

# ارزیابی خواص ضد باکتریایی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی

محبوبه کشیری<sup>1\*</sup>، یحیی مقصودلو<sup>1</sup>، مرتضی خمیری<sup>1</sup> و ربیع بهروز<sup>2</sup>

1- اعضاء هیات علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان  
2- عضو هیات علمی گروه چوب و کاغذ، دانشگاه تربیت مدرس نور  
(تاریخ دریافت: 92/10/23 تاریخ پذیرش: 93/4/8)

## چکیده

ترکیبات شیمیایی آویشن شیرازی با هدف کاربرد اسانس گیاهی به عنوان ترکیب ضد باکتری طبیعی در فیلم زیست فعال زئین با استفاده از طیف سنج جرمی تعیین گردید. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس در برابر لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای با روش چاهک میکروپلیت و تبخیر اسانس در فضای خالی ارزیابی شد. فیلم زیست کامپوزیت زئین حاوی 5 و 10 درصد اسانس آویشن شیرازی تولید و فعالیت ضد میکروبی آنها در فاز بخار و در تماس مستقیم با محیط مایع تعیین شد. کارواکرول و تیمول به عنوان مهم ترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی شناسایی شدند. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی ترکیبات فوق الذکر علیه لیستریا مونوسایتوژنز (به ترتیب 500 و 1000 میکروگرم در لیتر) بود که در مقایسه با اشرشیا کلای بسیار موثرتر بود. لیستریا مونوسایتوژنز در مقایسه اشرشیا کلای در فاز بخار اسانس از حساسیت بیش تری برخوردار بود. بالاترین منطقه بازدارندگی فاز بخار اسانس در غلظت 10 درصد و مقابل لیستریا مونوسایتوژنز مشاهده شد. بخار اسانس در غلظت 5% در ترکیب فیلم فاقد قدرت بازدارندگی در برابر باکتری بود، علاوه بر این غلظت 10% اسانس فقط قادر به کاهش دانسیته میکروبی گردید اندیس لگاریتم کاهش فیلم زیست فعال زئین با افزایش غلظت اسانس در تماس مستقیم افزایش معنی داری یافت. تحقیق حاضر نشان داد که پتانسیل اسانس آویشن شیرازی به عنوان یک افزودنی طبیعی در ترکیب با زئین و تولید فیلم ضد میکروبی برای کاربردهای غذا مطلوب بود.

**کلید واژگان:** بسته بندی ضد میکروبی، زئین، اسانس

## 1- مقدمه

اثرات زیان‌بار نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی مصرف‌کنندگان سبب افزایش تمایل کاربرد انواع ترکیبات طبیعی گردیده است. ترکیبات ضد میکروبی در تماس مستقیم ماده غذایی و یا به طور غیر مستقیم با قرار دادن در بسپارهای بسته‌بندی قادر به کاهش یا به تاخیر انداختن رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشند [1]. که روش اخیر از رهیافت جدید در حوزه بسته‌بندی در زیر مجموعه بسته‌بندی فعال محسوب می‌شود. بسته‌بندی ضد میکروبی یک نوع بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد به طوری که این تداوم رهایش ترکیبات ضد میکروبی، اجازه رشد به سلول‌های ترمیم یافته میکروبی را نخواهد داد. بنابراین از بسته‌بندی ضد میکروبی به عنوان یک تکنولوژی هرذل جهت افزایش امنیت و بهبود کیفیت مواد غذایی یاد می‌شود [2].

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* Bois گیاهی معطر از تیره نعناعیان و بومی مناطق گرم ایران، پاکستان و افغانستان می‌باشد [3]. مهم‌ترین ترکیبات اسانس آویشن و پونه کوهی، کارواکرول و تیمول است [4]. که به عنوان ترکیبی ایمن و سالم مورد تایید سازمان غذا و دارو آمریکا قرار گرفته است [1]. اثرات ضد میکروبی این اسانس بر استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلای [5]، [6]، سالمونلا تایفی موریوم [7]، شیگلا [8]، لیستریا مونوسایتوزنز [9] و کپک و مخمر [10] مورد بررسی قرار گرفته است. از یافته‌های علمی در حوزه کاربرد اسانس در تولید فیلم‌های ضد میکروبی می‌توان به تأثیر اسانس آویشن شیرازی در کیتوزان [3]، پلی‌ساکارید محلول سویا [6]، کاپا کاراگینان [11]، اسانس پونه کوهی در چهار بسپار اتیلن‌وینیل‌الکل [2]، ایزوله سویا [12]، ژلاتین [13] و تریتیکاله [4] هم‌چنین کارواکرول در بستر کیتوزان [14]، تیمول و کارواکرول در بستر پلی‌پروپیلن [1] اشاره کرد که علاوه بر نوآوری در بخش علمی، در مقیاس صنعتی مورد استقبال مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان جهت به حداقل رساندن آلودگی‌های سطحی در مواد غذایی و کاهش نرخ رشد میکروارگانیسم‌ها قرار گرفته است [4]. علی‌رغم گزارشات متعدد از ارزیابی فیلم ضد میکروبی بر مبنای تماس مستقیم بین میکروارگانیسم و عوامل

ضد میکروبی، تحقیقات اندکی در خصوص قدرت بازدارندگی فاز بخار اسانس بدون تماس مستقیم انجام شده است [11]. لویز و همکاران (2011) و علی‌آبادی و همکاران (2014) قدرت ضد باکتریایی فاز بخار اسانس را مورد تایید قرار دادند [11] و [15]. خواص ضد میکروبی یک فیلم بسته‌بندی تحت تأثیر نوع ترکیب ضد میکروبی، ماهیت بسپار و تعامل بین ترکیبات ضد میکروبی و بسپار قرار دارد [16]. بدین مفهوم که ترکیب ضد میکروبی فراری نظیر اسانس، بسته به قدرت تبخیر ترکیبات تشکیل دهنده آن و هم‌چنین امکان اجازه خروج از بسپار می‌تواند از طریق فضای خالی بسته و یا در تماس مستقیم به محیط اطراف رهایش یابد [16]. لذا با توجه به عدم تشابه سرعت رهایش و تبخیر ترکیبات ضد میکروبی در بسپارهای آب دوست و آب گریز، بروز خواص ضد میکروبی طی دوره نگهداری در این بسپارها نیز یکسان نخواهد بود.

نظر به کاهش مشکلات زیست محیطی ناشی از مصرف فیلم‌های بسته‌بندی مشتق شده از منابع فسیلی، بسپارهای طبیعی به‌عنوان جایگزین امیدبخش مطرح می‌باشند [17]. ظرفیت تولید جهانی پلاستیک‌های زیستی در سال 2010 میلادی 724 هزار تن گزارش شده است [18]. انجمن زیست پلاستیک اروپا افزایش رشد تولید این محصولات را به بیش از دو برابر در سال 2015 تخمین زدند [18]. پتانسیل تولید جهانی این پلاستیک‌ها، بر اساس گزارش چشم‌انداز توسعه زیست پلاستیک‌ها در سال 2020، بیش از 3/45 میلیون تن پیش‌بینی شده است [19]. زئین، زیست پلاستیک صنعتی غیر قابل حل در آب و محلول در اتانول الکل است [17]. در دو دهه اخیر این بسپار به‌سبب قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری و توانایی تولید فیلم مناسب به‌روشن غلطک‌زنی و پرس داغ مورد استقبال فراوان در صنایع بسته‌بندی قرار گرفته است [20]. در حقیقت زیست پلاستیک زئین می‌تواند پاسخ‌گو نیاز تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان علاقه‌مند به استفاده از منابع تجدیدپذیر و جایگزین پلاستیک‌های نفتی باشد [21].

نظر به اهمیت نقش ماهیت بسپار در قدرت رهایش ترکیبات ضد میکروبی هدف از این تحقیق تولید فیلم ضد میکروبی بر پایه زئین با استفاده از اسانس آویشن شیرازی و ارزیابی اثر بخشی

غلظت اسانس بر رشد اشرشیا کلی و لیستریا مونوسیتوزنز در فاز بخار اسانس و در محیط مایع بود.

## 2- مواد و روش ها

### 2-1- مواد

زئین شرکت تولیدی مواد شیمیایی نیون (وساکای ژاپن)، گلیسرول (اسکارلو، اسپانیا)، گیاه آویشن شیرازی، تربیتوز سوی برات (اسکارلب، اسپانیا)، تربیتوز سوی آگار (اسکارلب، اسپانیا).

### 2-2- مراحل انجام کار

#### 2-2-1- مرحله اول: استخراج و ارزیابی ترکیبات

##### شیمیایی اسانس آویشن

اسانس از سر شاخه های هوایی خشک شده گیاه آویشن شیرازی پس از تایید گروه گیاه شناسی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی با نام علمی آن *Zataria multiflora* Boiss. به روش تقطیر با بخار آب در مدت 3 ساعت با استفاده از سیستم کلونجر استخراج شد. میزان بازدهی اسانس 1/51 درصد وزن خشک گیاه بود. اسانس حاصل با سولفات سدیم بدون آب، آب گیری و پس از عبور از میکرو فیلتر 0/45 میکرومتر در ظروف شیشه ای دربسته دور از نور خورشید نگهداری شد. آنالیز ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی انجام شد. دستگاه طیف سنج جرمی از نوع Agilent6890 با ستون موئین DB<sub>5</sub> به طول 30 متر و قطر داخلی 250 میکرومتر و ضخامت لایه داخلی 0/25 میکرومتر، با برنامه دمایی 50 تا 265 درجه سانتی گراد و با افزایش تدریجی 2/5 درجه سانتی گراد در دقیقه و نگهداری ستون در 265 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه، دمای اتاق تزریق 250 درجه سانتی گراد و سرعت جریان گاز هلیم 1/5 میلی لیتر در دقیقه بود. طیفسنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی با انرژی یونیزاسیون 70 الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 250 درجه سانتی گراد بود. شناسایی طیفها به کمک شاخص بازداری و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

### سازي تلقیح باکتریایی و 2-2-2- مرحله دوم: آماده

#### ارزیابی خواص ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی

در تحقیق حاضر سویه های باکتریایی اشرشیا کلای (CECT34) از دسته باکتری های گرم منفی و لیستریا مونوسایتوزنز (CECT934) از دسته باکتری های گرم مثبت از مرکز کلکسیون میکروبی اسپانیا<sup>1</sup> انتخاب گردیدند. پس از فعال سازی سویه ها باکتریایی روی محیط تربیتوزسوی آگار، یک لوپ باکتری به 10 میلی لیتر تربیتوزسوی برات تلقیح و به مدت 18 ساعت در 37 درجه سانتی گراد نگهداری گردید (دانسیته نوری 0/9 در طول موج 600 نانومتر بیانگر ابتدای فاز سکون می باشد). در مرحله بعد برای رسیدن به فاز رشد لگاریتمی، 100 میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی آماده شده، در 10 میلی لیتر تربیتوزسوی برات رقیق و در دمای 37 درجه سانتی گراد تا حصول دانسیته نوری 0/2 (طول موج 600 نانومتر) نگهداری شد [6].

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد<sup>2</sup> اسانس آویشن از روش چاهک در میکرو پلیت استفاده شد. تربیتوز سوی برات به همراه 0/5 درصد آگار آگار و 5 درصد دی متیل سولفوکسید در آب مقطر حل و استریل شد. پس از خنک شدن، رقت سازی انجام شد. پلیت های 96 چاهکی به کمک توزیع 190 میکرو لیتر از محیط تربیتوز سوی برات و 10 میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی اشاره شده در فوق به هر یک از چاهک ها اضافه شد. موارد کنترل این آزمایش شامل کنترل مثبت (190 میکرو لیتر محیط فاقد اسانس و 10 میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی) جهت خنثی نمودن تأثیر ضد باکتریایی دی متیل سولفوکسید و نیز کنترل منفی برای هر چاهک (200 میکرو لیتر محیط حاوی اسانس و فاقد باکتری) در نظر گرفته شد هر غلظت در سه تکرار انجام شد. میکرو پلیت با درپوش استریل پوشانده و به مدت 60 ثانیه با 100 دور در دقیقه مخلوط و سپس در 37-35 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت گرم خانه گذاری شد. پس از این مدت زمان، رشد میکروبی و کدورت چاهک های حاوی اسانس و باکتری در مقایسه با چاهک های کنترل با اندازه گیری میزان

1-Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain)

2- Minimal Inhibitory Concentration (M.I.C)

موجود در اسانس، هر یک از پلیت‌ها با پارافیلیم محصور و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت نگهداری شدند [2].

فیلم‌های زیست کامپوزیت فعال بر پایه زئین به قطر 4 و 8 سانتی‌متر مشابه روش اشاره شده در فوق آماده و به درب پلیت‌ها برای ارزیابی خاصیت بازدارندگی بخار اسانس آویشن، بدون تماس مستقیم با میکروارگانیسم، چسبانده شدند و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. قطر منطقه بازدارندگی به عنوان نتیجه گزارش گردید.

### 2-2-5- مرحله پنجم - ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی

#### فیلم فعال زیست کامپوزیت زئین در محیط مایع

0/25 گرم از فیلم زیست کامپوزیت فعال حاوی اسانس آویشن در 10 میلی‌لیتر از محلول تریپتوز سوی برات در شرایط کاملاً استریل قرار داده شد و 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در فاز لگاریتمی (جمعیت میکروبی تقریبی  $10^5$  CFU/ml) اضافه شد و پس از 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری با توجه به کدورت محلول، رقت سازی و جهت شمارش تعداد میکروب‌ها در تریپتوز سوی آگار کشت داده شدند [2].

### 2-3- آنالیز آماری

در این تحقیق نتایج بررسی حاصل از رشد باکتریایی در محیط کشت مایع با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری 5 درصد انجام گرفت.

## 3- نتایج و بحث

### 3-1- ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی

بر اساس طیف‌سنجی جرمی انجام شده 14 ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شناسایی و در جدول 1 خلاصه شد.

جذب در طول موج 620 نانومتر تعیین گردید. چاهک‌های واجد کدورت از لحاظ رشد مثبت تلقی شدند و کم‌ترین غلظت اسانس که از رشد باکتری جلوگیری نمود و محیط موجود در چاهک مربوط به آن شفاف بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تلقی گردیدند [20]. در تعیین حداقل غلظت باکتری کشی<sup>1</sup> از رقت‌هایی که کدورتی در آن‌ها مشاهده نشد، در محیط تریپتوز سوی آگار کشت سطحی داده شدند و پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. غلظتی که هیچ کلونی قابل شمارش در آن مشاهده نگردید، به عنوان حداقل غلظت باکتری کشی تعیین گردید [22].

### 2-2-3- مرحله سوم - آماده‌سازی فیلم

ابتدا محلول 16 درصد وزنی - وزنی زئین در اتانول 80 درصد تهیه و به مدت یک ساعت در دمای 75 درجه سانتی‌گراد با سرعت 400 دور در دقیقه حرارت داده شد. در ادامه گلیسرول به عنوان نرم‌کننده (0/15 درصد وزن پلی‌مر) اضافه و به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کاملاً همگن شد. محلول حاصل روی صفحه شیشه‌ای پوشیده شده از ورقه نازک از پلی‌پروپیلن به طور یکنواخت پخش و در تونل مجهز به منبع حرارتی به مدت 20 دقیقه حرارت داده شد. ضخامت فیلم با استفاده از ریزسنج (میتوتوی، ژاپن) کنترل گردید. فیلم زئین فعال نیز مطابق روش فوق آماده شد، با این تفاوت که پس از افزودن گلیسرول به مدت 8 دقیقه عمل هم زدن صورت گرفت و در ادامه اسانس آویشن در سطح 5 و 10 درصد نسبت به وزن بسپار اضافه و به مدت 7 دقیقه به منظور پخش یکنواخت در محلول، هم زدن انجام شد.

### 2-2-4- مرحله چهارم - ارزیابی خاصیت بازدارندگی

#### بخار اسانس آویشن و فیلم زیست فعال زئین

100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های آماده شده، به طور یکنواخت با استفاده از سوآپ استریل، روی محیط کشت تریپتوز سوی آگار پخش گردید. دیسک‌های کاغذی استریل به سطح فوقانی پلیت‌ها چسبانده و اسانس آویشن در غلظت‌های متفاوت به آن اضافه شد. در ادامه جهت کاهش خروج ترکیبات فرار

جدول 1 ترکیبات قابل شناسایی اسانس آویشن شیرازی با استفاده از طیف سنج جرمی

شاخص بازداری	مقدار (%)	ترکیب
930	0/29	توزن
937	4/26	آلفا پینن
976	0/6	بتا پینن
985	0/85	بتا میرسین
1024	3/27	پی سیمن
1055	7/14	گاما ترپینن
1061	2/23	آلفا ترپینن
1090	1/63	لینالول
1209	0/77	آلفا ترپینول
1236	1/47	تیمول متیل استر
1243	3/49	کارواکرویل متیل استر
1314	37/22	کارواکرویل
1418	28/41	تیمول
1582	2/32	گلوبوبول
-	93/95	مجموع

ضد میکروبی، شناسایی دقیق از حیث گیاه‌شناسی و استاندارد کردن روش استخراج از نکات مهم است [23 و 26]. در غیر این صورت مقایسه نتایج به دست آمده از اسانس‌های گیاهی با مشکل روبرو خواهد گردید [8]. اسانس گونه‌های مختلف آویشن بر اساس مونوترپن غالب آن‌ها در سه تیپ تیمولی، کارواکرویل یا تیپ تیمولی - کارواکرویل طبقه‌بندی می‌شوند [27 و 28]. لذا بر اساس ترکیبات شناسایی شده، در تحقیق حاضر اسانس آویشن شیرازی در تیپ کارواکرویل - تیمولی طبقه‌بندی شد. علاوه بر ترکیبات اشاره شده در فوق اثرات ضد میکروبی آلفا پینن و لینالول بر اشرشیا کلای، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس ارئوس گزارش شده است [29] که در تحقیق حاضر نیز آلفا - پینن و لینالول حدود 5/86 درصد از اسانس را تشکیل داده که به نوبه خود می‌تواند بر خواص ضد میکروبی اسانس موثر باشد.

مشتملات فنیل پروپانویدها بیش‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی بودند. کارواکرویل (37/22 درصد) بیش‌ترین ترکیب شناسایی شده و پس از آن تیمول (28/41 درصد)، گاماترپینن (7/14 درصد) و آلفاپینن (4/26 درصد) بودند. خواص ضد میکروبی آویشن و پونه کوهی به حضور ترکیبات فنلی به ویژه تیمول و کارواکرویل بستگی دارد [8، 23 و 24]. اختلاف فراوانی این ترکیبات در اسانس استخراج شده می‌تواند ناشی از تأثیر منطقه جغرافیایی، سن گیاه، روش خشک کردن و استخراج اسانس باشد [8] که در این خصوص می‌توان به آنالیز ترکیبات شناسایی شده از اسانس آویشن شیرازی استان یزد (61/29 درصد کارواکرویل و 25/18 درصد تیمول) و اسانس آویشن شیرازی استخراج شده از استان فارس ( کارواکرویل 71/12 درصد و فاقد تیمول ) اشاره کرد [25]. هم چنین مرادی و همکاران (2013) نیز مهم‌ترین ترکیبات شناسایی شده اسانس آویشن شیرازی استان فارس را تیمول (64/87 درصد) و کارواکرویل (4/65 درصد) گزارش کردند [3]. نظر به تأثیر تغییرات کمی و کیفی اسانس استخراج شده گیاهان بر خواص

### 3-2- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل

#### کشندگی اسانس آویشن شیرازی

علی‌رغم استفاده از مواد نگهدارنده برای کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و عفونت مواد غذایی، امنیت غذایی چالشی مهم در صنعت است. در حال حاضر استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی جایگزین سالم و مناسب برای مواد شیمیایی می‌باشند. نظر به اثرات ضد باکتریایی قوی‌تر اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با دارچین، میخک و پونه کوهی که حداقل غلظت بازدارندگی بیش‌تر و حداقل کشندگی کم‌تری در مقابل لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای نشان داده‌اند [30]. لذا در تحقیق حاضر این اسانس مناسب تشخیص داده شد. بر اساس جذب نوری ناشی از رشد لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای در رقت‌های مختلف اسانس آویشن (شکل 1)، حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید. همان طوری که مشاهده می‌شود حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی در برابر لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای به ترتیب 500 و 1000 میکروگرم در لیتر بود.

که این اثر بخشی به ساختار کارواکول و تیمول، توانمندی این ترکیبات در برقراری پیوندهای هیدروژنی، ترکیب آن‌ها با سایر مونوترپن‌ها نظیر گاماترپنین‌ها و بروز اثرات سینرژیستی نسبت داده می‌شود که در نهایت منجر به بی‌ثباتی غشاء سلولی باکتری می‌گردد [30]. Elizaquivel و همکاران (2013) حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی (71/12 درصد کارواکول و 0/46 درصد کارواکول متیل اتر) در مقابل لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای را به ترتیب 0/02 و 0/03 درصد گزارش کردند که بیانگر اهمیت فراوانی کارواکول در بروز شدت اثرات ضد میکروبی بود [30]. هم چنین ارفا و همکاران (2006) به اثر بخشی قوی‌تر کارواکول نسبت به اتر متیل آن اشاره کردند [31]. در تحقیق حاضر نیز مقدار کارواکول متیل اتر (1/47 درصد) و تیمول متیل اتر (3/49 درصد) بود که در مقایسه با Elizaquivel و همکاران (2013) بیش‌تر و حداقل غلظت بازدارندگی باکتریایی این اسانس نیز بالاتر تعیین شد [30].

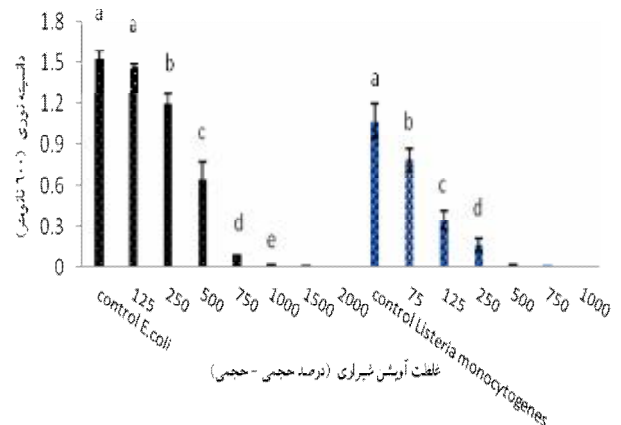
#### جدول 2 حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

	حداقل غلظت کشندگی	
	حداقل غلظت اسانس آویشن (ppm)	حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آویشن (ppm)
لیستریا	500	1000
مونوسایتوژنز		
اشرشیا کلای	1000	2000

### 3-3- خواص ضد میکروبی بخار اسانس آویشن

#### شیرازی

نتایج حاصل از تأثیر بخار اسانس در محیط جامد در جدول 3 نشان داده شده است.



شکل 1 متوسط جذب نوری مربوط به رشد لیستریا مونوسایتوژنز و اشرشیا کلای در غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی

## جدول 3 تأثیر مقدار اسانس آویشن شیرازی بر مهار رشد

باکتریایی در فاز بخار

محدوده بازدارندگی (سانتی متر)

لیستریا مونوسایتوزنز	اشرشیا کلای	اسانس آویشن شیرازی (میکرولیتر)
25	دارای محدوده بازدارندگی*	دارای محدوده بازدارندگی
50	7/25±0/17	دارای محدوده بازدارندگی
75	7/5±0/59	5/5± 0/52
100	8/75± 0/46	8/75± 0/32

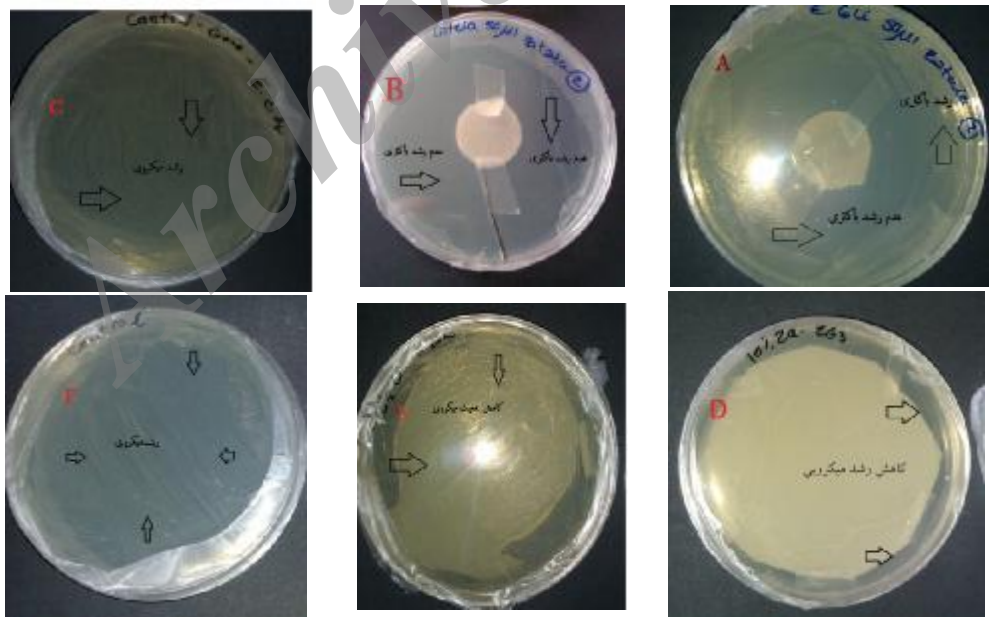
کاهش قابل مشاهده در دانسته میکروبی در سطح پلیت

بیشترین محدوده بازدارندگی باکتریایی ناشی از بخار اسانس در غلظت 100 میکرولیتر مشاهده شد. محدوده بازدارندگی بخار حاصل از 75 میکرولیتر اسانس در برابر لیستریا مونوسایتوزنز (7/5±0/59 سانتی متر) بیشتر از اشرشیا کلای (5/5±0/52 سانتی متر) بود. حداقل غلظت لازم اسانس برای بروز اثرات ضد میکروبی در برابر اشرشیا کلای بیش از 50 میکرولیتر بود. گزارش Tajkarimi و همکاران (2010) حاکی از تأثیر غلظت اسانس در اثر بخشی ضد باکتریایی بخار در محیط جامد بود [32] که با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر افزایش 59 درصدی

قدرت بازدارندگی بخار اسانس بر اشرشیا کلای با افزایش غلظت اسانس از 50 به 100 میلی لیتر در محیط جامد مطابقت داشت.

در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانسها در تماس مستقیم با محیط جامد، ضریب نفوذپذیری و قدرت انحلال آنها و در تماس غیر مستقیم اسانس با محیط جامد، میزان فراریت ترکیبات اسانس تعیین کننده شدت اثر خواهد بود [32]. اثرات ضد باکتریایی فاز بخار اسانس مرکبات [2 و 32] و پونه کوهی [2] مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس تحقیق این محققان حداقل غلظت بخار اسانس پونه کوهی (50 میلی گرم) برای بروز بازدارندگی کامل باکتریایی در مقایسه با اسانس مرکبات (7 میلی گرم) بیشتر بود [2]. لذا با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با گزارشات فوق می توان بیان داشت که حداقل غلظت مورد نیاز اسانس آویشن شیرازی برای بروز اثرات بازدارندگی در تماس فاز بخار نسبت به اسانس مرکبات و پونه کوهی بالاتر بود. همانطوری که در شکل 2 و جدول 3 مشاهده می شود، لیستریا مونوسایتوزنز در مقایسه با اشرشیا کلای از حساسیت بیشتری در برابر اسانس برخوردار بود. در تفسیر علت این پدیده می توان به حضور دیواره لیپو پلی ساکاریدی در باکتری های گرم منفی اشاره کرد که از ورود ترکیبات فعال به غشاء سیتوپلاسمی ممانعت به عمل می آورد [33].

شکل 2 تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر سطح دیسک کاغذی و در ترکیب فیلم زیست فعال زئین



A, B به ترتیب تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر سطح کاغذ صافی بر اشرشیا کلای و لیستریا مونوسایتوزنز

D, E به ترتیب تأثیر اسانس آویشن شیرازی در فیلم زئینی بر اشرشیا کلای و لیستریا مونوسایتوزنز

C, F به ترتیب اشرشیا کلای و لیستریا مونوسایتوزنز (شاهد میکروبی)

ضد میکروبی بروز دهند [34]. همان طوری که در جدول 4 مشاهده می شود، بخار اسانس فیلم زیست فعال زئین در غلظت 5 درصد و به قطر 4 سانتی متری، فاقد فعالیت ضد باکتریایی بود و افزایش غلظت اسانس (10 درصد) و سطح مقطع فیلم (8 سانتی متر) سبب کاهش دانسیته میکروبی در مقایسه با نمونه شاهد گردید (شکل 2). فیلم زیست کامپوزیت زئین بدون اسانس نیز فاقد هر گونه فعالیت ضد باکتریایی بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق با گزارش Muriel-Galet و همکاران (2012) مبنی بر افزایش شدت ضد میکروبی فاز بخار فیلم زیست فعال اتیلن وینیل الکل در مقایسه با اسانس در دیسک های کاغذی مطابقت نداشت [2]. این محققان بستر الحاق اسانس را در قدرت فراریت و انتشار آن مهم معرفی کردند.

همچنین وجود آنزیم های موجود در فضای پری پلاسمیک در باکتری های گرم منفی سبب شکستن ترکیبات ضد میکروبی و جلوگیری از ورود آن به درون سلول می گردد. این در حالی است که باکتری های گرم مثبت فاقد فضای پری پلاسمیک هستند و ترکیبات ضد میکروبی به آسانی سبب تخریب دیواره سلول و غشاء سیتوپلاسمی و خروج سیتوپلاسم از سلول می گردد [33].

### 3-4- خواص ضد میکروبی بخار اسانس در

#### ترکیب فیلم زیست فعال زئین

ترکیبات ضد میکروبی فرار از طریق مهاجرت در فضای موجود در بسته بندی و ترکیبات ضد میکروبی غیر فرار به صورت مواد حل شونده در تماس بین ماده بسته بندی و غذا می توانند اثرات

جدول 4 تأثیر غلظت اسانس آویشن شیرازی در فیلم زیست کامپوزیت زئین بر مهار رشد باکتریایی در فاز بخار

محدوده بازدارندگی					
قطر فیلم	نوع میکروارگانسیم	فیلم فاقد اسانس	فیلم حاوی 5% اسانس	فیلم حاوی 10% اسانس	دارای محدوده بازدارندگی
4 سانتی متر	لیستریا مونوسایتوزنز	-	-	-	-
	اشرشیا کلای	-	-	-	-
8 سانتی متر	لیستریا مونوسایتوزنز	-	-	-	دارای محدوده بازدارندگی*
	اشرشیا کلای	-	-	-	دارای محدوده بازدارندگی

\*کاهش قابل مشاهده در دانسیته میکروبی در سطح پلیت

برای بهبود اثرات ضد میکروبی از طریق فاز بخار ضروری به نظر می رسد.

### 3-5- خواص ضد میکروبی فیلم زیست فعال

#### زئین در محیط مایع

با توجه به عدم کارایی لازم بخار اسانس آویشن در ترکیب فیلم زئین در برابر باکتری های مورد بررسی، در این تحقیق اثر ضد میکروبی فیلم فعال زئین در تماس مستقیم با محیط مایع در دمای 37 درجه سانتی گراد ارزیابی شد. همان طوری که در جدول 5 مشاهده می شود.

بدین مفهوم که دیسک های کاغذی با جذب ترکیبات اسانس سبب کاهش فعالیت ضد میکروبی در فاز تبخیر اسانس در مقایسه با فیلم آب دوست اتیلن وینیل الکل فعال گردیده است؛ لذا با استناد به تحلیل فوق کاهش فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن در ترکیب با فیلم زئین را می توان به ماهیت آب گریز این بسپار در مقایسه با دیسک های کاغذی و بسپار اتیلن وینیل الکل نسبت داد. بنابراین در بسپارهای آب گریز ضمن در نظر گرفتن سطح قابل پذیرش اسانس از لحاظ حسی، افزایش غلظت اسانس



جدول 5 اثرات ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین حاوی 5 و 10% اسانس آویشن شیرازی بر لیستریا مونوسیوتوزنر و اشرشیا کلای بیان شده با لگاریتم تعداد واحد کلنی ( $Log(CFU)$ ) و اندیس کاهش لگاریتمی (LRV)

	لیستریا مونوسیوتوزنر		اشرشیا کلای	
	Log CFU/ml	LRV	Log CFU/ml	LRV
شاهد میکروبی (A)*	9/06±0/02	-	9/11±0/36	-
5% اسانس آویشن	7/89±0/11	1/17 <sup>a</sup>	7/97±0/12	1/14 <sup>a</sup>
شاهد میکروبی (B)	8/95±0/03	-	9/51±0/33	-
10% اسانس آویشن	6/81±0/05	2/14 <sup>b</sup>	6/85±0/59	2/66 <sup>b</sup>

\* شاهد میکروبی A و B به ترتیب نمونه کنترل بار میکروبی فیلم حاوی 5 و 10% اسانس آویشن شیرازی  
\*\* حروف غیرمشابه در یک ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است ( $P < 0/05$ )

### 3- نتیجه گیری

فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن شیرازی در برابر لیستریا مونوسیوتوزنر و اشرشیا کلای بر اساس رهایش ترکیبات موثر در محیط مایع و تبخیر اسانس در محیط جامد مطلوب بود. لیستریا مونوسیوتوزنر در مقایسه با اشرشیا کلای از حساسیت بیش تری در برابر اسانس آویشن شیرازی برخوردار بود. غلظت اسانس مصرفی در بهینه سازی تولید فیلم ضد میکروبی بر پایه زئین به مراتب پیش تر از نتایج ارزیابی ضد باکتریایی اسانس بود. پتانسیل ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین بر پایه بخار اسانس آویشن شیرازی در محیط جامد مطلوب نبود؛ لذا در گسترش بسته بندی فعال برای کنترل باکتری های بیماری زا با تکیه بر تکنولوژی هردل، تماس مستقیم فیلم بسته بندی با ماده غذایی ضروری بود. فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین از خواص ضد میکروبی خوبی در محیط مایع برخوردار بود. با توجه به اهمیت کاربردی کاهش جمعیت باکتریایی در بسته بندی مواد غذایی در تضمین امنیت غذایی، افزایش غلظت اسانس آویشن (10 درصد) در فیلم زئین بسیار اثر بخش ارزیابی شد. اسانس آویشن در ترکیب با فیلم زئین، جایگزین مناسبی برای پاسخ به نگرانی های مصرف کنندگان و افزایش ارتقاء کیفیت مواد غذایی معرفی می گردد.

جمعیت اشرشیا کلای (شاهد)  $9/06±0/02$  Log (CFU/ml) و لیستریا مونوسیوتوزنر (شاهد)  $9/11±0/36$  Log (CFU/ml) بود. اندیس کاهش لگاریتمی<sup>1</sup> فیلم زیست فعال زئین حاوی 5 درصد اسانس در برابر لیستریا مونوسیوتوزنر و اشرشیا کلای به ترتیب 1/19 و 1/14 لگاریتم بود. اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست فعال زئین با افزایش غلظت اسانس به 10 درصد در برابر لیستریا مونوسیوتوزنر و اشرشیا کلای افزایش معنی داری نشان داد. در تطابق یافته های این تحقیق با سایر محققان می توان به کاهش جمعیت لیستریا مونوسیوتوزنر و اشرشیا کلای در فیلم اتیلن وینیل الکل حاوی 10 درصد اسانس پونه کوهی [2] و 7/5 درصد عصاره کاکائو [35] در محیط مایع اشاره کرد. مقایسه اندیس کاهش لگاریتمی تحقیق حاضر با گزارش Calatayud و همکاران (2013) حاکی اثر بخشی بیش تر اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با عصاره کاکائو بود [35]. همچنین مقایسه شدت کاهش لگاریتمی حاصل از این تحقیق و یافته های مولر گلت و همکاران (2012) نشان دهنده نقش نوع بسیار بر میزان رهایش ماده مؤثره و شدت کاهش جمعیت میکروبی بود. بدین مفهوم که اسانس موجود در ترکیب با اتیلن وینیل الکل با ماهیت آب دوستی در مقایسه با زئین، آسان تر به محیط مایع اطراف نفوذ می نماید و کاهش اندیس لگاریتمی در سطح بالاتری قرار داشت.

<sup>1</sup> Log Reduction Value (L.R.V)

heart infusion broth. Journal of veterinary research. 61(2): 135–141.

[8] 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 flexneri*. Food Microbiology. 21: 32–42.

[9] Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of *thyme essential oil*, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. Food Control. 35: 177–183.

[10] 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: 665–674.

[11] Aliabadia, S. S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A. and Ghasemlou, M. 2014. Characterization of k-carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. Carbohydrate Polymers. 101: 582–591.

[12] Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P. and Biliaderis, C. G. 2009. Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. Food Hydrocolloids. 24: 49–59.

[13] Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. and Farahmand Ghavi, F. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. Food Chemistry. 136: 1490–1495.

[14] Rubilar, J. F., Cruz, R. M. S., Silva, H. D., Vicente, A., AKhmelinskii, I. and Vieira, M. C. 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed Extract. Journal of Food Engineering. 115: 466–474.

[15] Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R. and Nerin, C. 2011. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected food borne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(17): 6939–6946.

#### 4- سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و اعضای گروه تحقیقاتی بخش بسته‌بندی IATA والنسیا جهت حمایت‌های خالصانه آن‌ها در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

#### 5- منابع

[1] 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: 144–150.

[2] 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.

[3] Moradi, M., Tajik, H., Razavi, M., 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: 477–484.

[4] Aguirrea, A., Borneoa, R. B. and Leon, A. E. 2013. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with *oregano essential oil*. Food Bioscience. 1: 2–9.

[5] Rasooli, I. and Mirmostaf, S. A. 2002. Antimicrobial properties of *Thymus pubescens*, *Thymus sepyllum* essential oils. Fitoterapia. 73: 244–250.

[6] Salarbashi, D., Tajik, S., Aliabadi, S. S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R. and Shahidi Noghabi, M. 2014. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. Food Chemistry. 146: 614–622.

[7] Razavilar, V., Akhoundzadeh Basti, A., Abbasifar, R. and Radmehr, B. 2006. Effect of *zataria multiflora* Boiss essential oil, acetic acid, temperature and storage time on probable growth of *salmonella typhimurium* in Brain

- spices, Vol. II. Wood head Publishing, Cambridge, England.
- [28] 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 of Dermatology and Venereology. 18: 73–78.
- [29] Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. and Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21: 1199–1218.
- [30] Elizaquivel, P., Azizkhani, M., Sanchez, G. and Aznar, Rosa. 2013. Evaluation of *Zataria multiflora* Boiss essential oil activity against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* by propidium monoazide quantitative PCR in vegetables. Food Control. 34: 770–776.
- [31] Arfa, A. B., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N. and Chalier, P. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Letters in Applied Microbiology, 43: 149–154.
- [32] Tyagi, A. and Malik, A. 2010. Antimicrobial action of essential oil vapors and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. International Journal of Food Microbiology. 143: 205–210.
- [33] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55(19): 7879–7885.
- [34] Shan, B., Cai, Y., Brooks, J. D. and Corke, H. 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 (14): 5484–5490.
- [35] 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.
- [16] Quintavalla, S. and Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat Science. 62: 373–380.
- [17] Yin, Y. C., Yin, S. W., Yang, X. W., Tang, C. H., Wen, S. H., Chen, Z., Xiao, B. j. and Wu, L. Y. 2014. Surface modification of sodium caseinate films by zein coatings. Food Hydrocolloids. 36: 1–8.
- [18] Anon., 2011. <http://www.en.european-bioplastics.org/market>.
- [19] Shen, L., Worrell, E. and Patel, M. 2010. Present and future development in plastics from biomass. Biofuels Bioproduct Biorefin. 4 (1): 25–40.
- [20] Kim, S. 2008. Processing and properties of gluten/zein composite. Bioresource Technology. 99 : 2032–2036.
- [21] Sessa, D. J., Cheng, H. N., Kim, S., Selling, G. W. and Biswas, G. 2013. Zein-based polymers formed by modifications with isocyanates. Industrial Crops and Products. 43: 106–113.
- [22] Shahnazi, S., Khalili Sigaroudi, F., Ajni, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M. and taghizad, F. 2007. Investigation of chemical composition and antimicrobial properties *Thymus trautvetteri* essential oil. Journal of Medicinal Plants, 23: 80–88.
- [23] Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology. 29:130–135.
- [24] Davidson, P. M. and Naidu A. S. 2000. Phyto-phenols, p. 265-294, In Naidu AS, ed. Natural Food Antimicrobial Systems. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [25] Burt, S. A. and Reinders, R. D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology. 36: 162–167.
- [26] 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.
- [27] Stahl-Biskup, E. 2004. Thyme, p. 297-318, In Peter KV, ed. Handbook of herbs and

## Evaluation antibacterial activity of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and Zein bioactive film

Kashiri, M. <sup>1\*</sup>, Maghsoudlou, Y. <sup>1</sup>, Khomeiri, M. <sup>2</sup>, Behrooz, R. <sup>2</sup>

1. Department of Food Science and Technology, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2. Department of wood Science and Technology, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.

(Received: 92/10/23 Accepted: 93/4/8)

With the aim of using plant essential oils (EOs) as natural antibacterial in the bioactive zein film, the chemical composition of *Zataria multiflora* Boiss. was analyzed by GC-MS. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Zataria multiflora* EOs were evaluated against for *Listeria monocytogenes* and *Escherchia coli* by using the method of micro-well dilution and head space phase. Zein based films containing 5 and 10 % of *Zataria multiflora* Boiss. (ZEO) were developed. The antimicrobial activity of the films was investigated in a vapor phase and liquid media. Carvacrol and thymol were detected as the major components. MIC and MBC were obtained from above components against for *Listeria monocytogenes* (500 µg/l and 1000 respectively) compared to *Escherchia coli* were more effective. *Listeria monocytogenes* was more sensitive to ZEO on vapors phase. A highest inhibition zone was observed against for *Listeria monocytogenes* by incorporating 10% (v/v) ZEO in the vapor phase. zein film containing 5% ZEO had no inhibitory ability on bacteria in addition to in concentration of 10% just reduced the density of bacteria. Log reduction value of bioactive film of zein against *Listeria monocytogenes* and *Escherchia coli* were increased the direct-contact. These results revealed that ZEO as natural food additive has good potential to be incorporated into zein to make antimicrobial for food applications.

**Key words:** Antimicrobial packaging, Zein, Essential oil

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: