 933 - 6.
 14. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, and Tsarbopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Wave taxa of Sideritis from Greece. *J. of Agricultural and Food Chem.* 2001; 49: 811 – 5.
 15. Thompson DP. Fungi toxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia.* 1989; 81: 151 – 3.
 16. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. *Food Control* 2006; 17: 359 – 4.
 17. Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, and Perry NB. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol – water mixtures. *Food Chem.* 2007; 101: 1417 - 24.
 18. Shaw NB, Monahan FJ, O'Riordan ED and O'Sullivan M. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. *J. of Food Engineering* 2002; 51 (4): 299 - 304.
 19. Javanmard M. Shelf life of whey protein-coated pistachio kernel (*Pistacia vera* L.). *Journal of Food Process Engineering.* 2008; 31: 247 - 59.
 20. Thanaboripat D, Mongkontanawur N, Suvathi Y and Ruangrattanamatee V. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Sci. J.* 2004; 4 (1): 1 - 16.
 21. Bluma RV and Etcheverry MG. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.* 2007; 25 (2): 324 - 34.
 22. Karin I S and Nielsen P V. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *J. of Food Sci.* 2005; 70 (1): 37 - 47.
 23. Paster N, Menasherov M, Ravid U and Juven B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. of Food Protection* 1995; 58: 81 – 5.
 24. Soliman KM and Badeaa RI. Effect of oil extracts from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1669 – 75.
 25. Paranagama PA, Abeysekera KHT, Abeywickrama K and Nugaliyadd L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice, *Letters in Applied Microbiol.* 2003; 37: 86 – 90.
 26. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J and Perez-Álvarez JA. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. of Food Safety* 2007; 27 (1): 91 – 101.
 27. Omidbeygi M. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste, *Food Control* 2007; 18: 1518 - 23.
 28. Hope R, Jestoi M and Magan N. Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. In: Advances in Stored Product Protection. Proceedings of 8th International Working conference on Stored Product Protection (IWCSPP). (Eds P.F., Credland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan and E. Highley). York CABI publishing. 2002, pp: 486 - 92.

