نشریه فرآوری و نگه‌داری مواد غذایی
جلد پنجم، شماره اول، ۹۲
۱۳-۲۶
http://ejfpp.gau.ac.ir

فعالیت ضد میکروبی فیلم خوراکی متیل سلولز غنی شده با اسانس اناریجه بر روی فیله‌های ماهی فیتوفاگ در شرایط نگهداری در یخچال

***پیمان آریایی[۱]، حمید توکلی‌پور[۲]، مسعود رضایی[۳] و امیرحسین الهامی‌راد[۴]**

[۱]دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، ایران، [۲]دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، [۳]دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، [۴]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:

چکیده

فیلم پلی ساکاریدی زیست تخریب‌پذیر از طریق همراهی اسانس اناریجه در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد حجمی / حجمی با متیل سلولز ساخته شد. سپس فعالیت ضدمیکروبی آن در برابر هفت باکتری شامل *Staphylococcus aureus* (PTCC) 1113، *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1310)، *Pseudomonas putida* (PTCC 1694)، *Esherichia coli* (PTCC 1533)، *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)، *Bacillus subtilis* (ATCC 1715) و *Vibrio parahemoliticus* (PTCC 1610) مورد بررسی قرار گرفت. فیلم‌های حاوی اسانس اناریجه فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند ($P<0/05$). در روکش‌های حاوی اسانس ناحیه بازداری با افزایش غلظت اسانس اناریجه در ماتریکس پلیمر افزایش پیدا کرد. براساس نتایج به‌دست آمده، پوشش متیل سلولز حاوی ۱/۵ درصد اسانس اناریجه جهت ارزیابی میکروبی گوشت توانست از رشد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی فیتوفاگ در شرایط سرد نگهداری (٤ درجه سانتی‌گراد) جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: متیل سلولز، اناریجه، فعالیت ضد میکروبی، ماهی فیتوفاگ

*مسئول مکاتبه: p.aryaye@yahoo.com

مقدمه

ماده غذایی می‌تواند از طریق واکنش‌های شیمیایی، میکروبیولوژیکی و آسیب‌های فیزیکی فاسد شود. با این وجود، علت اصلی فساد غذا رشد و متابولیسم میکروبی است که منجر به تشکیل ترکیباتی با بوی نامطلوب و ناخوشایند می‌شود. بیماری ناشی از مصرف غذاهای آلوده شده با باکتری‌های پاتوژن موجب نگرانی مهم در سلامت عمومی شده است. به نظر می‌رسد جهت کاهش موارد خطرناک سلامتی استفاده از فرآورده‌های طبیعی مثل ترکیب‌های ضدمیکروب راه جالبی برای کنترل باکتری‌های پاتوژن و توسعه زمان ماندگاری غذاهای فرآوری شده باشد (اوصالاح و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی گروهی از مصرف کنندگان خواهان استفاده از غذاهای طبیعی، بدون افزودنی‌های شیمیایی، به لحاظ میکروبی سالم و نیز بسته بندی شده در مواد مناسب به لحاظ زیست محیطی می‌باشند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۷؛ کامپوز و همکاران، ۲۰۱۰؛ سیریپاتراون وهارت، ۲۰۱۰؛ کورول و همکاران، ۲۰۱۱). برای برآورده کردن این خواسته یکی از چالش‌های بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی‌های شیمیایی رایج و استفاده از ترکیب‌های طبیعی در فرمولاسیون غذاست (سانچز-گونزالز و همکاران، ۲۰۱۱). اسانس‌های گیاهی از جمله ترکیب‌های طبیعی هستند که خواص ضدمیکروبی آن‌ها توسط محقق‌های مختلف به اثبات رسیده است (بورت، ۲۰۰٤؛ اوصاالاح و همکاران، ۲۰۰۷؛ مجهولم ودالگارد، ۲۰۰۲). آن‌ها می توانند به‌عنوان یک منبع خوب از عوامل ضدمیکروب در برابر پاتوژن‌های غذا به کار گرفته شوند. گیاه اناریجه با نام علمی ***Pimpinella affinis*** در ایران قسمت‌های شمال، شمال غرب، غرب، مرکز و شمال شرق پراکنده است. از جمله گیاهان دارای خواص آنتی اکسیدانی می‌باشد. این گیاه علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی خاصیت ضد باکتریایی دارد (گولسین و همکاران، ۲۰۰۳). استفاده از این گیاه به‌عنوان یک عامل طعم دهنده در صنایع غذایی به‌دلیل خودرو بودن آن مقرون به صرفه می‌باشد. همچنین نقش این گیاه در طب سنتی به‌عنوان ضد نفخ، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم و ادرار آور به اثبات رسیده است (تابانکا و همکاران، ۲۰۰۷). برخی از بررسی‌های منتشر شده امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند دارچین و میخک به‌عنوان ترکیبات ضد میکروب طبیعی درغذاهایی مانند شیر و ماهی کاربرد مریم گلی و آویشن برای نگهداری پنیر پیشنهاد شده است (گومز-استاکا و همکاران، ۲۰۱۰؛ اجاق و همکاران، ۲۰۱۰ a). اسانس‌های گیاهی و ترکیب‌های موثر آنها در برابر انواع گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت فعال شناخته شدند. معمولاً باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن دیواره لیپو پلی‌ساکاریدی در غشاء خارجی خود نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در برابر اسانس‌ها مقاومت بیشتری

نشان می‌دهند، هر چند در برخی بررسی‌ها باکتری‌های گرم مثبت مقاومتی مانند باکتری‌های گرم منفی نشان دادند (اوصالاح و همکاران، ۲۰۰۷). با این وجود استفاده از اسانس‌ها در بخش نگهداری غذا به‌دلیل هزینه به کارگیری و دیگر مشکل‌ها از قبیل شدت بو و سمیت بالقوه، انتشار غیر کنترل شده‌ی این مواد به داخل فرآورده‌های غذایی و همچنین غیرفعال شدن بخشی از ترکیب‌های فعال آنها به‌دلیل واکنش با بسیاری از مواد غذایی نظیر ماهی، محدود می‌شود. ماهی در طول نگهداری در یخچال بسیار فساد پذیر است که این اساساً به‌دلیل رشد سریع میکروارگانیسم‌هایی است که به‌طور طبیعی در ماهی وجود دارند و یا طی آلودگی ثانویه در ماهی رشد می‌کنند که خود موجب ضررهای اقتصادی و مشکلات مرتبط با سلامت می شود. یک استراتژی جالب برای کاهش دوز مصرفی اسانس با حفظ اثر بخشی خود می تواند همراهی این ترکیبات طبیعی با فیلم‌های خوراکی باشد (سانچز-گونزالز و همکاران، ۲۰۱۱؛ گومز-استاکا و همکاران، ۲۰۱۰). مزیت اصلی این تکنولوژی آن است که نرخ انتشار عوامل ضد میکروب را به داخل فرآورده کند می کند و بدین ترتیب غلظت‌های بالایی از ترکیبات فعال را برای دوره‌های زمانی طولانی در سطح فرآورده، جایی که بیشتر در معرض هجوم باکتری‌ها می‌باشد حفظ می‌کند. به علاوه اضافه کردن اسانس‌های گیاهی به پوشش‌های خوراکی به آنها ویژگی ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌دهد (گومز و همکاران، ۲۰۱۰)، همچنین این روکش‌ها به‌دلیل زیست تخریب‌پذیر بودن آنها در بین مصرف کنندگان از محبوبیت بسیاری برخوردار هستند (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰ الف) و می‌توانند به‌عنوان جایگزین بالقوه برای مواد پلاستیکی که مشکل‌های فراوانی را از نظر آلودگی‌های زیست محیطی ایجاد کرده‌اند، مورد استفاده واقع شوند (گومز-استاکا و همکاران، ۲۰۱۰). فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی می توانند از انواع گسترده‌ای از مواد خام شامل هیدروکلوئیدها، پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و کامپوزیت‌ها (ترکیبی ساخته شده از دو طبقه قبلی) آماده شوند که این مواد در بسیاری از موارد فرآورده‌های جنبی صنایع مختلف هستند. در بین آنها فیلم‌ها و پوشش‌های پلی ساکاریدی به دلیل ویژگی‌های عملکردی و تغذیه ای آنها بیشتر مورد توجه هستند. متیل سلولز یکی از مشتق‌های سلولز است. درجه جانشینی در متیل سلولز (تعداد گروه‌های جانشین شده به ازاء هر واحد گلوکز) ۱/٦ الی ۱/۹ است. این ترکیب در آب محلول است و می تواند در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر مورد استفاده قرار گیرد. فیلم‌های تهیه شده از متیل سلولز شفاف، محلول در آب، مقاوم به نفوذ روغن، دارای مقاومت مکانیکی بالا و نفوذپذیری کم به بخار آب و اکسیژن هستند و در صنایع غذایی و داروئی بصورت گسترده‌ای استفاده می‌شوند (سیمون و همکاران، ۱۹۹۸). بنابراین هدف از این پژوهش، تقویت

خواص میکروبی و فیزیکی فیلم متیل سلولز با اسانس اناریجه جهت کنترل رشد باکتری‌های بیماریزا و استفاده از آن جهت نگهداری فرآورده‌های دریایی با حساسیت بالا به فساد باکتریایی در شرایط نگهداری در یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تولید روکش‌های خوراکی از متیل سلولز: ابتدا محلول ۳ درصد (وزنی- حجمی) پودر متیل سلولز (شرکت سیگما-آلدریچ، آمریکا) در آب مقطر و اتانول به نسبت ۲ به ۱ تهیه گردید. سپس محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه روی هیتر مگنت دار در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و دور بالا حرارت داده شد. سپس پلی اتیلن گلیکول ٤۰۰ به‌عنوان نرم‌کننده به میزان ۰/۳۳ درصد وزن پلیمر به‌محلول متیل سلولز (وزنی- وزنی) اضافه شد (تورهان و سهباز، ۲۰۰٤). پس از سرد شدن محلول به ٤ بخش مساوی تقسیم شد. به این ترتیب محلول‌های حاوی اسانس اناریجه به طور جداگانه در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد حجمی- حجمی تهیه شد و به یک بخش نیز اسانسی افزوده نشد (تیمار شاهد). قبل از افزودن اسانس، توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر به میزان ۰/۲ درصد حجم اسانس به محلول اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه عمل هم زدن به آرامی صورت گرفت تا امولسیفایر به‌صورت یکنواخت درون محلول پخش شود. پس از آن اسانس اناریجه در غلظت‌های ذکر شده به هر کدام از محلو ل‌ها اضافه گردید و به‌مدت دو دقیقه عمل هم زدن با هموژنایزر صورت گرفت تا اسانس‌ها به طور یکنواخت در مجموعه پخش شوند (بهرام و همکاران، ۲۰۱۳). چون محلول‌های تشکیل‌دهنده پوشش مراحل هم زدن شدیدی را گذرانده بودند و نیز به علت وجود امولسیفایر، کف زیادی در محلول‌ها تشکیل شده بود، محلول به مدت ٢٤ ساعت در یخچال (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) قرارگرفت تا هواگیری به‌طور کامل انجام شود. پس از آن جهت خارج شدن حلال ١٤ گرم از محلول به آرامی درون پلیت‌های کشت میکروبی ریخته شد. سپس پلیت‌ها در یک سطح کاملا تراز قرار داده شدند تا در دمای محیط خشک شده و روکش‌ها تشکیل شوند. پس از تشکیل روکش‌ها، عمل جدا کردن آنها از پلیت‌ها صورت گرفت. سپس این روکش‌ها تا زمان انجام آزمایش میکروبی برای تعدیل رطوبتی رسیدن به وزن ثابت (درون دسیکاتور با رطوبت نسبی ۲±۵۰ درصد و دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی روکش‌های خوراکی: فعالیت ضد میکروبی محلول تشکیل دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی برروی ۷ میکروارگانیسم پاتوژن و عامل فساد شامل *Staphylococcus aureus* (PTCC 1431)، *Pseudomonas aeruginosa*(PTCC 1430)، *Pseudomonas putida* (PTCC 1694)، *Bacillus subtilis*،*Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)،*Esherichia coli* (PTCC 3315) و *Vibrio parahemoliticus* (PTCC 1610) (ATCC 465) با استفاده از روش نفوذ در محیط آگاردار[1] مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیسم‌های مورد بررسی از پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر واقع در ساری تهیه گردیدند. ارگانیسم‌ها به‌مدت یک شبانه روز در محیط کشت ب اچ آی آگار[2] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. روکش‌های خوراکی تولید شده با استفاده از یک قالب به دیسک‌هایی به قطر ٤/١٣ میلی‌متر تبدیل شدند. قبل از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر کشت مایع (تقریباً برابر با $۱۰^{۷}$-$۱۰^{٦}$) هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش انجام گرفت. سپس پلیت‌ها ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم خانه قرار گرفتند. قطرهاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس از قطر دیسک کم شد. این اختلاف به‌عنوان ناحیه بازداری محلول تشکیل دهنده فیلم و روکش‌ها گزارش شد (گومز-استاکا و همکاران، ۲۰۱۰).

آماده سازی ماهی و تهیه تیمارهای مورد نیاز

آماده سازی ماهی: ماهی فیتوفاگ به وزن ۲۵ ±۱۲۰۰ گرم به تعداد ۹ عدد از مرکز خرید ماهی واقع در شهرستان قائم شهر خریداری شد و با رعایت شرایط صحیح انتقال به آزمایشگاه دانشکده صنایع غذایی دانشگاه آزاد واحد آیت ا... آملی منتقل گردید و پس از تخلیه شکمی و سر زنی فیله‌هایی، با وزن ۱۰۰-۸۰ گرم از هر ماهی تهیه شد.

1 - Agar diffusion method
2 - BHI- agar

ایجاد پوشش بر روی فیله ماهی: جهت ایجاد پوشش بر سطح فیله‌ها، ابتدا فیله‌ها به‌مدت ۱ دقیقه در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور گردیدند. سپس آنها را از محلول خارج نموده و پس از گذشت تقریباً ۲ دقیقه، مجددا ۱ دقیقه دیگر در محلول پوششی قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل بدون پوشش باقی ماندند جهت خشک کردن فیله‌ها آنها را به‌مدت ۵ ساعت از صفحات مشبک استریل آویزان نموده و در دمای محیط (حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۵ ساعت تا تشکیل پوشش بر روی فیله‌ها باقی ماندند (جان و همکاران، ۲۰۰۲؛ ین گود و همکاران، ۲۰۰٦). سپس فیله‌ها به یخچال منتقل شده و در دمای ۲±٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٦ روز نگهداری شدند و در فواصل زمانی ٤ روز مورد ارزیابی میکروبی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که یک تیمار بدون پوشش نیز به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد.

آنالیز میکروبی نمونه‌ها: برای شمارش باکتریایی نمونه‌ها، ۱۰ گرم از نمونه گوشت فیله در شرایط استریل با ۹۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ مخلوط و هموژن شد و متعاقب آن رقت‌های مورد نیاز تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پور پلت مورد استفاده قرار گرفت. شمارش تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرمادوست در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب در دماهای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز و ۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی‌های موجود بر روی پلیت انجام گرفت .تمامی شمارش‌ها به‌صورت log CFU/g گزارش گردید (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۹؛ ابراهیم سالام، ۲۰۰۷؛ آراشیسارا و همکاران، ۲۰۰٤).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله با نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمّی به‌دست آمده آز آزمایش‌های میکروبی از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. برای تعیین سطح اختلاف‌های معنی‌دار، آزمون دانکن مورد استفاده قرار گرفت. در تمام موارد سطح اطمینان ۹۵ درصد جهت معنی دار بودن یا نبودن نتایج ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج فعالیت ضد میکروبی روکش‌های خوراکی در غلظت‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. روکش‌ها ی شاهد هیچ اثر بازداری را در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان ندادند که روکش‌های حاوی اسانس اناریجه بازداری قابل توجهی را در برابر اکثر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان دادند. فقط در بین این میکروارگانیسم‌ها، سودوموناس باکتری مقاوم در برابر اناریجه می باشد. که این نتایج موافق با نتایج به‌دست آمده توسط (وردین–ریزی، ۲۰۰۸). در مورد تاثیر اسانس اناریجه بروی

سودوموناس می باشد. اثر ضد باکتریایی اسانس با ایجاد ناحیه بازداری مشاهده شد. اضافه کردن اسانس اناریجه به متیل سلولز موجب انتشار اسانس به محیط کشت و فراهم کردن ناحیه بازداری اطراف فیلم شد. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را به ترکیبات فرار موجود در آنها نسبت داده اند. اسانس اناریجه حاوی مقادیر بالایی از لیمونن[1]، پری گایجرن[2]، جرماکرن [3] و ترانس بتا سیمن[4] می‌باشد (وردین–ریزی، ۲۰۰۸). لیمونن یک کتون است و جزء مونوترپن‌هاست. ترپن‌ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند که این امر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم در نهایت مرگ سلول می‌شود (اوصالاح و همکاران، ۲۰۰٦). عسگری و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند در اسانس‌های دو گونه مختلف اناریجه مربوط به مشهد و رامهرمز که بروی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد مهمترین ترکیب لیمونن بود و مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت به اثرات ضد میکروبی اسانس اناریجه حساس تر بودند. نتایج نشان داد در فیلم‌های خوراکی با افزایش غلظت اسانس در ماتریکس پلیمر ناحیه بازداری افزایش پیدا کرد. به‌طورکلی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌ها بر میکروارگانیسم‌های مختلف به غلظت اسانس، ترکیب ماده غذایی و درجه حرارت نگهداری ماده غذایی بستگی دارد، به طوری که با افزایش غلظت اسانس فعالیت ضدمیکروبی آن افزایش می‌یابد (بورت، ۲۰۰٤). در غلظت ۱/۵ درصد اسانس، حساسترین باکتری ***Listeria monocytogenes*** بود که ناحیه بازداری آن برای روکش‌های خوراکی ۳٤/۳۳ میلی متر بود. باکتری ***Bacillus subtilis*** همانند باکتری لیستریا مونوسیتوژنز یک گرم مثبت است و اصولاً باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس‌ها حساس‌ترند (سانچز و همکاران، ۲۰۱۱). در بررسی انجام شده توسط (وردین–ریزی، ۲۰۰۸) با عنوان بررسی خواص ضد میکروبی اسانس اناریجه (***pimpinella affinis ledeb***) و ترکیب‌های اصلی آن، ۵ سویه باکتریایی با عنوان ***Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa, Staphylococcus aureus***، ***Saccharomyces cerevisiae*** و ***Candida albicans*** در تست‌های ضد میکروبی استفاده شدند. نتایج نشان داد اسانس اناریجه در دوزهای مختلف اثرات بازداری خوبی در برابر باکتری‌های تست شده دارد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که اختلاف در مقاومت باکتری‌های گرم مثبت مانند

1- Limonene
2- Pregeijerend
3- germacrene
4- trans- B- cimene

مقاومت سودوموناس و لیستریا نسبت به اسانس اناریجه در برابر اثرات اسانس‌ها ممکن است در نتیجه مقاومت بین سویه‌های مختلف باشد (گومز–استاکا و همکاران، ۲۰۱۰) به طور کلی ناحیه بازداری در فیلم‌های خوراکی در اسانس ۱/۵ درصد بالاتر بوده که ممکن است به دلیل انتشار غلظت بالاتر اسانس از فیلم باشد.

جدول ۱- فعالیت ضدمیکروبی (ناحیه بازداری) روکش‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس اناریجه در برابر میکروارگانیسم‌ها بر حسب میلی‌متر.

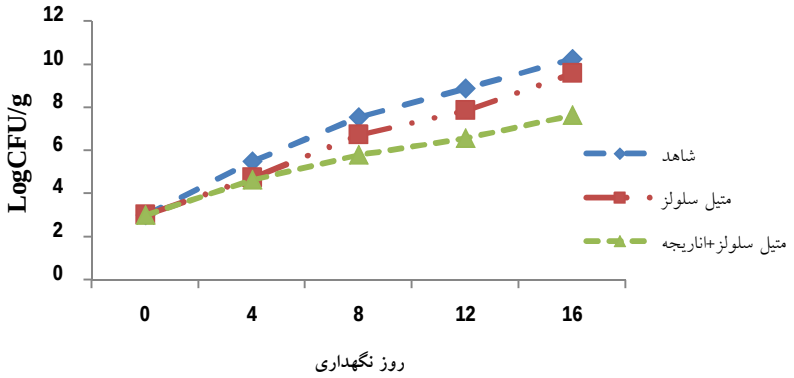
نوع روکش	*St. aureus*	*L. monocytogenes*	*Ps. aeruginosa*	*P. putida*	*E. coli*	*B. subtilis*	*V. parahaemoliticus*
ش	۰/۰۰ d	۰/۰۰ d	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
م-ا ۵٪	۱٤/٦٦±۱/۵۲ c	۱۹/۰۰±۲ c	۰/۰۰	۰/۰۰	۱٤±۱ b	۱۱/٦٦±۱/۵۲c	۱۵±۱/۷۳ b
م-ا ۱٪	۲۱/۰۰±۳ b	۲٦/۰۰±۱ b	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۷/۳۳±۱/۱۵ b	۱٤/٦٦±۱/۱۵ a	۲۲/٦٦ ±۱/۵۲a
م-ا ۱/۵ ٪	۳۱/۳۳±۱/۵۲ a	۳٤/۳۳±۱/۱۵ a	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۲/۳۳±۱/۵۲a	۱۸±۱ a	۲٦/۳۳±۱/۵۲ a

ش: شاهد، م-ا: ۰/۵ ، ۱ و ۱/۵ درصد: روکش متیل سلولز غنی شده با اسانس اناریجه با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد

*میانگین ± معیار انحراف، حروف کوچک در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌دار در روکش‌های مختلف متیل سلولز است.

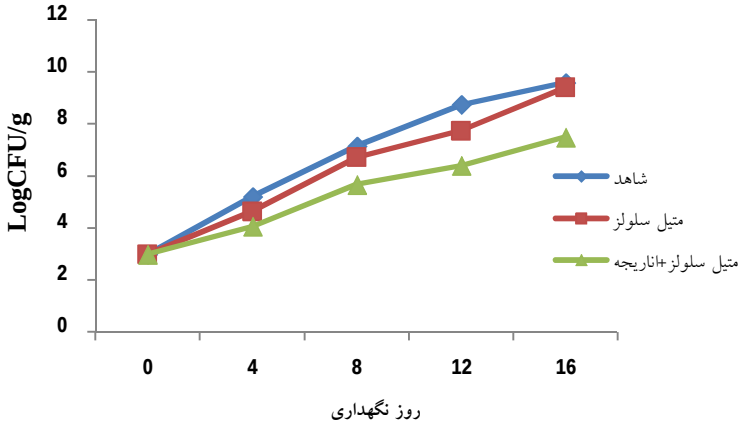
تغییرات بار میکروبی کل در شکل ۱ نشان داده شده است. میزان بار باکتریایی کل برای ماهی فیتوفاگ در روز صفر نگهداری ۳ log CFU/g بود. با افزایش زمان نگهداری این مقدار در همه تیمارها افزایش یافت. افزایش بارمیکروبی کل در گوشت ماهی طی نگهداری ثابت شده است (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰b؛ لیو و همکاران، ۲۰۰۸) تا روز هشتم نگهداری میزان بار باکتریایی کل برای همه تیمارها در حد قابل قبول برای ماهی (۷ log CFU/g) بود. هر چند تیمار شاهد و تیمار پوششی فاقد اسانس اناریجه به این عدد نزدیکتر بودند. به طور کلی نتایج اندازه‌گیری بار میکروبی فیله ماهی نشان داد بین تیمار شاهد با تیمار متیل سلولز بدون اسانس اناریجه، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P<0/05$) این با نتایج به دست آمده در جدول ۱ که نشان داد فیلم تشکیل دهنده متیل سلولز بدون اسانس اناریجه فاقد فعالیت‌های ضد میکروبی است مطابقت دارد. پوشش فیله ماهی با متیل سلولز غنی شده با اسانس اناریجه موجب کند شدن رشد میکروبی به مقدار ٦/۵۹ و ۷/٦٦ log CFU/g به‌ترتیب در روزهای دوازدهم و شانزدهم نگهداری شد. میزان بار میکروبی کل تیمار پوششی حاوی اسانس اناریجه تا روز دوازدهم نگهداری در حد قابل قبول برای ماهی بود و تنها در روز شانزدهم نگهداری از حد مجاز برای ماهی گذشت. علت کم بودن میزان باکتری‌های کل در تیمارهای

حاوی اسانس را می توان به فعالیت ضد باکتریایی اسانس اناریجه نسبت داد که این نتیجه مطابق با نتایج به دست آمده با اجاق و همکاران (b۲۰۱۰) و بهرام و همکاران (۲۰۱۳) است.



شکل ۱- تعداد باکتری‌های کل تیمارهای مختلف در طی زمان نگهداری در یخچال (شاهد: نمونه ماهی بدون پوشش، تیمار متیل سلولز: ماهی پوششی با متیل سلولز، متیل سلولز + اناریجه: ماهی پوششی با متیل سلولز و اسانس اناریجه

تغییرات در تعداد باکتری‌های سرما دوست در شکل ۲ نشان داده شده است. باکتری‌های سرما دوست گرم منفی گروه اصلی از باکتری‌های عامل فساد گوشت ماهی طی شرایط نگهداری بصورت سرد هستند (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰ b) تعداد باکتری‌های سرما دوست در روز صفر نگهداری ۳ log CFU/g بوده است. میزان این باکتری‌ها با گذشت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد. تعداد این باکتری‌ها در روزشانزدهم نگهداری به ۹/٦، ۹/٤۲ و ۷/۵۱log CFU/g به‌ترتیب در تیمار شاهد، تیمار پوششی بدون اسانس و تیمار پوششی با اسانس اناریجه رسید. به‌طورکلی تیمار پوششی حاوی ۱/۵ درصد اسانس اناریجه تعداد باکتری‌های کمتری نسبت به دو تیمار دیگر داشتند. که این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققان مطابقت دارد (اجاق و همکاران، b۲۰۱۰ ؛ لیو و همکاران، ۲۰۰۹).



شکل۲-تعداد باکتری‌های سرمادوست تیمارهای مختلف در طی زمان نگهداری در یخچال (شاهد: نمونه ماهی بدون پوشش، تیمار متیل سلولز: ماهی پوششی با متیل سلولز، متیل سلولز + اناریجه: ماهی پوششی با متیل سلولز و اسانس اناریجه.

همچنین به دلیل آب دوست بودن متیل سلولز و نیز فعالیت آبی بالای بافت ماهی احتمالاً پوشش فاقد اسانس نتوانسته سد خوبی در برابر اکسیژن باشد و به این دلیل همانند تیمار شاهد نتوانسته مانع رشد باکتری شود. پیش از این اثبات شده که همراهی اسانس‌های دیگر مانند دارچین با روکش‌های خوراکی آب دوست ضمن تقویت خواص ضد باکتریایی روکش‌ها منجر به کاهش آب دوستی روکش‌ها می‌شود (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰a).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان نمود که اسانس اناریجه می‌تواند از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت اسانس میزان این بازداری افزایش می‌یابد. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار داشت که استفاده از پوشش متیل سلولز غنی شده با اسانس اناریجه می‌تواند از رشد باکتری‌های سطح فیله ماهی فیتوفاگ کم کرده و در نهایت می‌تواند موجب افزایش زمان ماندگاری گردد.

منابع

Arashisara, S. 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout. (*Oncorynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 209– 214.

Askari, F. Sefidkon, F. Teimouri, M. and Youser Nanaei, S. 2009. Chemical composion and antimicrobial activity of the essential oil of *pimpinella puberula* (dc). boiss. *Agriculture science Technology*. Vol. 11:431-438.

Bahram, S. Rezaei, M. Soltani, M. Kamali, A. Ojagh, S.M. and Abollahi, M. 2013. Whey protein concentration edible film with cinnamon essential oil. *Journal of food processing and preservation*, 1745-4549.

Burt, S.A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223–253.

Campos, C.A., Gerschenson, L.N. and Flores, S.K. 2010. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technology*. 4: 849-875.

Campos, C.A., Gerschenson, L.N. and Flores, S.K. 2010. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*. 4: 849-875.

Gulcin, I., Oktay, M., Kıreccı, M and Ku¨frevıog˘lu, O.I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinellaanisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.

Gómez-Estaca, J., Montero, P., Giménez, B. and Gómez-Guillén, M. 2007. Effect of functional edible films and high pressure processing on microbial and oxidative spoilage in cold-smoked sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 105(2): 511-520.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. 2010. Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27: 889-896.

Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., GarcíaGarcía, B. and Garrido, M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquaculturedmeagre (*Argyroso musregius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*, 114: 237–245.

Ibrahim Sallam, K. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18*:* 566–575.

Jeon, Y-I., Kamil, J.Y.V.A. and Shahidi, F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Food Chemistry*, 20: 5167–5178.

Kuorwel, K.K., Carn, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J. and Bigger, S.W. 2011. Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of Food Sciences*, 76: 90-102

Lu, F., Liu, D., Ye, X., Wei, Y. and Liu, F. 2009. Alginate–calcium coating incorporating nisin and EDTA maintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4 °C. *Journal of Food Science and Agriculture*, 89: 848-854.

Mejholm, O. and Dalgaard, P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism photobacterium phosphoreum in liquid media and fish products. *Letter in Applied Microbiology*, 34, 27-31.

Nazan Turhan, K., and Ferhunne Sahbaz. 2004. Water Vapor Permeability Tensile Properties and Solubility of Methy Cellulose based edible films. *Journal of Food Engineering*, 61.459-466.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. 2010 a. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120: 193–198.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. 2010b. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120: 193–198.

Ouattara, B., simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P. and Bigin, A. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62:139-148.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18: 414-420.

Sánchez-González, L., Vargas, M., Gonzalez-martinez, C., Chiralt, A. and Chafer, Mt. 2011. Use of Essential oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Engineering Reviews*, 3: 1-16.

Simon, J.H.P. Muller, R. Koch and Muller, V. 1998. Thermoplastic and biodegradable polymers of cellulose Polymer Degradation and Stability. 59:107±115.

Siripatrawan, U. and Harte, B.R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film form chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 23: 536-547.

Tabanca, N., Ma, G., Pasco, D.S., Bedir, E., Kirimer, N., Husnu, K., Baser, C., Khan, I.A. and Khan, S.I. 2007. Effect of Essential Oils and Isolated Compounds from Pimpinella Species on NF-B: A Target for Anti-inflammatory Therapy, *Phytotherapy Research*, 21, 741-745.

.

Verdian-rizi, M. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *pimpinella affinis ledeb*. Essential oil growing in Iran. Research Journal of Biological Sciences, 3(8):913-915.

Wang, L., Liu, Holmes, J., Kerry, J.F. and Kerry, J.P. 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *Journal of Food Science and Technology*. 42: 1128-1138.

Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S. and Siripatrawan, U. 2006. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*. 19: 149–157.

EJFPP, Vol. 5 (1): 13-26
http://ejfpp.gau.ac.ir

Antimicrobial activity of methyl cellulose based edible film enriched with *pimpinella affinis* oil on the *Hypophthalmichthys molitrix* fillet under refrigerator storage condition

[*]P. Ariaei[1], H. Tavakolipour[1], M. Rezaei[3] and A. Elhamirad[4]

[1] Ph.D. Candidate, Dept. of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, [2] Associate. Prof., Dept. of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, [3] Associate. Prof., Dept. of fishery products Technology, Tarbiat Modares University, [4] Assistant. Prof., Dept. of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University

Abstract

Biodegradable polysacharyd-based film was developed by incorporating *pimpinella affinis* essential oil (PAO) into methyle Cellulose (MC) at level of 0.5%, 1% and 1.5% v/v. Then, its antimicrobial activity tested against 7 bacteria include *Staphylococcus aureus* (PTCC 1431), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1151), *Pseudomonas putida* (PTCC 1691), *Esherichia coli* (PTCC 3315), *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163), *Bacillus subtilis* (PTCC 465) and *Vibrio parahemoliticus* Films containing PAO showed significant antibacterial activity both gram-positive and gram-negative strainsa. The Inhibitory zone in film disks were increased with concentration of *pimpinella affinis* oil in the polymer matrix ($P<0.05$). Based on results, methyl cellulose edible coating contain 1.5% *pimpinella affinis* essential oil was used for microbial assay *hypophthalmic molitrix d*uring cold storage (4°c) which could inhibit of total bacteria growth and pscychrophilic counts of fillet.

Keywords: Methyl cellulose, *Pimpinella affinis*, Antimicrobial activity, *hypophthalmic molitrix*

[*]Corresponding author; p.aryaye@yahoo.com