

رهایش ترکیب‌های ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین در مدل‌های غذایی

محبوبه کشیری^{۱*}، یحیی مقصدلو^۲ و مرتضی خمیری^۳

*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

پست الکترونیک: kashiri.m@gmail.com

۲- دانشیار، گروه تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۳- دانشیار، گروه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۳

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۳

چکیده

بسته‌بندی ضد میکروبی تکنولوژی جدیدی است که رهایش ترکیب‌های مؤثر آن رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی فاسدشدنی را کنترل می‌کند. در این پژوهش ترکیب‌های شیمیایی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) با استفاده از طیف‌سنج جرمی تعیین شد. کارواکرول (۳۷/۲٪) و تیمول (۲۸/۴٪)، از مهمترین ترکیب‌های قابل شناسایی اسانس آویشن شیرازی بودند. فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین حاوی ۱۰٪ اسانس آویشن شیرازی تولید شد. مقدار و سینتیک رهایش کارواکرول و تیمول از فیلم زیست فعال زئین در دو مدل غذایی (اسید استیک ۳٪ و اتانول ۱۰٪) در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ارزیابی شدند. فعالیت ضد میکروبی فیلم فعال زئین ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که رهایش ترکیب‌های فعال از بستر پلیمری تحت تأثیر محیط ماده غذایی قرار گرفت. میانگین رهایش کارواکرول و تیمول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محیط اسیدی در ۶۰ دقیقه نخست آزمون (به ترتیب ۱۱/۹۳±۱/۳۴ ppm و ۱/۴۰±۰/۰۶) در مقایسه با محیط اتانولی (به ترتیب ۷/۶۰±۰/۲۲ ppm و ۰/۹۸±۰/۰۲) بیشتر بود. تصاویر میکروسکوپ روبشی تأییدکننده نقش مدل غذایی بر ساختار فیلم زئین بود که این تغییر ساختاری زئین بر سرعت رهایش ترکیب‌های فعال اسانس در مدل‌های غذایی مؤثر بود. سرعت رهایش کارواکرول و تیمول با افزایش دما به ۳۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. فیلم زئین فعال در مدل غذایی اتانولی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از پایداری بهتری برخوردار بود. اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین علیه *Listeria innocua* و *Escherichia coli* به ترتیب ۲/۷۵ و ۳/۰۷ تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)، رهایش، بسته‌بندی، زئین، اسانس.

مقدمه

پایین و ساختار شیمیایی متفاوتی می‌باشند (Burt, 2004)؛
شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Boiss. (Suhr & Nielsen, 2003; Tajkarimi et al., 2010). آویشن

اسانس‌ها ترکیب‌هایی هستند قابل استخراج از گیاهان
(برگ، ساقه، ریشه، غده، میوه و گل) که دارای وزن مولکولی

نظیر استحکام، شفافیت، آب‌گریزی، مقاومت در برابر روغن، انعطاف‌پذیری و تراکم‌پذیری مطلوب نسبت داده شده است (Del Nobile *et al.*, 2008).

موضوع زیست پلیمرهای حامل دارو و چگونگی رهایش و مهاجرت ترکیب‌های فعال آنها در اوایل سال ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ میلادی مطرح شد. پدیده مهاجرت به معنای انتقال جرم ترکیب‌ها با وزن مولکولی پایین از بستر پلیمری به درون محصول غذایی بسته‌بندی شده اطلاق می‌گردد. پدیده مهاجرت در نتیجه نفوذ، انحلال و رسیدن به حالت تعادل انجام می‌شود (Crank, 1975). بر همین اساس نفوذپذیری پلیمرها نسبت به محیط آبی اطراف از نکات مهم در پدیده مهاجرت محسوب می‌گردد. این پدیده به نوبه خود در چگونگی بروز خواص ضد میکروبی می‌تواند نقش ایفا کند. رهایش ترکیب‌های فعال از بستر رهایش اسانس پونه‌کوهی در بستر پروتئین شیر (Oussalah *et al.*, 2004)، اسانس سیر در بستر کیتوزان (Pranoto *et al.*, 2005)، پونه‌کوهی و رزماری در بستر آب پنیر (Seydim & Sarikus, 2006)، تیمول در بستر زئین (Del Nobile *et al.*, 2008)، بوتیل هیدروکسی آنیزول در بستر پلی‌لاکتیک اسید (Manzanarez-López *et al.*, 2011) و لیزوزیم در بستر زئین (Güçbilmez *et al.*, 2007) نقش ماهیت پلیمر بر سینتیک رهایش ترکیب‌های ضد میکروبی را نشان می‌دهد. حضور ترکیب‌های مختلف نظیر آب، کربوهیدرات، چربی، پروتئین، ویتامین، فیبر و مواد معدنی در یک ماده غذایی و برهم‌کنش‌های احتمالی و ارزیابی مهاجرت ترکیب‌های فعال در محیط‌های واقعی را با مشکلاتی مواجه کرده است. از این رو مطالعات مهاجرت در مدل‌های شبیه‌سازی شده از مواد غذایی نظیر آب، اسید و اتانول توصیه شده است (Manzanarez-López *et al.*, 2011). بر این اساس ترکیب‌های فعال و رهایش از بستر پلیمرها در مدل‌های شبیه‌سازی شده یکسان نخواهند بود. از این رو نظر به اهمیت نقش ماهیت محصولات غذایی، نوع پلیمر و دمای انبارداری در عملکرد بسته‌بندی‌های ضد میکروبی، هدف از این پژوهش ضمن تولید و ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین و پاسخ به نگرانی‌های مصرف‌کنندگان و

گیاهی معطر از تیره نعناعیان و بومی مناطق گرم ایران، پاکستان و افغانستان می‌باشد (Moradi *et al.*, 2012). از مهمترین ترکیب‌های اسانس آویشن می‌توان به کارواکرول و تیمول اشاره کرد. این اسانس به‌عنوان ترکیبی ایمن و سالم، مورد تأیید سازمان غذا و دارو آمریکا قرار گرفته است (Guarda *et al.*, 2011).

بسته‌بندی ضد میکروبی، تکنولوژی است در حال توسعه که در زیرمجموعه بسته‌بندی فعال طبقه‌بندی می‌گردد که رهایش آرام ترکیب‌های ضد میکروبی، رشد میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی فاسد شدنی را کنترل می‌کند (Burt, 2004؛ Del Nobile *et al.*, 2008). خواص ضد میکروبی در سیستم بسته‌بندی فعال می‌تواند بر پایه ترکیب‌های غیر فرار یا فرار به صورت مجزا یا همزمان با ماده مؤثر کاربردی بروز کند. در بسته‌بندی فعال مبتنی بر ترکیب‌های ضد میکروبی غیر فرار، تماس مستقیم بین پلیمر بسته‌بندی و سطح مواد غذایی برای کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها ضروریست (Appendini & Hotchkiss, 2002؛ Vermeiren *et al.*, 2002؛ Han, 2005؛ Mascheroni *et al.*, 2010). در حالیکه در سیستم‌های بسته‌بندی حاوی ترکیب‌های فعال فرار کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تماس مستقیم بین پلیمر بسته‌بندی و محصول غذایی، تحت شرایط غیر مستقیم نیز امکان‌پذیر خواهد بود (Mascheroni *et al.*, 2010). به تعبیری دیگر کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها در این سیستم بسته‌بندی ضمن تبخیر ترکیب‌های فعال در فضای فوقانی محصول (Han, 2005) به پدیده انتشار پس از جذب نیز وابسته می‌باشد (Lopez Rubio *et al.*, 2004).

با توجه به نگرانی‌هایی در مورد سلامت مصرف‌کنندگان و مشکلات زیست محیطی ناشی از ضایعات جامد صنعت بسته‌بندی، گروه‌های تحقیقاتی متعددی در جستجوی یافتن پلیمرهایی سبز با هدف جایگزینی با پلیمرهای مصنوعی می‌باشند. زئین پروتئین ذخیره‌ای ذرت (*Zea mays* L.) است که در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر مورد استقبال فراوان قرار گرفته است (Ozcalik & Tihminlioglu, 2011). موفقیت کاربرد زئین به‌عنوان پلیمری صنعتی به ویژگی‌هایی

و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، دمای اتافک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف‌سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتابهای مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری انجام شد (Manzanarez-López *et al.*, 2011).

آماده‌سازی فیلم

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

ارزیابی رهایش ترکیب‌های فعال از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین در مدل‌های غذایی

رهایش ترکیب‌های فعال از فیلم مطابق قوانین اتحادیه اروپا در مدل غذایی اسید استیک (۳٪ حجمی-حجمی) و اتانول (۱۰٪ حجمی-حجمی) ارزیابی شد. در این تحقیق فیلم‌های وزن شده در ابعاد ۳ سانتی‌متر مربع در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در لوله‌های استاندارد در تماس با مدل غذایی قرار گرفتند. ضمن آنکه در طی آزمون تیوپ‌ها با استفاده از شیکر (سرعت ۸۰ دور در دقیقه) به آرامی تکان داده شدند. هر یک از فیلم‌ها در فواصل زمانی مشخص غلظت اسانس رها شده با

طرفداران محیط‌زیست، مطالعه رهایش ترکیب‌های فعال اسانس آویشن شیرازی از فیلم تولیدی در دو دما و دو مدل غذایی بود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل زئین (نیون)، اوساکای ژاپن، گلیسرول (اسکارلب، اسپانیا)، آویشن شیرازی، اتانول (اسکارلب، اسپانیا)، اسید استیک (اسکارلب، اسپانیا)، تیو فلورو استیک اسید، استونیتریل (اسکارلب، اسپانیا)، تریتون سوی برات (اسکارلب، اسپانیا)، تریتون سوی برات (اسکارلب، اسپانیا) و آب دیونیزه بودند. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش شامل *listeria innocua* CECT 934 (ATCC 19114) از دسته باکتری‌های گرم مثبت و *Escherichia coli* CECT 434 (ATCC 25922) از دسته باکتری‌های گرم منفی بودند که از مرکز کلکسیون میکروبی اسپانیا تهیه شدند. پژوهش نیز به روش زیر اجرا شد.

استخراج اسانس

سرشاخه‌های هوایی گیاه آویشن شیرازی قبل از گلدهی از استان فارس برداشت و پس از تأیید گروه گیاه‌شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با نام علمی آن *Zataria multiflora* Boiss. خشک شد. اسانس حاصل به روش تقطیر با بخار آب طی مدت ۳ ساعت با استفاده از سیستم کلونجر استخراج گردید. اسانس حاصل با سولفات سدیم بدون آب، آب‌گیری و در ظروف شیشه‌ای در بسته و دور از نور خورشید نگهداری شد.

آنالیز ترکیب‌های شیمیایی اسانس

آنالیز ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌ها توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد. دستگاه طیف‌سنج جرمی با ستون موئینه DB₅ به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه

اتاق تحت تأثیر شرایط اسیدی (اسید استیک ۳٪) و الکلی (اتانول ۱۰٪) قرار داده شدند. پس از اعمال تیمارهای فوق، نمونه‌ها در دسیکاتور حاوی پنتا اکسید فسفر خشک و در ادامه با استفاده از ازت مایع برش داده شدند و بر سطح جسمی مکعبی شکل مسی پوشانده شده با کربن فعال، به دقت چسبانده شدند و شکل‌شناسی سطح مقطع عرضی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در مقایسه با نمونه شاهد ارزیابی شد.

ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین ۰/۲۵ گرم از فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تربیتون سوی برات قرار داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (جمعیت میکروبی تقریبی 10^5 CFU/ml) اضافه و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد میکروب‌ها شمارش شدند (Muriel-Galet *et al.*, 2012).

استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تعیین شد. در این بررسی ستون کروماتوگرافی مورد استفاده C_{18} معکوس و در ابعاد $150 \times 3/9$ (میلی‌متر) و قطر ذرات ۲۰ میکرون بود. فاز متحرک شامل استونیتریل و آب در نسبت ۵۰: ۵۰ (حجمی-حجمی) و حاوی ۰/۱ تیوفلورو استیک اسید بود. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم نمونه تزریقی ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. زمان لازم برای خروج اسانس ۶ دقیقه تعیین گردید و شدت جذب در ۲۰۵ نانومتر خوانده شد (Muriel Galet *et al.*, 2013). میانگین ضخامت فیلم‌ها در هر ارزیابی تعیین و هر آزمون در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی شکل‌شناسی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) به منظور ارزیابی تغییرات شکل‌شناسی فیلم زئین در مدل‌های غذایی فیلم‌های زئین به مدت ۸ ساعت در دمای

جدول ۱- ترکیب‌های قابل شناسایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از طیف‌سنج جرمی

شخص بازدار	مقدار (%)	ترکیب
۹۳۰	۰/۳	-thujene
۹۳۷	۴/۳	-pinene
۹۷۶	۰/۶	-pinene
۹۸۵	۰/۹	myrcene
۱۰۲۴	۳/۳	p-cymene
۱۰۵۵	۷/۱	γ -terpinene
۱۰۹۰	۱/۶	linalool
۱۲۰۹	۰/۸	-terpineol
۱۲۳۶	۱/۵	thymol, methyl ether
۱۲۴۳	۳/۵	carvacrol, methyl ether
۱۲۹۵	۲۸/۴	thymol
۱۳۱۴	۳۷/۲	carvacrol
۱۵۸۲	۲/۳	globulol
-	۹۳/۹۵	مجموع

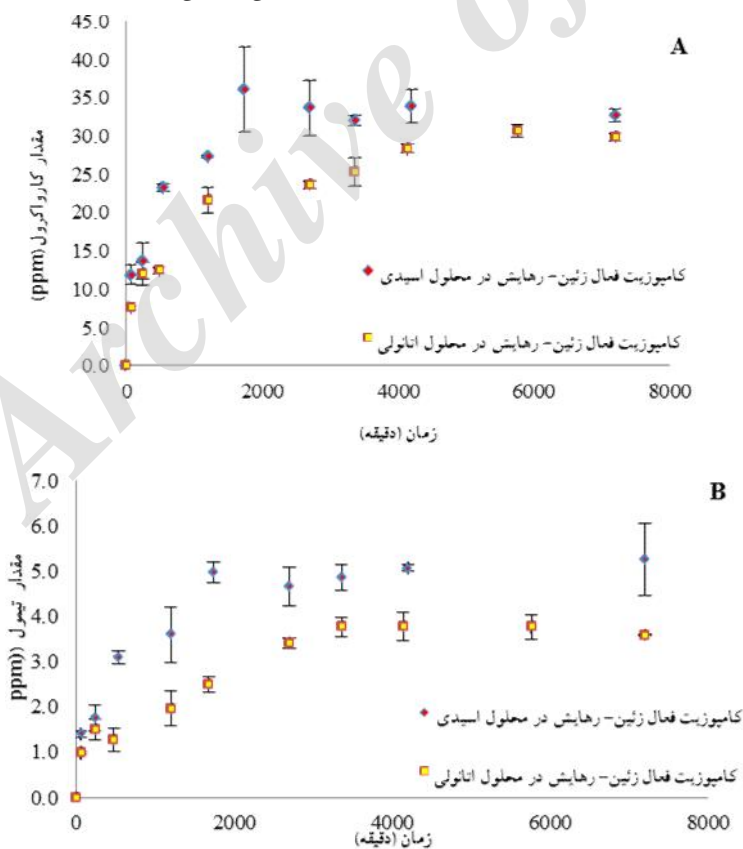
نتایج

بررسی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی نتایج تحلیل طیف‌سنجی جرمی اسانس آویشن در جدول ۱ خلاصه شده است. از بین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس، ۱۳ ترکیب شناسایی شد که ۹۳/۵٪ از آنها را شامل می‌شد. ترکیب‌های اصلی اسانس آویشن شیرازی شامل کارواکرول (۳۷/۲٪)، تیمول (۲۸/۴٪)، گاما-تریپنین (۷/۱٪) و لینالول (۱/۶٪) بودند. همچنین بازدهی اسانس آویشن شیرازی ۱/۲۱±۰/۳۹٪ براساس وزن خشک گیاه بود.

رهایش ترکیب‌های اسانس از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین در مدل‌های غذایی نتایج حاصل از مقدار رهایش کارواکرول از کامپوزیت فعال زئین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول اسید استیک ۳٪ در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین کارواکرول قابل اندازه‌گیری در محیط اسیدی در ۶۰ دقیقه

نخست آزمون برابر با $11/93 \pm 1/34$ قسمت در میلیون بود. با افزایش زمان مقدار رهایش کارواکرول از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین افزایش یافت، به طوری که پس از سپری شدن ۷۲۰۰ دقیقه مقدار رهایش کارواکرول به $33/67 \pm 0/86$ قسمت در میلیون رسید. همچنین مقدار رهایش کارواکرول از فیلم زیست فعال زئین در محلول اتانول ۱۰٪ طی ۶۰ دقیقه نخست آزمون برابر با $7/60 \pm 0/22$ قسمت در میلیون و در ۷۲۰۰ دقیقه $29/82 \pm 0/48$ قسمت در میلیون بود.

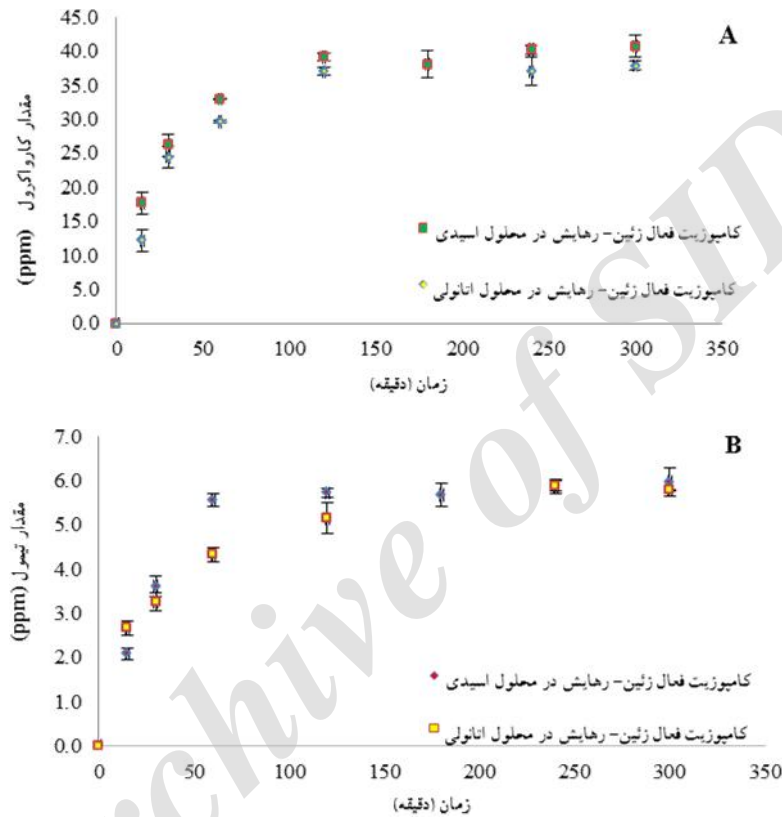
مقایسه مقدار رهایش تیمول و کارواکرول از زیست کامپوزیت فعال زئین حاوی ۱۰٪ اسانس آویشن شیرازی در محیط‌های اسیدی و اتانولی نشان داد که درصد رهایش تیمول از فیلم زیست فعال زئین در این مدل‌های غذایی در مقایسه با کارواکرول کمتر بود که با توجه به ماهیت اسانس آویشن شیرازی و فراوانی کارواکرول شناسایی شده با طیف‌سنجی جرمی مطابقت داشت (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- سینتیک رهایش کارواکرول (A) و تیمول (B) در مدل‌های غذایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

کارواکرویل و تیمول تا رسیدن به نقطه تعادل نیز در زمان ۳۰۰ دقیقه به ترتیب برابر $۳۹/۷۹ \pm ۱/۶۱$ و $۵/۹۸ \pm ۰/۳۲$ قسمت در میلیون تعیین شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که افزایش دما سبب افزایش سرعت رهایش تیمول و کارواکرویل و کاهش زمان لازم برای رسیدن به تعادل ترمودینامیکی شد.

سینتتیک رهایش تیمول و کارواکرویل از فیلم زیست فعال زئین در مدل غذایی اسیدی و اتانولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شکل ۲ نشان داده شده است. مقدار رهایش کارواکرویل و تیمول قابل اندازه‌گیری در محیط اسیدی در ۳۰ دقیقه نخست به ترتیب برابر با $۲۶/۱۶ \pm ۱/۶۱$ و $۳/۶۱ \pm ۰/۲۴$ قسمت در میلیون بود. حداکثر مقدار رهایش



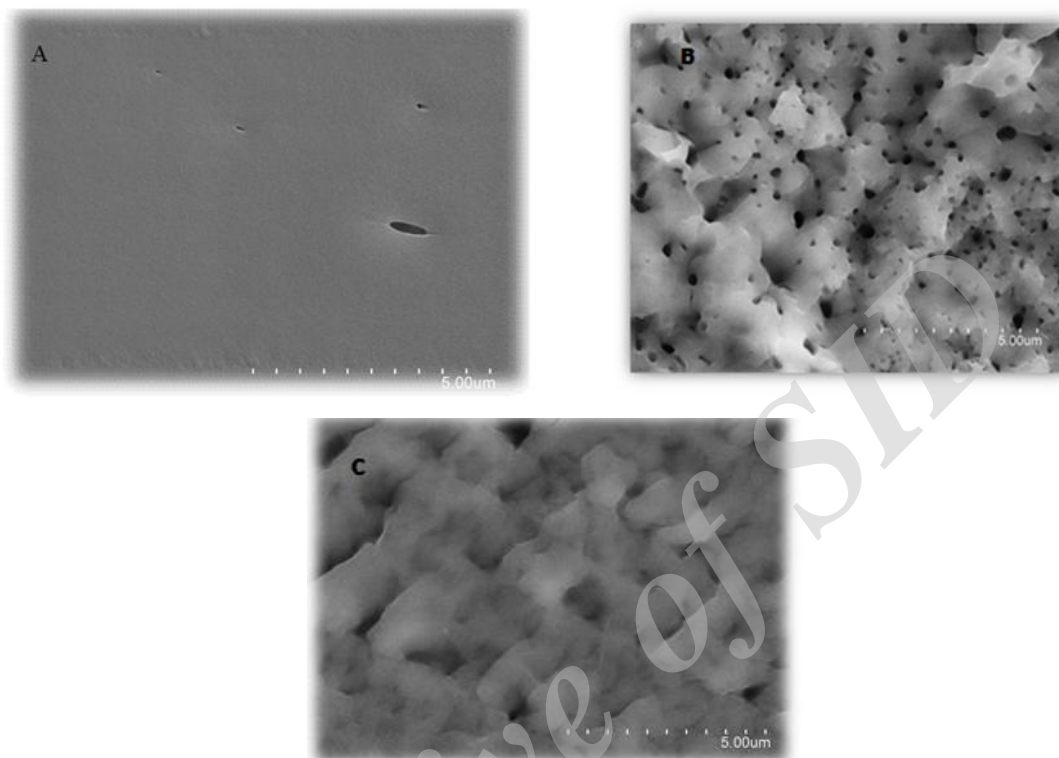
شکل ۲- سینتتیک رهایش کارواکرویل (A) و تیمول (B) در مدل‌های غذایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

بررسی شکل‌شناسی فیلم زیست کامپوزیت زئین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، تأثیر مدل شبیه‌سازی بر تغییرات شکل‌شناسی پلیمری زئین را نشان می‌دهد. همان‌طوری که در شکل (A) مشاهده می‌شود، فیلم زیست کامپوزیت زئین (نمونه شاهد) دارای ساختاری یکنواخت است. مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی شکل (A) ۳، (B) ۳ و (C) ۳ حکایت از آن دارد که تیمار اسیدی با افزایش فاصله بین مولکول‌ها و قطر منافذ در

بررسی اثرات تیمارهای اسیدی و اتانولی بر روند رهایش نشان داد که سینتتیک رهایش تیمول از فیلم زیست فعال زئین در محلول اسید استیک ۳٪ و محلول اتانول ۱۰٪ وابسته به زمان بود. سرعت رهایش ترکیب‌های مؤثر در ابتدا زیاد و پس از سپری شدن زمان مشخص کاهش و در نهایت با محیط به تعادل رسید که از این لحاظ مشابه سینتتیک رهایش کارواکرویل بود (شکل ۱ و ۲).

اتانولی بر ساختار فیلم زئین بسیار گسترده‌تر بود، که این تغییرات می‌تواند در چگونگی مکانیسم رهایش ترکیب‌های فعال در محیط‌های مختلف اثر معنی‌داری داشته باشد.

بستر زئین سبب تغییرات شگرف در ساختار فیلم زیست کامپوزیت زئین شده است (شکل ۳). همان طوری که مشاهده می‌شود، تأثیر محیط‌های اسیدی در مقایسه با محیط‌های



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از برش عرضی فیلم زئین شاهد (A)، تحت تیمار اسیدی (B) و تحت اتانول ۱۰٪ (C)

ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین اثر ضد میکروبی فیلم‌های زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی در محیط تلقیح شده با *Listeria innocua* و *Escherichia coli* پس از ۶ روز نگهداری در محیط مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. نتایج این تحقیق حکایت از آن بود که تعداد کلنی‌های قابل شمارش *Listeria innocua* و *Escherichia coli* به ترتیب ۲/۷۵ و ۳/۰۷ محاسبه شد (جدول ۲).

ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین اثر ضد میکروبی فیلم‌های زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی در محیط تلقیح شده با *Listeria innocua* و *Escherichia coli* پس از ۶ روز نگهداری در محیط مایع در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شدند. نتایج این تحقیق حکایت از آن بود که تعداد کلنی‌های قابل شمارش *Listeria innocua* و *Escherichia coli* به ترتیب ۲/۷۵ و ۳/۰۷ محاسبه شد (جدول ۲).

جدول ۲- اثر ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین در برابر *Listeria innocua* و *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria innocua</i>		نوع فیلم
LRV	Log CFU/ml	LRV	Log CFU/ml	
-	۶/۲۰±۰/۷۷	-	۷/۳۵±۰/۱۵	فیلم زیست کامپوزیت زئین شاهد
۳/۰۷	۳/۱۲±۰/۴۹	۲/۷۵	۴/۶۰±۰/۳۲	فیلم فعال زئین حاوی ۱۰٪ اسانس آویشن

بحث

تغییر فراوانی ترکیب‌های اسانس در یک گونه گیاهی می‌تواند ناشی از منطقه جغرافیایی، سن گیاه، روش خشک کردن و استخراج اسانس باشد (Bagamboula *et al.*, 2004). بر اساس گزارش Misaghi و Akhondzadeh (2007) Basti بیشترین ترکیب شناسایی شده از اسانس آویشن شیرازی استخراج شده از استان فارس، کارواکرول (۷۱/۱۲٪) بود و تیمولی نیز شناسایی نشد. در تحقیقی دیگر Sharififar و همکاران (2007) درصد کارواکرول (۶۱/۲۹٪) و تیمول (۲۵/۱۸٪) اسانس آویشن شیرازی استان یزد را متفاوت گزارش کردند. همچنین Moradi و همکاران (2012) مهمترین ترکیب‌های اسانس آویشن شیرازی استان فارس را تیمول (۶۴/۸۷٪) و کارواکرول (۴/۶۵٪) معرفی کردند، از این رو با توجه به اهمیت ترکیب‌های فعال اسانس در بروز خواص ضد میکروبی در بسته‌بندی فعال مواد غذایی شناسایی و طبقه‌بندی اسانس برای ارزیابی خواص ضد میکروبی ضروری است و در این تحقیق نیز بر اساس مونوتیرین‌های غالب شناسایی شده و مطابقت با گزارش Pina Vaz و همکاران (2004) اسانس آویشن شیرازی مورد استفاده در تیپ کارواکرولی- تیمولی طبقه‌بندی شد.

البته مطالعه چگونگی خروج ترکیب‌های فعال از بستر پلیمر در ارزیابی عملکرد یک سیستم بسته‌بندی فعال نقش بسزایی ایفا می‌کند. تورم پلیمر شرط لازم برای رهائش ترکیب‌های مؤثر از سیستم بسته‌بندی فعال است. رهائش ترکیب‌هایی با وزن مولکولی کم در بستر پلیمری بر اساس پدیده نفوذ آب از محلول آبی به درون بستر پلیمری، افزایش فاصله ماکرومولکول‌های آن و خروج ماده فعال از بستر به درون محیط آبی اطراف تشریح می‌گردد. قدرت نفوذ محلول‌های آبی به درون زنجیره‌ها و تحت تأثیر قرار دادن بستر پلیمری، نشأت گرفته از ماهیت پلیمر گزارش شده است (Mastromatteo *et al.*, 2009). مقایسه نتایج سرعت رهائش ترکیب‌های فعال از بستر زئین در این تحقیق نسبت به اتیلن وینیل الکل و کیتوزان حکایت از افزایش نسبی

زمان لازم برای رهائش ترکیب‌های فعال اسانس از فیلم فعال زئین بود. این بدان مفهوم است که فرایند جذب آب و تورم پلیمری آب‌گریزی نظیر زئین در مقایسه با پلیمرهای آب‌دوست کندتر بود. همان‌طوری که می‌دانیم از لحاظ کاربردی، افزایش مقاومت فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر در محیط‌های آبی از فاکتورهای بسیار مثبت تلقی می‌گردد. از طرفی دیگر با افزایش آب‌گریزی پلیمرها در سیستم بسته‌بندی فعال ضد میکروبی، قدرت جذب آب و رهائش ترکیب‌های افزودنی نظیر مواد ضد میکروبی به محیط اطراف محدود می‌گردد و احتمال حبس ترکیب‌های فعال درون زنجیره پلیمری افزایش می‌یابد. با مقایسه رهائش ترکیب‌های زیست پلیمری و بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌ها می‌توان بیان کرد که با وجود بروز مطلوب خواص ضد میکروبی فیلم‌های فعال زیستی اتیلن وینیل الکل و کیتوزان در مقایسه با زئین، از لحاظ کاربردی فیلم فعال زئین با رهائش قابل قبول در تماس مستقیم با مدل‌های غذایی، از دسته پلیمرهای نویدبخش در سیستم بسته‌بندی فعال محسوب می‌گردد.

افزایش دما سبب افزایش سرعت رهائش تیمول و کارواکرول و کاهش زمان لازم برای رسیدن به تعادل ترمودینامیکی شد که این شرایط متأثر از پدیده افزایش سرعت جذب آب و تورم بستر پلیمری زئین بود. مقایسه زمان لازم برای تعادل تیمول و کارواکرول در مدل‌های غذایی در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد حکایت از آن داشت که کاهش دما سبب تداوم طولانی‌تر رهائش تیمول و کارواکرول تا رسیدن به اوج نقطه رهائش شده است که این نکته از جنبه کاربردی بسیار مهم می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج Muriel Galet و همکاران (2013) مبنی بر تأثیر دما بر رهائش لوریل آرژنین اسید در فیلم اتیلن وینیل الکل در مدل‌های غذایی مشابه این تحقیق مطابقت داشت.

بررسی اثرات تیمارهای اسیدی و اتانولی بر روند رهائش نشان داد که روند سینتیک رهائش تیمول از فیلم زیست فعال زئین در محلول اسید استیک ۳٪ و محلول

منابع مورد استفاده

- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H., 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2): 113-126.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *Shigella flexner*. *Food Microbiology*, 21: 32-42.
- Beaufort, A., 2011. The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22(9): 1498-1502.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
- Calatayud, M., Lopez-de-Dicastillo, M., Lopez-Carballo M., Velez, D., Hernandez Munoz, P. and Gavara, R., 2013. Active films based on cocoa extract with antioxidant, antimicrobial and biological applications. *Food Chemistry*, 139: 51-58.
- Cooksy, K., 2005. Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Additives and Contaminants*, 22(10): 987-980.
- Crank, J., 1975. *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, Oxford, UK, 420p.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L. and Panza, O., 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, 89(1): 57-63.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, J. and Galotto, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2): 144-150.
- Güçbilmez, Ç.M., Yemenicio lu, A. and Arslano lu, A., 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food research international*, 40(1): 80-91.
- Han, J.H., 2005. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Academic Press, Manitoba, 503p.
- Lopez Rubio, A., Almenar, E., Hernandez Munoz, P., Lagaron, J.M., Catala, R. and Gavara, R., 2004. Overview of active polymer based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*, 20: 357-387.
- Manzanarez-López, F., Soto-Valdez, H., Auras, R. and Peralta, E., 2011. Release of -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4): 508-517.

اتانول ۱۰٪ وابسته به زمان بود. ضمن آنکه ترکیب‌های اسیدی با تأثیر بر ساختار پلیمر و افزایش تخلخل و باز شدن مسیرهای رهایش، پلیمرها را افزایش می‌دهند؛ از این‌رو، بر این اساس چگونگی سازوکار افزایش رهایش ترکیب‌های اسانس در محیط اسیدی تفسیر می‌گردد.

خواص ضد میکروبی فیلم به نوع ترکیب ضد میکروبی، ماهیت پلیمر و تعامل بین عوامل ضد میکروبی و پلیمر بستگی دارد. مقایسه کاهش جمعیت میکروبی فیلم زیست فعال زئین با سایر گزارش‌های تحقیقی حکایت از اثربخشی بیشتر فیلم فعال زئین اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با فیلم اتیلن وینیل الکل حاوی عصاره کاکائو (Calatayud *et al.*, 2013) بود. در حالیکه فیلم اتیلن وینیل الکل حاوی ۱۰٪ اسانس پونه‌کوهی از توانایی بالاتری در مقایسه با فیلم زئین حاوی ۱۰٪ اسانس آویشن شیرازی در کاهش جمعیت باکتریایی برخوردار بود (Muriel Galet *et al.*, 2012). *Listeria* در طیف وسیعی از محصولات غذایی آماده به مصرف بسته‌بندی نگهداری شده در شرایط، به‌عنوان عامل بیماری‌زا گزارش شده‌است (Beaufort, 2011; Newell *et al.*, 2010). روش‌های مختلفی برای مهار رشد میکروبی در مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفته است که در این میان استفاده از فیلم‌های ضد میکروبی همراه با سایر هردل‌ها ضمن حفظ کیفیت و طراوت محصول به‌عنوان یک مهارکننده نهایی رشد میکروارگانیسم‌ها معرفی شده‌است (Muriel Galet *et al.*, 2012). بنابراین نظر به اهمیت کنترل جمعیت میکروبی و تضمین امنیت مواد غذایی با تکیه بر رهایش ترکیب‌های فعال در مدل‌های غذایی می‌توان بیان کرد که فیلم زئین حاوی اسانس به‌عنوان تکنولوژی هردل در کنترل رشد لگاریتمی *Escherichia coli* و *Listeria innocua* در محیط آزمایشگاهی مثبت ارزیابی می‌گردد.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تشکر و قدردانی می‌گردد.

- Ozcalik, O. and Tihminlioglu, F., 2011. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 114(4): 505-513.
- Pina Vaz, C., Rodrigues, G.R., Pinto, E., Costa de Oliveira, S., Tavares, C., Salguero, L., Cavalerio, C., Goncalves, M.J. and Martinez de Oliveira, J., 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy Dermatology and Venereology*, 18: 73-78.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K. and Salokhe, V.M., 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Food Science and Technology*, 38(8): 859-865.
- Quintavalla, S. and Vicini, L., 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62(3): 373-380.
- Seydim, A. and Sarikus, G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food research international*, 39(5): 639-644.
- Sharififar, F., Mosha, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. and Khoshnoodi, M., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control*, 18: 800-805.
- Suhr, K.I. and Nielsen, P.V., 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94(4): 665-674.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J., 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*, 19: 163-171.
- Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L. and Piergiovanni, L., 2010. Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. *Journal of Food Engineering*, 98(3): 294-301.
- Mastromatteo, M., Barbuzzi, G., Conte, A. and Del Nobile, M.A., 2009. Controlled released of thymol from zein based film. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 222-227.
- Misaghi, A. and Akhondzadeh Basti, A., 2007. Effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control*, 18: 1043-1049.
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J. and Hadian, M., 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract. *Food Science and Technology*, 46(2): 477-484.
- Muriel Galet, V., Cerisuelo, J.P., Lopez-Carballo, G., Aucejo, S., Gavara, R. and Hernandez Munoz, P., 2013. Evaluation of EVOH-coated PP films with oregano essential oil and citral to improve the shelf-life of packaged salad. *Food Control*, 30: 137-143.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J.P., Lopez-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R. and Hernandez-Munoz, P., 2012. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 195-201.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H. and Kruse, H., 2010. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139: S3-S15.
- Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L. and Lacroix, M., 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18): 5598-5605.

Release of antimicrobial components of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil from bio active zein film into food simulants

M. Kashiri^{1*}, Y. Maghsoudlou² and M. Khomeiri³

1*- Corresponding author, Department of Food Technology, Faculty of Food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: Kashiri.m@gmail.com

2- Department of Food Technology, Faculty of Food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Department of Food Microbiology, Faculty of Food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: December 2014

Revised: February 2015

Accepted: February 2015

Abstract

Antimicrobial active packaging is a novel technology that controls the growth of microorganisms in perishable food products with releasing of active components. In this work, the chemical composition of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil (ZEO) was analyzed by GC/MS. The main components of the essential were carvacrol (37.22%), thymol (28.44). Active bio composite of zein films, containing 10% essential oils of thyme, were developed. Kinetics release of the active compound is strongly related to food models. The kinetics and extent of carvacrol and thymol mass transport within the packaging components were evaluated by using high performance liquid chromatography from bioactive films zein into simulants (10% ethanol and 3% acetic acid) at 4°C and 37°C. The antibacterial activity of active zein films was evaluated. The results of this studied indicated that the release of the active compound was strongly related to food models. The extent of releasing of carvacrol and thymol after 60 min at 4°C in acid simulant (11.93±1.34 and 1.40±0.06ppm, respectively) was more than that of ethanol simulant (7.60±0.22 and 0.98±0.02ppm, respectively). SEM observations confirmed the influence of food simulants on structure of zein, related to releasing of active components of essential oil into food simulants. The releasing rate of carvacrol and thymol increased with increasing the temperature to 37°C. Active zein film containing 10% ZEO was more stable in ethanol simulant at 4°C. The log reduction value of zein bioactive composite film against *Listeria innocua* and *Escherichia coli* were calculated to be 2.75 and 3.07, respectively.

Keywords: *Zataria multiflora* Boiss., release, packaging, zein, essential oil.