بررسی امکان استفاده از کیتوزان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در سس مایونز

حسن برزگر [۱*]، احمد کرباسی [۲]، جلال جمالیان [۲] و محمود امین لاری [۳]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۴)

چکیده

کیتوزان از مشتقات دی استیله شده کیتین می‌باشد که در پوشش سخت پوستان، بند پایان و دیواره سلولی برخی از قارچ‌ها یافت می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و امکان کاربرد آن در سس مایونز به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی می‌باشد. در این تحقیق به روش شیمیایی از پوسته میگو کیتوزان استخراج شده و سپس قدرت ضد میکروبی کیتوزان تولیدی از آن به طریق *In Vitro* بررسی گردید. بدین منظور از دو باکتری *Lactobacillus plantarum* و *Salmonella enteritidis* استفاده گردید. آزمایشات در دو pH برابر ۵ و ۶ انجام گرفت و با به‌کار بردن غلظت‌های مختلفی از کیتوزان میزان حداقل غلظت مورد نیاز به عنوان بازدارنده(MIC) وحداقل غلظت مورد نیاز به عنوان باکتری‌کش (MBC) کیتوزان برای هر دو باکتری به‌طور جداگانه تعیین شد. *مقدار* MIC و MBC کیتوزان در مورد هر دو باکتری و در دوpH مختلف کمتر از ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. هم‌چنین قدرت ضد میکروبی کیتوزان در pH برابر ۵ بیش از pH برابر ۶ بود. در مرحله بعد تأثیر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و۰/۳ درصد کیتوزان بر باکتری‌های مذکور در سس مایونز تحت شرایط نگه‌داری در دو دمای $5^{\circ}C$ و $25^{\circ}C$ بررسی شد. افزودن مقادیر ذکر شده کیتوزان به سس مایونز باعث کاهش معنی‌داری در جمعیت باکتری‌های سالمونلا و لاکتوباسیلوس اضافه شده به سس مایونز در طول نگه‌داری به مدت ۸ روز در دو دمای $5^{\circ}C$ و $25^{\circ}C$ شد. هم‌چنین قدرت ضد میکروبی کیتوزان در دمای $5^{\circ}C$ بیش از دمای $25^{\circ}C$ بود. بررسی خواص حسی نشان داد که افزودن کیتوزان تا میزان ۰/۳ درصد باعث ایجاد خواص حسی نامطلوب در سس مایونز نمی‌شود. در نهایت از این تحقیق چنین نتیجه‌گیری شد که می‌توان کیتوزان را به میزان ۰/۲ درصد به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در سس مایونز استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کیتوزان، کیتین، ماده نگهدارنده، سس مایونز

مقدمه

تأمین نیازهای غذایی و نگه‌داری غذا از دیر زمان مورد توجه بشر بوده‌است. غذا پس از تولید بایستی به طریق مناسب نگه‌داری شود، در غیر این صورت دچار فساد و ضایعات خواهد شد. یکی از روش‌های گسترده و مهم نگه‌داری مواد غذایی استفاده از افزودنی‌های غذایی می‌باشد. امروزه کمتر ماده غذایی یافت می‌شود که به نحوی با مواد افزودنی در ارتباط نباشد. این مواد افزودنی اگر در حد مجاز استفاده شوند،

۱. مربی علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین، ملاثانی، خوزستان

۲. به ترتیب استادیار و استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۳. استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: barzegarha@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

خطری برای مصرف کننده ندارند ولی درصورت استفاده بیش از حد می‌توانند برای مصرف کننده مسمومیت‌زا بوده وحتی در مواردی مانند استفاده از نیترات و نیتریت به‌دلیل تشکیل نیتروزآمین‌ها خطر ابتلا به سرطان را افزایش دهند (۹، ۱۳ و ۲۰).

امروزه مصرف کنندگان مواد غذایی روز به روز تمایل بیشتری نسبت به مصرف غذاهایی که عاری از مواد شیمیایی هستند و در آنها مواد طبیعی به‌کار رفته است از خود نشان می‌دهند و به همین دلیل اخیراً مطالعات زیادی روی امکان جایگزین کردن ترکیبات طبیعی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در غذاهای مختلف صورت گرفته‌است (۱۵،۱۷ و۱۸).

یکی از ترکیباتی که اخیرا مطالعاتی در زمینه کاربرد آن به عنوان یک ماده نگهدارنده و ضد میکروب در مواد غذایی صورت گرفته کیتوزان، یکی از مشتقات کیتین می‌باشد. کیتین همانند سلولز از دسته پلی ساکاریدهایی است که به‌صورت طبیعی نقش ساختمانی بر عهده دارد و فرمول شیمیایی آن بسیار شبیه سلولز است (۸، ۱۱ و ۲۷). کیتین ساختاری کریستالی، سخت و سفید رنگ دارد که به وفور در پوسته سخت پوستان، حشرات و میسلیوم قارچ‌ها یافت می‌شود. کیتوزان یکی از مهم‌ترین مشتقات کیتین است که در نتیجه واکنش حذف گروه استیل از کیتین به‌دست می‌آید. معمولا کیتوزان به کیتینی که بیش از ۵۰ درصد گروه‌های استیل آن حذف شده گفته می‌شود(۵ و ۱۹).

کیتوزان بر خلاف ترکیبات پلیمری مصنوعی ضمن سازگاری با بافت‌های زنده، غیر سمی بوده و در طبیعت قابل تجزیه می‌باشد. لازم به ذکر است که استفاده از کیتوزان به عنوان یک ماده افزودنی غذایی در ژاپن و کره به ترتیب ازسال‌های ۱۹۸۳ و ۱۹۹۵ مجاز اعلام شده است و امروزه در ژاپن در غذاهایی مثل سس سویا، کلم چینی و ساردین‌ها به‌کار می‌رود. در این تحقیق سعی شده که استفاده از کیتوزان به عنوان جایگزینی جدید برای مواد نگهدارنده تجاری در سس مایونز مورد بررسی قرار گیرد (۲۲).

وانگ اثر کیتوزان در غلظت‌های کمتر از ۲/۵ درصد را روی ۵ گونه مختلف بیمارگرهای غذایی در محیط Broth Nutrient و در pH برابر ۵/۵ و ۶/۵ بررسی کرد. نتیجه این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان قدرت بازدارندگی آن در برابر بیمارگرها افزایش یافت هم‌چنین قدرت ضد میکروبی کیتوزان در pH برابر۵/۵ بیش از pH برابر ۶/۵ بود(۲۷). چِن وهمکاران تأثیر کیتوزان و مشتقات سولفوره آن را روی میکروب‌های مولد فساد در نوعی صدف بررسی کردند. در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کیتوزان و مشتقات سولفوره آن در دمای $5^{\circ}C$ هیچ گونه رشد باکتری‌ها مشاهده نشد و پیشنهاد گردید که می‌توان از کیتوزان به عنوان یک ماده نگهدارنده در صدف استفاده کرد(۷). تسای و همکاران خاصیت ضد میکروبی مخلوطی از کیتوالیگو ساکاریدهای به‌دست آمده از تجزیه آنزیمی کیتوزان حاصل از پوسته میگو را به عنوان یک نگهدارنده در شیر خام مورد بررسی قرار دادند. افزایش این ترکیب به شیر خام باعث کاهش سرعت رشد گونه‌های سالمونلا و استافیلوکوکوس در شیر خام شد و در نهایت استفاده از این ترکیب در شیر خام عمر مفید آن را به بیش از ۴ روز در دمای $4^{\circ}C$ افزایش داد(۲۶). رولر و همکاران اثر ضد قارچی گلوتامات کیتوزان را بر علیه ۱۵ گونه مخمر و کپک عامل ایجاد فساد در محیط آزمایشگاهی و آب سیب بررسی کردند. غلظت‌های بین ۰/۱ تا ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان در آب سیب (pH ۳/۴) از رشد تمامی گونه‌های کپک و مخمر مورد مطالعه جلوگیری کرد و قدرت ضد میکروبی کیتوزان بستگی به غلظت آن و شرایط pH محیط داشت (۲۱). قائوت و همکاران تأثیر پوشش کیتوزان (محلول ۱ و ۱/۵ درصد وزنی/حجمی) را در کنترل فساد توت فرنگی در دمای $13^{\circ}C$ در مقایسه با ماده ضد قارچ ایپرودیون بررسی کردند. افزودن کیتوزان باعث کاهش سرعت فساد نمونه‌های توت فرنگی در مقایسه با نمونه‌های شاهد شد. هم‌چنین نمونه‌های آغشته به کیتوزان دارای بافت و رنگ بهتری نسبت به نمونه‌های آغشته به ماده ضد قارچ تجارتی بودند (۱۴). اهداف مورد نظر از انجام این پژوهش عبارت‌اند از:

Archive of SID

www.SID.ir

الف)استخراج کیتوزان از پوسته میگو و بررسی خواص فیزیکی و شیمیایی آن

ب) بررسی اثرات ضد میکروبی کیتوزان در pH های متفاوت علیه باکتری‌های *Lactobacilly plantarum* و *Salmonella enteritidis* و اندازه‌گیری میزان MIC و MBC مربوط به آن

ج) بررسی تأثیر کیتوزان بر باکتری‌های مذکور در سس مایونز

مواد و روش‌ها

۱- استخراج کیتین از پوسته میگو

در این پژوهش از پوشش سخت میگوی ببری تازه تهیه شده از عمده فروشی‌های میگو استفاده گردید. درمرحله بعد پوسته‌ها با آب به‌طور کامل شستشو شده و به مدت ۴ ساعت در محلول سود سوز آور۰/۵ درصد خیسانده شد تا بقایای گوشت میگو و احشای داخلی میگو از پوسته‌ها جدا سازی شود. سپس پوسته‌ها مجدداً با آب شستشو شد و درآون $60^{\circ}C$ به مدت دو ساعت خشک گردید و بعد با دستگاه آسیاب به پودر تبدیل شد. آنگاه استخراج کیتین از پوسته‌ها طی مراحل زیر و بر اساس روش پیشنهادی چانگ وهمکاران انجام گرفت (۶).

۱-۱- جداسازی مواد پروتئینی از پوسته

این عمل با استفاده از محلول سودسوزآور یک نرمال در دمای $90^{\circ}C$ به مدت دو ساعت انجام شد. نسبت وزنی پودر پوسته میگو به محلول سود،۱ به ۲۰ بود. سپس بقایای پوسته راصاف کرده و مواد باقی‌مانده روی صافی با آب مقطرتا رسیدن به pH خنثی شستشو گردید(۶).

۱-۲- جداسازی مواد معدنی از پوسته

بقایای پوسته حاصل از مرحله قبل به مدت یک ساعت در محلول اسید کلریدریک ۱/۴ نرمال قرارداده شد. نسبت وزنی پوسته به اسید، ۱ به ۱۰ بود. سپس بقایای پوسته صاف شد و مواد باقی‌مانده روی صافی تا رسیدن به pH خنثی شستشو گردید. کیتین به‌دست آمده رنگ زرد داشته و باید رنگبری می‌شد(۶).

۱-۳- رنگبری

برای تولید کیتین عاری از رنگیزه‌های کاروتنوئیدی،کیتین با استن شستشو شد تا رنگ آن شفاف و سفید گردد (۶).

۲- تهیه کیتوزان از کیتین

در این مرحله با حذف گروه‌های استیل کیتین، از آن کیتوزان تولید گردید. عملیات دی استیلاسیون در دمای $100^{\circ}C$ به مدت ۶ ساعت درون محلول سود غلیظ (۵۰ درصد) انجام شد. سپس مواد معلق در محلول سود صاف شده و مواد مذکور (کیتوزان) که روی صافی باقی‌مانده بودند با استفاده از آب مقطرتا رسیدن به pH خنثی شستشو شد. آنگاه کیتوزان به‌دست آمده در آون $60^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت خشک شد (۲۴).

۳- تعیین خصوصیات کیتوزان تولیدی

۳-۱- تعیین درصد استحصال کیتوزان

برای این خصوصیت از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{درصد استحصال کیتوزان} = \frac{\text{وزن کیتوزان تولیدی}}{\text{وزن اولیه پوسته میگو}} \times 100 \quad [1]$$

به‌منظور ارزیابی کیفیت کیتوزان تولیدی، خصوصیات دیگری از آن اندازه‌گیری و با همین خصوصیات در پوسته میگو و یا کیتوزان تجاری مقایسه شد(۲۴).

۳-۲- تعیین مقدار درصد پروتئین کیتوزان با روش لوری

تعیین مقدار پروتئین کیتوزان تا حد زیادی می‌تواند مشخص کننده درجه خلوص کیتوزان باشد. روش لوری بر اساس رنگ‌سنجی است و می‌تواند محلول‌های محتوی پروتئین را در غلظت‌های ۱ الی ۳۰۰ میکروگرم در لیتر اندازه‌گیری نماید (۱۶). در این روش یون‌های مس cu^{+2} به پیوندهای پپتیدی در ترکیبات پروتئین متصل شده و رنگ آبی مایل به بنفش را ایجاد می‌کنند. سپس اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان، اسیدهای فسفومولیبدیک و فسفو تنگستیک موجود در معرف فولین (Folin-ciocalteu reagent)را احیا کرده و رنگ آبی را تشدید

Archive of SID

www.SID.ir

می‌کنند. بدین ترتیب شدت رنگ به‌ویژه به واکنش دوم و درنتیجه به مقدار اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان موجود در ترکیب پروتئین مورد نظر بستگی دارد. در این آزمون از محلول سرم آلبومین گاوی به عنوان محلول استاندارد پروتئین و از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰nm جهت اندازه‌گیری شدت رنگ ایجاد شده استفاده گردید.

۳-۳- اندازه‌گیری مقدار خاکستر کیتوزان

برای اندازه‌گیری این خصوصیت در نمونه‌های کیتوزان، مقدار۲ گرم نمونه را در بوته‌های چینی ریخته و سپس با استفاده از شعله نمونه‌ها را سوزانده وبه مدت ۴ ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ °C قرارداده شد و با توجه به تفاوت وزن نمونه اولیه و نمونه ثانویه، درصد خاکستر محاسبه گردید (۲۴).

۴-۳- تعیین درصد دی استیلاسیون کیتوزان

در این مورد از روش طیف سنجی مادون قرمز استفاده شد و طیف مربوط به کیتوزان تولیدی با کیتوزان استاندارد مقایسه گردید و بر آن اساس، درصد یا درجه دی استیلاسیون کیتوزان تعیین شد. دستگاه مورد استفاده اسپکترو فتومتر مادون قرمز ساخت ژاپن بود و برای معین کردن درجه دی استیلاسیون کیتوزان روش خط پایه و فرمول زیر به‌کار برده شد (۲۵).

$$DD = ۱۰۰ - \left[\left(A_{۱۶۵۵} / A_{۳۴۵۰}\right) \times ۱۱۵\right] + \text{baseline} \qquad [۲]$$

در این رابطه: DD = درجه دی استیلاسیون، $A_{۱۶۵۵}$ = جذب در ۱۶۵۵ wave number/cm (مربوط به گروه‌های آمینی و معیاری از تعداد گروه‌های استیل) و $A_{۳۴۵۰}$ = جذب در ۳۴۵۰ wave number/cm (مربوط به گروه‌های هیدروکسیل و به عنوان فاکتور تصحیح کننده برای غلظت‌های مختلف کیتوزان در پودرکیتوزان و پتاسیم بروماید) می‌باشد.

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌های کیتوزان، پودر آنها به صورت نمونه‌های جامد قرص مانندی درآورده شد. پودرهای مذکور قبلاً با پودر پتاسیم بروماید مخلوط گردید. نسبت پودر کیتوزان به پودر پتاسیم بروماید به ترتیب ۵۰ میلی‌گرم به ۱۲۰ میلی‌گرم بود. مخلوط پودری به‌دست آمده با استفاده از دستگاه پرس مخصوص ساخت قرص به‌صورت قرص مانند درآمد و پس از خشک شدن در آون تحت خلأ در دمای ۸۰°C برای آزمایش‌های اسپکتروفتومتری مادون قرمز آماده شد (۴).

۴- میکرو ارگانیسم‌های مورد مطالعه

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در این تحقیق *L. plantarum* و *S. enteritidis* بودند که به ترتیب به عنوان میکروارگانیسم مولد فساد و مسمومیت در سس مایونز شناخته شده‌اند (۱۲). باکتری *S. enteritidis* از بخش بهداشت دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز تامین گردید. جهت اطمینان از خالص بودن نمونه میکروبی قبل از شروع و انجام تحقیقات، آزمون‌های تأییدی بر روی این باکتری انجام گرفت. باکتری *L. plantarum* از آب نمک خیار شور تخمیری جداسازی شد. بدین صورت که ابتدا خیار شور تخمیری تولید شد و پس از دو هفته نگه‌داری در دمای محیط، از آب نمک خیار شور روی پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS Agar کشت داده شد و پس از رشد کلنی‌ها، آزمون‌های تأییدی روی آنها انجام گرفت.

۵- تعیین میزان MIC و MBC کیتوزان

در این مرحله از تحقیق میزان MIC و MBC کیتوزان تولیدی و تأثیر pH بر آنها بررسی شد. تعداد $۱۰^۶$cells/ml از دو باکتری *L. plantarum* و *S. enteritidis* مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی لاکتوباسیلوس از محیط کشت MRS و برای سالمونلا از محیط کشت (Nutrient broth + 0.1% Glucose) استفاده شد. pH محیط کشت بوسیله محلول اسید لاکتیک در دو pH برابر با ۵/۵ و ۶/۵ تنظیم شد و میزان MIC و MBC برای هر دو میکروارگانیسم به‌طور جداگانه در هر دو pH اندازه‌گیری شد.

۶- بررسی خواص ضد میکروبی کیتوزان در سس مایونز

۱-۶ تولید سس مایونز

به‌منظور بررسی خواص ضد میکروبی کیتوزان در سس مایونز

Archive of SID

www.SID.ir

سعی گردید که سس مایونز تولیدی دقیقا مشابه نمونه‌هایی باشد که به‌صورت تجاری در کارخانجات تولید می‌شوند. بدین منظور از فرمولی که در یکی از کارخانجات معتبر به‌کار می‌رفت استفاده گردید و مراحل تولید سس تماما در قسمت پایلوت پلنت بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام گرفت. جهت تولید سس مایونز به جای نگهدارنده بنزوات سدیم از پودر کیتوزان در مقادیر ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد استفاده شد. هم‌چنین در هر آزمایش یک نمونه بدون افزودن کیتوزان به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد (۲).

۶-۲- بررسی تأثیر غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد کیتوزان بر باکتری‌های اضافه شده در سس مایونز

در این مرحله اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر میزان رشد باکتری‌های *L. plantarum* و *S. enteritidis* در سس مایونز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از تولید نمونه‌های سس مایونز، در مرحله آخر تولید، سوسپانسیون میکروبی از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه به‌طور جداگانه طوری به سس مایونز اضافه شد که در نهایت غلظت ۲×۱۰^{۶} cells/ml به‌دست آید. البته در مخلوط کردن سوسپانسیون میکروبی از دور آرام همزن استفاده گردید تا به میکروارگانیسم‌ها صدمه وارد نشود. سپس نمونه‌های تولید شده در شیشه‌های ۲۰۰ گرمی که قبلا در اتوکلاو استریل شده بودند، بسته‌بندی گردید و نمونه‌ها در دو دمای ۵ و ۲۵ ^{o}C نگه‌داری شدند. از نمونه‌های سس مایونز در مراحل زمانی صفر، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۴ روز، ۶ روز و ۸ روز نمونه برداری شد. جهت شمارش باکتری‌های لاکتو باسیلوس و سالمونلا به ترتیب از محیط‌های MRS agar و XLD agar به روش کشت سطحی استفاده شد (۳).

۶-۳- بررسی تأثیر دما روی قدرت ضد میکروبی کیتوزان در سس مایونز

به‌منظور بررسی تأثیر دما روی قدرت ضد میکروبی کیتوزان، نمونه‌های سس تولید شده در دو دمای $5^{o}C$ و ۲۵ ^{o}C نگه‌داری شدند و پس از طی مدت زمان‌های ذکر شده در بند قبل از آنها نمونه برداری شد. در این تحقیق از دمای $5^{\circ}C$ به عنوان دمای یخچال و از دمای $25^{\circ}C$ به عنوان دمای اتاق استفاده شد.

۷- تجزیه و تحلیل آماری

از طرح کاملا تصادفی برای تجزیه و تحلیل استفاده شد و برای این منظور نرم افزار آماری (SAS) به‌کار برده شد. برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد (۱).

نتایج

۱- تعیین درصد استحصال کیتوزان از پوسته میگو

درصد استحصال کیتوزان درحد ۱۷ درصد تعیین گردید. این نتیجه با تحقیقات صورت گرفته توسط چانگ وهمکاران (۶) و هیو و همکاران(۱۶) مطابقت دارد.

۲- میزان پروتئین و مواد معدنی باقی‌مانده در کیتوزان

نتایج این بررسی در مورد کیتوزان تولیدی، کیتوزان تجاری وپوسته میگو در جدول ۱ خلاصه شده است. ملاحظه می‌شود که در صد پروتئین و مواد معدنی در کیتوزان تولیدی کمتر از کیتوزان تجاری بوده و این مسأله نشان دهنده درجه خلوص بالاتر کیتوزان تولیدی است و به‌عبارت دیگر مؤید این نکته است که عملیات پروتئین زدایی و حذف ناخالصی‌های معدنی از کیتوزان تولیدی بهتر انجام گرفته‌است. کنترل دمای فرایند، کاربرد نسبت ودرصد مناسب مواد و شستشوی مناسب‌تر بقایای پروتئین با آب مقطر از جمله عوامل مؤثر در زمینه پروتئین‌زدایی و کاربرد نسبت مناسب پوسته میگوبه اسید، همزدن کافی ضمن تماس پوسته میگو و اسید و هم‌چنین شستشوی مناسب مواد باقی‌مانده روی صافی پس از صاف کردن از جمله عوامل موثردر زمینه کاهش املاح به‌شمار می‌آیند (۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱. نتایج اندازه‌گیری پروتئین، خاکستر و درصد (درجه) دی استیلاسیون در کیتوزان تولیدی، کیتوزان تجاری و پوسته میگو

نمونه	پروتئین (درصد نسبت به وزن مرطوب)	خاکستر (درصد نسبت به وزن مرطوب)	درصد دی استیلاسیون
پوسته میگو	۱۱/۵۷ ± ۰/۴۵	۸/۲۰ ± ۰/۵۷	-
کیتوزان تجاری	۰/۳۲ ± ۰/۰۳	۰/۴۹ ± ۰/۰۶	۸۵ ± ۲
کیتوزان تولیدی	۰/۱۳ ± ۰/۰۱	۰/۱۱ ± ۰/۰۴	۹۱ ± ۱

جدول ۲. تأثیر کیتوزان بر باکتری‌های مورد مطالعه (10^6cells/ml)

pH	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
	L. plantarum	*S.enteritidis*	*L.plantarum*	*S.enteritidis*
۵	۰/۷[a]	۰/۴[a]	۰/۹[a]	۰/۷[a]
۶	۰/۸[b]	۰/۵[b]	۱/۰[b]	۰/۸[b]

۳- تعیین درصد دی استیلاسیون کیتوزان

نتایج این بررسی در جدول۱ آمده است و نشان می‌دهد که در مراحل تولید کیتوزان تولیدی جدا شدن گروه‌های استیل در فرایند دی استیلاسیون کیتین، به مقدار بیشتری نسبت به کیتوزان تجاری انجام شده‌است.

۴- تعیین میزان MIC و MBC کیتوزان تولیدی

میزان MIC و MBC در دو pH برابر ۵ و ۶ در مورد باکتری‌های *L. plantarum* و *S. enteritidis* تعیین شد. نتایج بررسی‌ها در جدول ۲ نشان داه شده است. مقایسه بین قدرت ضد میکروبی کیتوزان در دو pH برابر ۵ و ۶ نشان داد که قدرت ضد میکروبی کیتوزان با کاهش pH نسبت عکس دارد. بدین صورت که با کاهش pH محیط قدرت ضد میکروبی کیتوزان افزایش می‌یابد. نتایج تحقیق محققین دیگر نیز در این زمینه با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. تسای و سو (۲۶) نشان دادند که pH اسیدی قدرت ضد میکروبی کیتوزان را برعلیه *E. coli* افزایش می‌دهد.

هم‌چنین وانگ (۲۷) نشان داد که قدرت ضد میکروبی کیتوزان بر علیه ۵ گونه بیمارگر غذایی در pH برابر ۵/۵ قوی‌تر از pH برابر ۶/۵ بود. علت افزایش قدرت ضد میکروبی کیتوزان در نتیجه کاهش pH را می‌توان در دو قسمت مجزا بیان کرد. الف) فعالیت ضد میکروبی کیتوزان به‌طور مستقیم با میزان کیتوزان محلول ارتباط دارد در محدوده کمتر از pKa کیتوزان، با کاهش pH، نسبت کیتوزان محلول در محیط افزایش می‌یابد.(۲۲ و ۲۵).

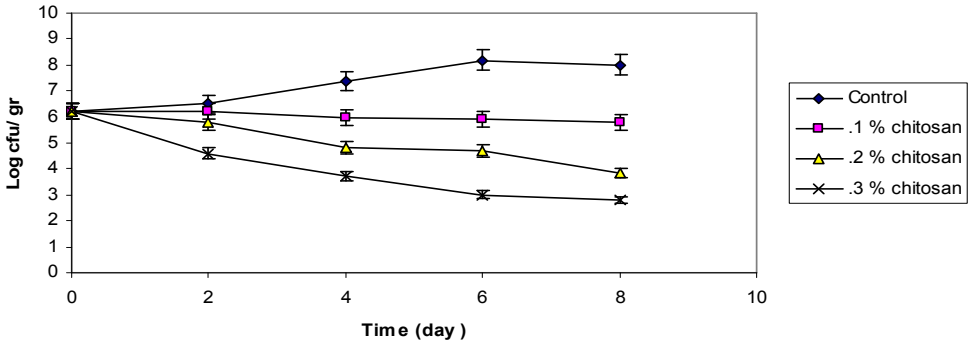
ب) با کاهش pH چگالی بار مثبت گروه آمین کیتوزان افزایش می‌یابد در نتیجه واکنش بین این بارهای مثبت و بارهای منفی سطح سلولی میکروارگانیسم‌ها تشدید می‌شود (۱۹ و ۲۳).

۵- بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کیتوزان بر باکتری *L. plantarum* در سس مایونز

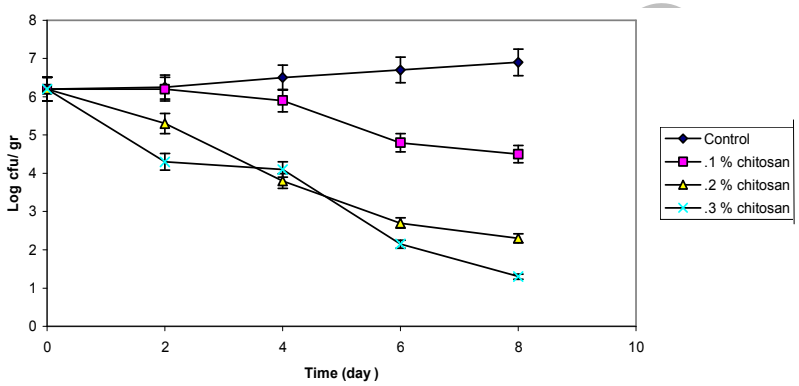
نتایج بررسی غلظت‌های مختلف کیتوزان بر باکتری لاکتوباسیلوس در سس مایونز در دمای ۲۵ °C نشان داد که پس از زمان‌های۴، ۶ و۸ روز در نمونه‌های سس مایونز حاوی کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد تعداد باکتری‌ها کاهش زیادی داشت و نتایج آزمون آماری نشان می‌دهد که در هر کدام از زمان‌های نمونه برداری بین گروه‌های تیمار و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود دارد و این اختلاف از روز چهارم به

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. تأثیر کیتوزان بر باکتری *L. plantarum* در سس مایونز (دمای ۲۵ °C)



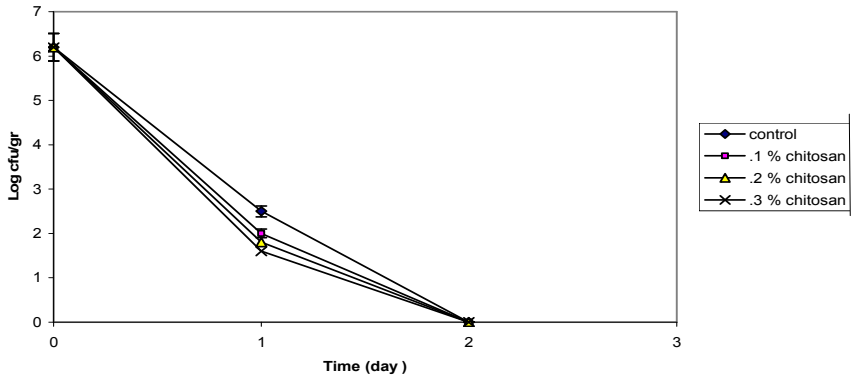
شکل ۲. تأثیر کیتوزان بر باکتری *L. plantarum* در سس مایونز (دمای ۵ °C)

بعد به‌طور مشخصی بروز می‌کند. در شکل ۱ روند کاهش تعداد باکتری‌ها در گروه‌های تیمار به خوبی نشان داده شده‌است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که در گروه‌های تیمار حاوی ۰/۱٪ کیتوزان به میزان ۲/۲log، در گروه‌های حاوی ۰/۲٪ کیتوزان به میزان ۴/۱۵ log و در گروه‌های حاوی ۰/۳٪ کیتوزان به میزان ۵/۲ log کاهش در تعداد باکتری‌ها نسبت به شاهد پس از ۸ روز نگه‌داری می‌گردد و با افزایش غلظت کیتوزان تعداد باکتری‌ها به نسبت بیشتری کاهش می‌یابد. نتایج بررسی تأثیر کیتوزان بر باکتری لاکتوباسیلوس در دمای ۵ °C در شکل ۲ نشان داده شده‌است. این نتایج نشان می‌دهد که در زمان صفر بین گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌دار مشاهده نمی‌شود بدین معنی که تعداد باکتری‌ها در زمان صفر در تمامی گروه‌ها تقریبا یکسان می‌باشد. اما پس از گذشت زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ روز با افزایش میزان کیتوزان مصرفی تعداد باکتری‌ها به نسبت بیشتری کاهش می‌یابد به‌طوری که پس از زمان دو روز بین گروه‌های تیمار اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نتایج کشت میکروبی پس از گذشت ۸ روز نیز نشانگر این است که با افزایش میزان کیتوزان مصرفی در گروه‌های تیمار میزان کاهش باکتری‌ها نسبت به گروه شاهد با هم متفاوت است. به‌طوری‌که غلظت ۰/۱٪ باعث کاهش ۲/۴ log، غلظت ۰/۲٪ باعث ۴/۶ log کاهش و غلظت ۰/۳٪ باعث ۵/۶ log کاهش در تعداد باکتری‌ها نسبت به گروه شاهد گردید.

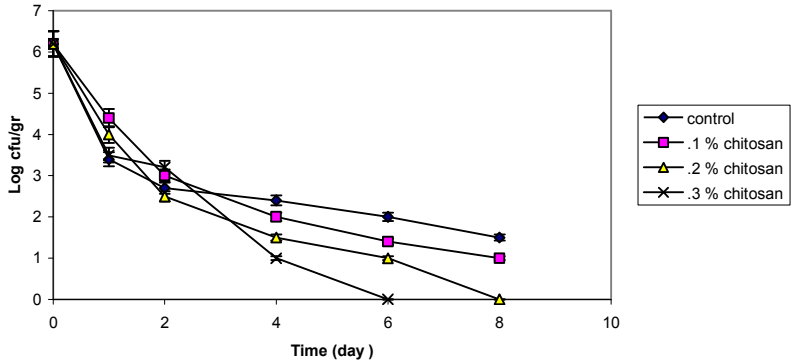
۶- بررسی تأثیر کیتوزان بر باکتری *S. enteritidis* در سس مایونز

نتایج حاصل از بررسی تأثیر کیتوزان بر باکتری سالمونلا در دمای ۲۵°C در شکل ۳ نشان داده شده‌است به‌طوری که جمعیت شاهد و تیمار پس از دو روز به صفر رسیده است. نتایج حاصل از شمارش میکروبی بیانگر آن است که پس از یک روز از زمان تلقیح بین نمونه‌های تیمار از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. این نتایج نشان می‌دهد که سرعت از بین

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳. تأثیر کیتوزان بر باکتری *S. enteritidis* در سس مایونز (دمای ۲۵°C)



شکل ۴. تأثیر کیتوزان بر باکتری *S. enteritidis* در سس مایونز (دمای ۵°C)

رفتن سالمونلا در دمای ۲۵ °C، بیش از دمای ۵°C است که موید نظریه کمیته بین‌المللی ایمنی میکروبیولوژیکی غذایی مصوب سال ۱۹۸۰ می‌باشد. این نظریه بیان می‌دارد که برای از بین رفتن سالمونلا در سس مایونز که در آن تخم مرغ غیر پاستوریزه به‌کار رفته، سس مایونز بایستی حداقل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۲-۱۹°C قرار گیرد.

بررسی‌های غلظت‌های مختلف کیتوزان بر باکتری سالمونلا در دمای ۵°C در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده این واقعیت است که تا روز دوم غلظت‌های مختلف کیتوزان باعث کاهش معنی‌دار در جمعیت این باکتری نسبت به نمونه شاهد نشدند اما پس از گذشت ۶ و ۸ روز بین جمعیت میکروبی تیمارهای حاوی ۰/۲ و ۰/۳ درصد کیتوزان و نمونه شاهد اختلاف معنی‌دار به‌وجود آمد. هم‌چنین غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان پس از گذشت ۸ روز و غلظت ۰/۳ درصد کیتوزان پس از گذشت ۶ روز قادر به نابود ساختن تمامی جمعیت سالمونلا در سس مایونز شدند. به علت این‌که pH سس مایونز شرایط را برای رشد گونه سالمونلا نامساعد می‌کند در نمونه شاهد نیز با گذشت زمان در جمعیت اولیه سالمونلاکاهش مشاهده می‌شود.هم‌چنین این نتایج نشان داد که کیتوزان تولیدی علیه *S. enteritidis* موثرتر عمل کرده و تعداد این باکتری در سس مایونز نسبت به باکتری *L. plantarum* به میزان بیشتری کاهش یافته است. در این شرایط شانس زنده ماندن و رشد باکتری *S. enteritidis* نسبت به *L. plantarum* کمتر خواهد بود. در رابطه با قدرت ضد میکروبی کیتوزان در مواد غذایی عوامل مختلفی تأثیر دارند. رولر و کویل (۲۲)، ساواراد وهمکاران (۲۳) و وانگ (۲۷) عواملی چون pH، دمای نگه‌داری، سن میکروارگانیسم، غلظت نمک‌ها و ترکیب ماده غذایی را بر قدرت ضد میکروبی کیتوزان موثر دانسته‌اند.

Archive
www.SID.ir

۷- مقایسه قدرت ضد میکروبی کیتوزان در دماهای ۵°C و ۲۵°C

بررسی میزان کاهش جمعیت میکروبی لاکتوباسیلوس تیمارهای حاوی مقادیر مختلف کیتوزان در دو دمای ۵ °C و ۲۵ °C نشان می‌دهد که در دمای ۵ °C کیتوزان قادر به کاهش میزان بیشتری از جمعیت میکروبی نسبت به دمای ۲۵ °C بوده است. در مورد تأثیر کیتوزان بر باکتری سالمونلا در دماهای ذکر شده، بالا بودن سرعت کاهش جمعیت میکروبی در دمای ۲۵ °C را نمی‌توان دلیل بالاتر بودن قدرت ضد میکروبی کیتوزان در دمای مذکور نسبت به دمای ۵ °C دانست. در کل می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کیتوزان دارای قدرت ضد میکروبی بالاتری در دمای ۵ °C نسبت به دمای ۲۵ °C می‌باشد.

بحث

با توجه به این نکته که کشور ما از نظر دستیابی به منابع دریایی غنی می‌باشد. ایجاد صنایع تبدیل ضایعات میگو و تولید محصولاتی از قبیل کیتین و کیتوزان می‌تواند در جهت اشتغال زایی بخصوص در مناطق جنوب کشور گام مهمی محسوب شود. بررسی اثرات ضد میکروبی کیتوزان تولیدی نشان داد که این ماده قادر است خواص بازدارندگی علیه هر دو باکتری *S. enteritidis* و *L. plantarum* از خود نشان دهد بدین ترتیب که بررسی‌های به عمل آمده در زمینه تأثیر این ماده روی باکتری‌های ذکر شده نشان داد که مصرف کیتوزان سبب کاهش شدیدی در تعداد اولیه باکتری‌ها با گذشت زمان نسبت به شاهد گردید. مکانیسم ضد میکروبی کیتوزان هنوز به‌درستی شناخته نشده است و دانشمندان دو تئوری را در این زمینه پیشنهاد داده‌اند:

الف) کیتوزان با استفاده از خاصیت پلی کاتیونی خود توانایی شلاته کردن فلزات و عناصر ضروری و خارج کردن آنها از دسترس باکتری‌ها را دارد.

ب) کیتوزان از طریق تشکیل پیوند با آنیون‌های دیواره سلولی باکتری‌ها، سبب تخریب دیواره سلولی آنها می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق به‌طور واضح نشان دهنده امکان کاربرد کیتوزان به عنوان یک ماده ضد میکروب در غذاهای اسیدی می‌باشد. در نهایت به‌منظور دستیابی به محصولی که از نظر ویسکوزیته، ایمنی میکروبی و خواص ارگانولپتیک مطلوب باشد کاربرد مقدار ۰/۲ درصد کیتوزان در سس مایونز پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از همه کارکنان بخش علوم و صنایع غذایی و مسئولین پژوهشی و آموزشی دانشگاه شیراز که در تأمین امکانات لازم و مراحل اجرایی این پژوهش همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. بصیری، ع. ۱۳۷۳. *طرح‌های آماری در علوم کشاورزی*. انتشارات دانشگاه شیراز.

۲. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.آزمون‌های شیمیایی سس مایونز. استاندارد شماره ۲۴۵۴، چاپ دوم، صفحات ۱-۶.

۳. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ویژگی‌های میکروبی و روش آزمون سس مایونز. استاندارد شماره ۲۹۶۵، چاپ دوم، صفحات ۱-۸.

4. Ahmad Khan, T., K. Peh. and H. S. Chang. 2002. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. J. Pharm. Phaceut. Sci. 5(3):205-212.
5. Benjakoul, S., W. Viessanguan, M. Tanaka, S. Ishizaki, R. Suthdham and O. Sugpech. 2000. Effect of chitin and chitosan on gelling properties of surimi from barred garfish (*Hemiraphus far*) J. Sci. Food Agric. 81(1): 102-108.
6. Chang, K. L. and G. Tsai. 1997. Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melantho*) shell waste. J. Agric. Food Chem. 45(5): 1900-1904.
7. Chen, C. S., W. Y. Liau and G. I. Tsai. 1998. Antibacterial effects of N-sulfunated and N- sulfobenzoyl chitosan and

Archive of SID

www.SID.ir

application to oyster preservation. J. Food Prot. 61(9): 1124-1128.
8. Coma, V., A. Martial, S. Grreau, A. Copinet, F. Salin and A. Deschamps. 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. J. Food Sci. 67(3): 1162- 1168.
9. DeMan, J. M. 1980. Principles of Food Chemistry. 2nd ed. Van Nostrand, Reinhold, London.
10. Dominic, V. S. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. 2nd ed. Van Nostrand, Reinhold. London.
11. Dyle, M. P., L. R. Beuchat and T. J. Montvill. 2001. Food microbiology (Fundamentals and Frontiers) 2nd ed., ASM Press, Washington. D.C.
12. Erickson, J. P., D. N. Mckenna and J. Bloom. 1993. Fate of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and indigenous spoilage microorganisms in home – style salads prepared with commercial real mayonnaise or reduced calorie mayonnaise dressinsg. J. Food Prot. 56(12): 1015- 1021.
13. Farag, R. S., Z. Y. Daw, F. M. Hewedi and G. S. A. El- Baroty. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food Prot. 52(5): 665-667.
14. Ghaouth, A. E., J. Arul, R. Ponampalm and M. Boulet. 1991. Chitosan coating effect of storability and quality of fresh strawberries. J. Food Sci. 56: 665-667.
15. Gould, G. W. 1996. New Methods of Food Preservation. Blakie Academic and Professional, London.
16. Heu, M. S., J. S. Kim and F. Shahidi. 2003. Components and nutritional quality of shrimp processing by products. Food Chem. 82:235-242.
17. Ismaiel, A. A. and N.D. Pierson. 1990. Inhibition of germination, outhgrowth and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. J. Food Prot. 53(6): 755-758.
18. Nakamura, S., A. Kato and N. Kobayashi. 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme – dextran conjugate. J. Agric. Food Chem. 39(2): 647-650.
19. No, H. K., N. Y. Park, S. H. Lee and S. P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int. J. Food Microbiol. 74 : 65-72.
20. Nychas, G. J. E. 1996. New Methods of Food Preservation. 2nd ed., Blackie Academic and Professional, London.
21. Roller, S. and N. Covil. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. Int. J. Food Microbiol. 47: 66 – 67.
22. Roller, S. and N. Covil. 2000. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise- based shrimp salads. J. Food prot. 63(2): 202-209.
23. Savard, T., C. Beaulieu, I. Bucher and C. P. Chapgane. 2002. antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. J. Food Prot. 65(5): 825-833.
24. Shahidi, F. and J. synwieki. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value added products from snow crab (*Chinocete sopilio*) and shrimp (*Pandalus boreqlis*) processing discards. J. Agric. Food Chem. 39(8):1532-1572.
25. Song, Y., E. Babiker, M. Yusai and A. Kato. 2002. Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates. Food Res. Int. 35: 459-466.
26. Tsai, G. J., Y. Z. Wu and W. H. Su. 2000. Antibacterial activity of chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. J. Food Prot. 63(6): 747- 752.
27. Wang, G. H. 1992. Inhibition and inactivation of foodborne pathogenes by chitosan. J. Food Prot. 55(11): 916-919.

Archive of SID

www.SID.ir