

فعالیت ضد میکروبی فیلم خوراکی پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس دارچین بر روی فیله‌های فیل ماهی در شرایط نگهداری در یخچال

*سمیه بهرام^۱، مسعود رضایی^۲، مهدی سلطانی^۳، ابوالقاسم کمالی^۴ و سیدمهدی اجاق^۵

^۱ دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، آدانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران، ^۲ استاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، ایران، ^۳ استاد گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران، ^۴ استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۵

چکیده

فیلم پروتئینی زیست تخریب‌پذیر از طریق همراهی اسانس دارچین در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۵ درصد حجمی / حجمی با کنسانتره پروتئین آب پنیر ساخته شد. سپس فعالیت ضد میکروبی آن در برابر ۶ باکتری و یک قارچ شامل *Pseudomonas putida* (PTCC 1366)، *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1768)، *Lactobacillus lactis* (PTCC 1694)، *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)، *Esherichia coli* (PTCC 3315) و *Bacillus subtilis* (ATCC 465) مورد بررسی قرار گرفت. فیلم‌های شامل اسانس دارچین فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز اثرات بازدارنده معنی‌داری را در مقابل قارچ مورد بررسی نشان دادند. در روکش‌ها و محلول تشکیل‌دهنده فیلم ناحیه بازدارنده با افزایش غلظت اسانس دارچین در ماتریکس پلیمر افزایش پیدا کرد ($P < 0/05$). به‌طور کلی ناحیه بازدارنده محلول تشکیل‌دهنده فیلم بالاتر از روکش‌ها بود. براساس نتایج، پوشش کنسانتره پروتئین آب پنیر شامل ۱/۵ درصد اسانس دارچین برای ارزیابی میکروبی گوشت فیل ماهی در شرایط سرد نگهداری (۴ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد که توانست از رشد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرماگرا فیله جلوگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: کنسانتره پروتئین آب پنیر، دارچین، فعالیت ضد میکروبی، فیل ماهی

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.

به‌نظر می‌رسد برای کاهش موارد خطرناک سلامتی استفاده از فرآورده‌های طبیعی مثل ترکیبات ضد میکروب راه جالبی برای کنترل باکتری‌های پاتوژن و توسعه زمان ماندگاری غذاهای فرآوری شده باشد (Oussalah و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی گروهی از مصرف‌کنندگان خواهان استفاده از غذاهای طبیعی، بدون افزودنی‌های شیمیایی، از نظر میکروبی سالم و نیز بسته‌بندی شده در مواد مناسب از نظر محیط زیستی می‌باشند (Wang و همکاران، ۲۰۰۷؛ Campos و همکاران، ۲۰۱۰؛ Siripatrawan و Harte، ۲۰۱۰؛ Kuorwel

* مسئول مکاتبه: bahramsomi@gmail.com

این اساساً به دلیل رشد سریع میکروارگانیسم‌هایی است که به طور طبیعی در ماهی وجود دارند و یا طی آلودگی ثانویه در ماهی رشد می‌کنند که خود موجب ضررهای اقتصادی و مشکلات مرتبط با سلامت می‌شود. یک استراتژی جالب برای کاهش دوز مصرفی اسانس با حفظ اثر بخشی آن‌ها می‌تواند همراهی این ترکیبات طبیعی با فیلم‌های خوراکی باشد (Sánchez-González و همکاران، ۲۰۱۱؛ Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰). برتری اصلی این تکنولوژی آن است که نرخ انتشار عوامل ضد میکروب را به داخل فرآورده کند می‌کند و به این 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 عصاره‌های گیاهی به پوشش‌های خوراکی به آن‌ها ویژگی ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌دهد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین این روکش‌ها به دلیل زیست تخریب‌پذیر بودن‌شان در بین مصرف‌کنندگان از محبوبیت بسیاری برخوردار هستند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a) و می‌توانند به عنوان جایگزین بالقوه برای مواد پلاستیکی مورد استفاده در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی که مشکلات فراوانی را از نظر آلودگی‌های محیط زیست ایجاد کرده‌اند، مورد استفاده واقع شوند (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰). فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی می‌توانند از انواع گسترده‌ای از مواد خام شامل هیدروکلوئیدها (پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها)، چربی‌ها و کامپوزیت‌ها (ترکیبی ساخته شده از دو طبقه قبلی) آماده شوند که در بسیاری از موارد فرآورده‌های جنبی صنایع مختلف هستند. در بین آن‌ها فیلم‌ها و پوشش‌های پروتئینی به دلیل ویژگی‌های عملکردی و تغذیه‌ای بیش‌تر مورد توجه‌اند. پروتئین آب پنیر به عنوان فرآورده جنبی کارخانجات

و همکاران، ۲۰۱۱). برای برآورده کردن این خواسته یکی از چالش‌های بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی‌های شیمیایی رایج و استفاده از ترکیبات طبیعی در فرمولاسیون غذاست (Sánchez-González و همکاران، ۲۰۱۱). اسانس‌های گیاهی از جمله ترکیبات طبیعی هستند که خواص ضد میکروبی آن‌ها توسط پژوهش‌گران مختلف به اثبات رسیده است (Burt، ۲۰۰۴؛ Oussalah و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mejholm و Dalgaard، ۲۰۰۲). آن‌ها می‌توانند به عنوان یک منبع خوب از عوامل ضد میکروب در برابر پاتوژن‌های غذا به کار گرفته شوند. برای مثال، در برخی از مطالعات منتشر شده امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند دارچین و میخک به عنوان ترکیبات ضد میکروب طبیعی در شیر و ماهی، مریم گلی و آویشن برای نگهداری پنیر پیشنهاد شده است (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مؤثر 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 (Oussalah و همکاران، ۲۰۰۷).

با این وجود استفاده از اسانس‌ها در بخش نگهداری غذا به دلیل هزینه به کارگیری و دیگر مشکلات مانند شدت بو و سمیت بالقوه، انتشار غیرکنترل شده این مواد به داخل فرآورده‌های غذایی و همچنین غیرفعال شدن بخشی از ترکیبات فعال آن‌ها به دلیل واکنش با بسیاری از مواد غذایی مانند ماهی، محدود می‌شود. ماهی در طول نگهداری در یخچال بسیار فسادپذیر است که

پنیرسازی، به مقدار زیاد تولید می‌شود. کنسانتره پروتئین آب پنیر می‌تواند فیلم‌های شفاف، انعطاف‌پذیر، بدون رنگ و بو با ویژگی‌های سدی خوب در برابر گازها، مواد معطر و روغن و ویژگی سدی ضعیف در مقابل آب تولید کند (Morr و Ha، ۱۹۹۳).

بنابراین هدف از این پژوهش، تقویت خواص ضد میکروبی فیلم پروتئین آب پنیر با اسانس دارچین برای کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و استفاده از آن برای نگهداری فرآورده‌های دریایی با حساسیت بالا به فساد باکتریایی در شرایط نگهداری در یخچال می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تولید روکش‌های خوراکی از کنسانتره پروتئین آب پنیر: ابتدا محلول ۸ درصد (وزنی-حجمی) پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر (شرکت DMV، هلند) در آب مقطر تهیه گردید. سپس محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه درون بن‌ماری در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و توسط ظرف محتوی یخ سرد شد. بعد از آن گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده به‌میزان برابر با پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر (وزنی-وزنی) به محلول اضافه شد (Heo و Chae، ۱۹۹۷). پس از سرد شدن محلول به ۴ بخش مساوی تقسیم شد. به این ترتیب محلول‌های حاوی اسانس دارچین به‌طور جداگانه در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۵ درصد حجمی-حجمی تهیه شد و به یک بخش نیز اسانسی افزوده نشد. قبل از افزودن اسانس، توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر به‌میزان ۰/۲ درصد حجم اسانس به محلول اضافه گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه عمل هم‌زدن به آرامی صورت گرفت تا امولسیفایر به‌صورت یکنواخت درون محلول پخش شود. پس از آن اسانس دارچین در غلظت‌های ذکر شده به هر کدام از

محلول‌ها اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه عمل هم‌زدن صورت گرفت تا اسانس‌ها به‌طور یکنواخت در مجموعه پخش شوند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). چون محلول‌های تشکیل‌دهنده پوشش مراحل هم‌زدن شدیدی را گذرانده بودند و نیز به‌علت وجود امولسیفایر، کف زیادی در محلول‌ها تشکیل شده بود، محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا هواگیری به‌طور کامل انجام شود. پس از آن برای خارج شدن حلال (آب) ۱۶۰ گرم از هر محلول به آرامی درون قاب‌های شیشه‌ای ریخته شد. سپس قاب‌ها در یک سطح کاملاً تراز قرار داده شدند تا در دمای محیط خشک شده و روکش‌ها تشکیل شوند. پس از تشکیل روکش‌ها، عمل جدا کردن آن‌ها از قاب‌های شیشه‌ای صورت گرفت. سپس این روکش‌ها تا زمان انجام آزمایش میکروبی برای تعدیل رطوبتی (رسیدن به وزن ثابت) درون چمبر با رطوبت نسبی 50 ± 2 درصد و دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی محلول تشکیل‌دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی: فعالیت ضد میکروبی محلول تشکیل‌دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی بر روی ۶ میکروارگانیزم پاتوژن و عامل فساد شامل: *Lactobacillus lactis* (PTCC 1366)، *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1768)، *Pseudomonas putida* (PTCC 1694)، *Listeria Esherichia coli* (PTCC 3315)، *Bacillus subtilis monocytogenes* (PTCC 1163) (ATCC 465) و قارچ *Candida albicans* با استفاده از روش نفوذ در محیط آگاردار^۱ مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیزم‌های مورد بررسی از دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس تهیه

1- Agar Diffusion Method

مخلوط شد. محلول کنترل با همین روش و بدون افزودن توئین و اسانس دارچین تهیه شد.

آماده سازی ماهی و تهیه تیمارهای مورد نیاز

آماده سازی ماهی: فیل ماهی مورد نیاز از مزرعه پرورش ماهی واقع در شهرستان بابلسر خریداری شد و با رعایت شرایط صحیح انتقال به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه دانشکده تربیت مدرس منتقل گردید و پس از آماده سازی ماهی فیله هایی با وزن ۱۰۰-۸۰ گرم تهیه شد.

ایجاد پوشش بر روی فیله ماهی: برای ایجاد پوشش بر سطح فیله ها، ابتدا فیله ها به مدت ۱ دقیقه در محلول های تهیه شده غوطه ور گردیدند. سپس آن ها را از محلول خارج نموده و پس از گذشت تقریباً ۲ دقیقه، دوباره ۱ دقیقه دیگر در محلول پوششی قرار گرفتند. نمونه های کنترل بدون پوشش باقی ماندند. برای خشک کردن فیله ها آن ها را به مدت ۵ ساعت از صفحات مشبک استریل آویزان نموده و در دمای محیط (حدود ۱۰ درجه سانتی گراد) تا تشکیل پوشش بر روی فیله ها باقی ماندند (Jeon و همکاران، ۲۰۰۲؛ Yingyuad و همکاران، ۲۰۰۶) پس از خشک شدن پوشش، فیله ها به یخچال منتقل شده و در دمای 4 ± 2 درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ روز نگهداری شدند و در فواصل زمانی ۴ 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 نمونه ها: برای شمارش باکتریایی نمونه ها، ۱۰ گرم از نمونه گوشت فیله در شرایط استریل با ۹۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ مخلوط و هموزن شد و به دنبال آن رقت های مورد نیاز تهیه گردید. ۱ میلی لیتر از هر رقت برای کشت باکتری ها به روش پور پلت مورد استفاده قرار گرفت.

گردیدند. ارگانیسیم ها به مدت یک شبانه روز در محیط کشت ب اچ آی آگار^۲ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. ۷۰ میکرولیتر از محلول های مختلف تشکیل دهنده فیلم بر روی چاهک هایی به قطر ۷/۹ میلی متر در محیط کشت مولر هینتون آگار^۳ ریخته شد. روکش های خوراکی تولید شده با استفاده از یک قالب به دیسک هایی به قطر ۱۳/۴ میلی متر تبدیل شدند. قبل از قرار دادن دیسک ها بر روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر کشت مایع (تقریباً برابر با 10^6 - 10^7) هر کدام از باکتری های مورد آزمایش انجام گرفت. سپس پلیت ها ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه قرار گرفتند. قطر هاله های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی متر اندازه گیری شد و سپس از قطر دیسک کم شد. این اختلاف به عنوان ناحیه بازداری محلول تشکیل دهنده فیلم و روکش ها گزارش شد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰).

تهیه محلول پوششی از کنساتره پروتئین آب پنیر: برای تهیه پوشش پروتئین آب پنیر، نخست محلول ۸ درصد (وزنی - حجمی) پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه گردید و برای انحلال کامل و یکنواخت، محلول به مدت ۱ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه بر روی حمام آبی قرار گرفت و پس از سرد شدن توسط یخ به مقدار مشابه با پودر پروتئین به کار رفته، گلیسرول به محلول اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه با همزن مخلوط گردید سپس توئین ۸۰ به میزان ۰/۲ درصد حجم اسانس به محلول اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه هم زدن توسط همزن به میزان ۱/۵ درصد اسانس دارچین به محلول اضافه شد که به مدت ۲ دقیقه با هموزنایزر

2- BHI-Agar

3- MH-Agar

شمارش تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرماگرا در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب در دماهای ۳۷ سانتی‌گراد به مدت ۲ روز و ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ روز با شمارش کلنی‌های موجود بر روی پلیت انجام گرفت. تمامی شمارش‌ها به صورت \log_{10} CFU/g گزارش گردید (Jbrahim Sallam, ۲۰۰۷؛ Arashisara و همکاران، ۲۰۰۴).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS انجام پذیرفت. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آزمایش‌های میکروبی از آنالیز واریانس استفاده شد. برای تعیین سطح اختلاف‌های معنی‌دار، آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول تشکیل‌دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی در غلظت‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. روکش‌ها و محلول تشکیل‌دهنده فیلم بدون اسانس (شاهد) هیچ اثر بازداری را در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان ندادند. این نتایج موافق با نتایج به دست آمده توسط Cagri و همکاران (۲۰۰۱) در مورد فیلم‌های پروتئین آب پنیر می‌باشد. محلول فیلم و روکش‌های شامل اسانس دارچین بازداری قابل توجهی را در برابر بیش تر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان دادند. اثر ضدباکتریایی اسانس با ایجاد ناحیه بازداری مشاهده شد. اضافه کردن اسانس دارچین به پروتئین آب پنیر موجب انتشار اسانس به محیط کشت و فراهم کردن ناحیه بازداری اطراف فیلم و محلول تشکیل‌دهنده آن شد. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را به ترکیبات فرار موجود در آن‌ها نسبت داده‌اند.

اسانس دارچین شامل مقادیر بالای از سینامالدهید^۱ و اجنول^۲ می‌باشد (Hosseini و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). Ouattara و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند در اسانس‌هایی که اثرات بازدارندگی کمی داشتند، اجنول و سینامالدهید نیز وجود نداشتند و یا به میزان کمی وجود داشتند بنابراین بیان نمودند که حضور اجنول و سینامالدهید می‌تواند به طور مستقیم با خواص ضدباکتریایی مرتبط باشد. با بررسی‌های مختلف مشخص شد که اسانس دارچین می‌تواند از رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی جلوگیری کند (Ouattara و همکاران، ۲۰۰۰؛ Chang و همکاران، ۲۰۰۱؛ Rojas-Graü و همکاران، ۲۰۰۶؛ Goñi و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). نتایج نشان داد هم در محلول تشکیل‌دهنده فیلم و هم فیلم‌های خوراکی با افزایش غلظت اسانس در ماتریکس پلیمر ناحیه بازداری افزایش پیدا کرد. در غلظت ۱/۵ درصد اسانس حساس‌ترین باکتری *Bacillus subtilis* بود که ناحیه بازداری آن برای محلول تشکیل‌دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی به ترتیب ۴۵/۷۴ و ۳۷/۲۵ میلی‌متر بود. باکتری *Bacillus subtilis* گرم مثبت بوده و اصولاً باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر اسانس‌ها حساس‌ترند (Sánchez-González و همکاران، ۲۰۱۱).

همچنین در غلظت ۱/۵ درصد اسانس دارچین کم‌ترین ناحیه بازداری در باکتری *Streptococcus agalactiae* مشاهده شد که به ترتیب در فیلم و محلول تشکیل‌دهنده آن ۱۹/۷۹ و ۱۵/۳۶ میلی‌متر بود که همانند باکتری‌های گرم منفی مقاومت بالایی نشان

1- Cinnamaldehyde

2- Eujenol

محلول نسبت به فیلم باشد. فعالیت ضدقارچی فیلم‌های پروتئین آب پنیر فعال شده در برابر قارچ *Candida albicans* در جدول ۱ نشان داده شد. فیلم‌های شامل اسانس دارچین فعالیت ضدقارچی قابل توجهی را نشان دادند و همان‌طور که انتظار می‌رفت ناحیه بازداری بر ضدقارچ در محلول تشکیل‌دهنده فیلم به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت اسانس دارچین افزایش پیدا کرد ($P < 0/05$). با این وجود در فیلم خوراکی شامل ۰/۴ و ۰/۸ درصد اسانس دارچین هیچ ناحیه بازداری مشاهده نشد. با افزایش اسانس دارچین به ۱/۵ درصد، ناحیه بازداری مشاهده شد (۱۸/۸۷ میلی‌متر). این نتایج موافق با یافته‌های Dalisani و همکاران (۲۰۱۱) و Singh و همکاران (۱۹۹۵) است که گزارش کردند دارچین می‌تواند از رشد قارچ جلوگیری کند.

داد. مطالعاتی وجود دارد که به مقاومت مشابه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و حتی مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی اشاره نموده‌اند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). در این مطالعه باکتری *Listeria monocytogenes* مقاومتی مانند باکتری گرم منفی نشان داد. در بررسی Ojagh و همکاران (۲۰۱۰a) بر روی خواص ضدباکتریایی اسانس دارچین در برابر ۵ باکتری عامل فساد گوشت ماهی، باکتری گرم مثبت *Listeria monocytogenes* تقریباً مقاومتی مانند باکتری‌های گرم منفی نشان داد. این اختلاف در مقاومت باکتری‌های گرم مثبت در برابر اثرات اسانس‌ها ممکن است در نتیجه مقاومت بین سویه‌های مختلف باشد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طور کلی ناحیه بازداری در محلول تشکیل‌دهنده فیلم نسبت به فیلم‌های خوراکی بالاتر بود که ممکن است به دلیل انتشار غلظت بالاتر اسانس از

جدول ۱- فعالیت ضدباکتریایی (ناحیه بازداری) محلول‌ها و روکش‌های شامل غلظت‌ها مختلف اسانس دارچین در برابر میکروب (میلی‌متر)

تیماز / میکروارگانیزم	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>L. lactis</i>
شاهد	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰	۰/۰۰±۰/۰۰*
م-د (۰/۴)	۱۵/۰۴±۰/۹۵ ^b	۲۰/۱۷±۱/۰۵ ^b	۰/۰±۰/۰ ^c	۲۸/۵۶±۴/۴ ^c	۱۴/۹۱±۰/۸۷ ^b	۰/۰±۰/۰ ^c	۱۲/۸۳±۰/۸۳ ^{c*}
م-د (۰/۸)	۱۲/۳۰±۱/۱۰ ^b	۲۰/۳۶±۱/۶۱ ^b	۲۲/۰۰±۱/۰۰ ^b	۳۶/۰۲±۴/۰۳ ^b	۱۵/۸۰±۴/۰۶ ^b	۱۳/۴۷±۰/۶۴ ^b	۱۷/۲۲±۰/۱۶ ^b
م-د (۱/۵)	۲۴/۸۱±۵/۶۶ ^a	۲۸/۱۷±۰/۴۷ ^a	۲۶/۲۱±۳/۲۳ ^a	۴۵/۷۴±۲/۰۱ ^a	۲۴/۹۶±۲/۹۶ ^a	۱۹/۷۹±۰/۷۴ ^a	۳۰/۵۹±۱/۵۳ ^a
ر-د (۰/۴)	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۲۰/۶۷±۳/۵ ^b	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۲۱/۳۴±۵/۰۹ ^c	۰/۰۰±۰/۰۰ ^c	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۰/۰۰±۰/۰۰ ^c
ر-د (۰/۸)	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۲۴/۶۹±۴/۱ ^a	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۳۰/۴۵±۲/۷۹ ^b	۱۷/۷۱±۱/۳۰ ^b	۰/۰۰±۰/۰۰ ^b	۱۵/۸۹±۰/۹۹ ^b
ر-د (۱/۵)	۱۸/۸۷±۲/۳۵ ^a	۲۵/۳۳±۳/۰۲ ^a	۲۲/۱۸±۱/۲۹ ^a	۳۷/۲۵±۱/۹۶ ^a	۲۵/۸۰±۳/۵ ^a	۱۵/۳۶±۰/۴۷ ^a	۲۳/۲۷±۱/۲ ^a

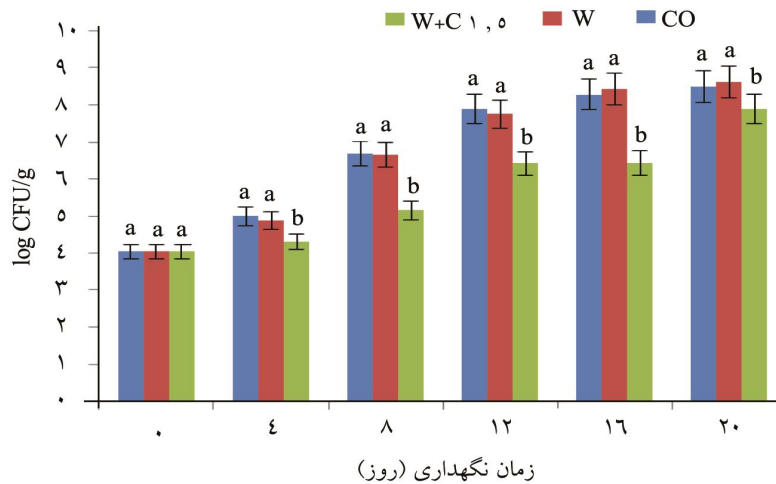
ش: شاهد، م-د: محلول پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس دارچین، م-ر: روکش پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس دارچین * میانگین ± انحراف معیار تذکر: حروف کوچک در هر ستون نشان از تفاوت معنی‌دار در محلول‌های مختلف پروتئین آب پنیر و حروف بزرگ در روکش‌های مختلف پروتئین آب پنیر است

ماهی طی نگهداری ثابت شده است (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰؛ Lu و همکاران، ۲۰۰۸). تا روز هشتم نگهداری میزان بار باکتریایی کل برای همه تیمارها در حد قابل قبول برای ماهی ($7 \log \text{CFU/g}$)

میزان بار باکتریایی کل برای فیل ماهی در روز صفر نگهداری $4/03 \log \text{CFU/g}$ بود. با افزایش زمان نگهداری این مقدار در همه تیمارها افزایش یافت (شکل ۱). افزایش بار میکروبی کل در گوشت

رسیده بود. در بررسی انجام شده توسط Mejholm و Dalggaard (۲۰۰۲) دریافتند که به کارگیری اسانس مرزنگوش و دارچین به همراه سیستم بسته بندی در اتمسفر تعدیل شده ضمن داشتن اثرات ضدباکتریایی قوی موجب افزایش مدت زمان نگهداری در فیله ماهی کاد شده است. همچنین Ojagh و همکاران (۲۰۱۰b) گزارش نمودند که استفاده از پوشش کیتوزان به همراه اسانس دارچین توانست بار میکروبی کل را در ماهی قزل آلا کاهش دهد و زمان ماندگاری ماهی را طی نگهداری در یخچال افزایش دهد.

بود (Ibrahim Sallam, ۲۰۰۷). هر چند تیمار شاهد و تیمار پوششی بدون اسانس دارچین به این عدد نزدیک تر بودند. پوشش فیله ماهی با پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس دارچین موجب کند شدن رشد میکروبی به مقدار ۶/۴۴ و ۷/۹۸ log CFU/g به ترتیب در روزهای شانزدهم و بیستم نگهداری شد. میزان بار میکروبی کل تیمار پوششی شامل اسانس دارچین تا روز شانزدهم نگهداری در حد قابل قبول برای ماهی بود و تنها در روز بیستم نگهداری از حد مجاز برای ماهی گذشت. پیش از این نیز اثرات ضد میکروبی اسانس دارچین در افزایش زمان نگهداری ماده غذایی به اثبات

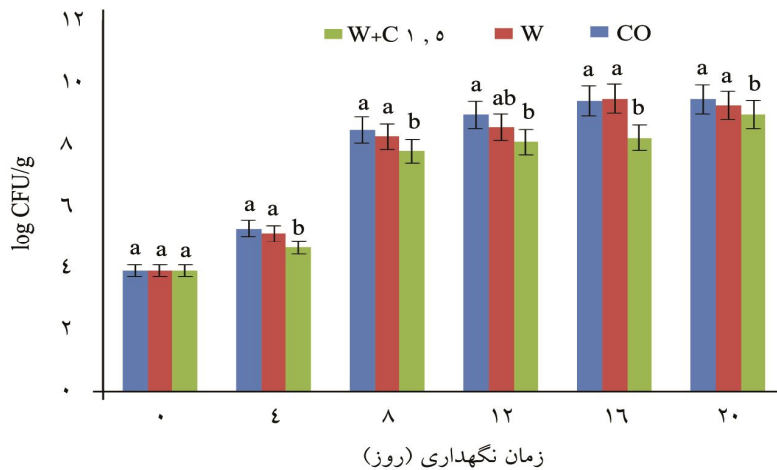


شکل ۱- تغییرات در مجموع بار باکتریایی کل تیمارهای مختلف نگهداری شده در دمای یخچال

co: تیمار شاهد، W: تیمار پروتئین آب پنیر بدون اسانس دارچین، W+C1.5: تیمار پروتئین آب پنیر شامل ۱/۵ درصد اسانس دارچین
تذکر: حروف کوچک متفاوت در هر فاز نشان از تفاوت معنی دار بین تیمارهای مختلف است

بیستم نگهداری به ۹/۵۴، ۹/۵۲ و ۸/۹۶ log CFU/g به ترتیب در تیمار شاهد، تیمار پوششی بدون اسانس و تیمار پوششی با اسانس دارچین رسید. به طور کلی تیمار پوششی شامل ۱/۵ درصد اسانس دارچین تعداد باکتریهای کمتری نسبت به دو تیمار دیگر داشتند. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط سایر پژوهشگران مطابقت دارد (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰b؛ Lu و همکاران، ۲۰۰۹).

تغییرات در تعداد باکتریهای سرماگرا در شکل ۲ نشان داده شده است. باکتریهای سرما دوست گرم منفی گروه اصلی از باکتریهای عامل فساد گوشت ماهی طی شرایط نگهداری به صورت سرد هستند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰b). تعداد باکتریهای سرماگرا در روز صفر نگهداری ۳/۹۸ log CFU/g بوده است. میزان این باکتریها با گذشت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد. تعداد این باکتریها در روز



شکل ۲- تغییرات تعداد باکتری‌های سرماگرا تیمارهای نگهداری شده در دمای یخچال

co: تیمار شاهد، W: تیمار پروتئین آب پنیر بدون اسانس دارچین، W+C1.5: تیمار پروتئین آب پنیر شامل ۱/۵ درصد اسانس دارچین
تذکر: حروف کوچک متفاوت در هر فاز نشان از تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف است

احتمالاً پوشش بدون 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 اسانس دارچین با روکش‌های خوراکی آب‌دوست ضمن تقویت خواص ضدباکتریایی روکش‌ها منجر به کاهش آب‌دوستی روکش‌ها می‌شود (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a).

به‌طور کلی نتایج اندازه‌گیری بار میکروبی فیله ماهی نشان داد بین تیمار شاهد با تیمار پروتئین آب پنیر بدون اسانس دارچین، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P > 0.05$). این با نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ که نشان داد محلول تشکیل‌دهنده فیلم پروتئین آب پنیر بدون اسانس دارچین بدون فعالیت‌های ضد میکروبی است، مطابقت دارد. همچنین به دلیل آب‌دوست بودن پوشش پروتئینی و نیز فعالیت آبی بالای بافت ماهی

منابع

1. Arashisara, S., Hisara, O., Kayab, M., and Yanik, T., 2004. Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) filets. *Inter. J. Food Microb.* 97, 209-214.
2. Burt, S.A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Inter. J. Food Microb.* 94, 223-253.
3. Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E.T., 2001. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J. Food Sci.* 66 (6), 865-870.
4. 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.
5. Chae, S., and Heo, T.R., 1997. Production and properties of edible films using whey protein. *Biotechnology and Bioprocessing Engineering*, 2, 122-125.
6. Chang, S.T., Chen, P.F., and Chang, S.C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* 77, 123-127.
7. Dalirsani, Z., Adibpour, M., Aghazadeh, M., Amirchaghmaghi, M., Falaki, F., Mohsannen mozafari, P., and Mojara Hamzei, F., 2011. In vitro comparison of inhibitory activity of 10 plant extracts against *Candida albicans*. *Austr. J. Basic Appl. Sci.* 5, 930-935.

8. 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.
9. 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.
10. Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., and Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapor phase of combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116, 982-989.
11. Hosseini, M., Razavi, S., and Mousavi, M., 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J. Food Proc. Preserv.* 33, 727-743.
12. 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.
13. 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. *J. Agric. Food Chem.* 20, 5167-5178.
14. 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. *J. Food Sci.* 76, 90-102.
15. 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. *J. Food Sci. Agric.* 89, 848-854.
16. 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 27-31.
17. Morr, C.V., and Ha, E.Y.W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional *Food Sci. Nutr. Properties.* CRC Crit. Rev. 33 (6), 431-476.
18. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H., 2010a. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry.* 120, 193-198.
19. 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.
20. Ouattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A., Piette, G.J.P., and Bégin, A., 1997. Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *J. Food Protect.* 60, 246-253.
21. Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., and Holley, R.A., 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Inter. J. Food Microbiol.* 62, 139-148.
22. 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.
23. Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillus, R.J., Friedman, M., Henika, P.R., Martín-Belloso, O., and Mchugh, T., 2006. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2262-2267.
24. Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., and Cháfer, M., 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Engineering Reviews*, 3, 1-16.
25. Singh, H.B., Srivastava, M., Singh, A.B., and Srivastava, A.K., 1995. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxic agent fungi causing respiratory tract mycoses. *Allergy.* 50, 995-9.
26. 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.

27. Valero, M., and Salmeron, M.C., 2002. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Food Microbiology*. 85, 73-81.
28. Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., and Kerry, J.P., 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *J. Food Sci. Technol.* 42, 1128-1138.
29. Yingyud, 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.

**Antimicrobial activity of whey protein based edible film enriched
with Cinnamon oil on the *Huso huso* fillet under refrigerator storage condition**

***S. Bahram¹, M. Rezaei², M. Soltani³, A.Gh. Kamali⁴ and S.M. Ojagh⁵**

¹Ph.D. Student, Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran,
²Associate Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares
University, Noor, Iran, ³Professor, Dept. of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Tehran, Iran, ⁴Professor, Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Science and Research
Branch, Tehran, Iran, ⁵Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and
Natural Resources, Iran

Abstract

Biodegradable protein-based film was developed by incorporating Cinnamon essential oil (CEO) into whey protein concentration (WPC) at level of 0.4%, 0.8% and 1.5% v/v. Then, its antimicrobial activity tested against 6 bacteria and 1 fungus include *Pseudomonas putida* (PTCC 1694), *Escherichia coli* (PTCC 3315), *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163), *Bacillus subtilis* (ATCC 465), *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1768), *Lactobacillus lactis* (PTCC 1366) and the fungus *Candida albicans*. Films containing CEO showed significant antibacterial activity both gram-positive and gram-negative strains and exhibited significant inhibitory effect on the studied fungi. The inhibitory zone in film solutions and film disks were increased with concentration of Cinnamon oil in the polymer matrix ($P < 0.05$). In general, inhibition zones film solutions were higher than those on the disk. Based on results, whey protein edible coating contain 1.5% Cinnamon essential oil was used for microbial assay *Huso huso* during cold storage (4 °C) which could inhibit of total bacteria growth and psychrophilic counts of fillet.

Keywords: Whey protein concentration; Cinnamon; Antimicrobial activity; *Huso huso*

* Corresponding Authors; Email: bahramsomi@gmail.com