بررسی اثر پوشش کیتوزان همراه با اسانس لیمو بر کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا

رضا شرافتی چالشتری*، محسن تقی‌زاده، صفورا میری، زهره اسدی، محدثه عبدی‌پور، وحیده شیری

گروه تغذیه، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Sharafati.reza@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲

چکیده

استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی مانند اسانس‌ها به جای نگهدارنده‌های شیمیایی در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر پوشش کیتوزان همراه با اسانس لیمو بر کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا بود. در این مطالعه تجربی، پس از تهیه اسانس لیمو، اثرات ضد میکروبی اسانس به روش میکرودایلوشن علیه باکتری‌های *شیگلا دیزانتری*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *سالمونلا تایفی* بررسی شد. همچنین اثر کیتوزان حاوی اسانس لیمو در غلظت‌های ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ بر روی کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا در دماهای ۱±۲ درجه سانتیگراد و ۱±۸ درجه سانتیگراد در روزهای صفر، ۳ و ۶ بررسی شد. نتایج نشان داد که حداقل میزان غلظت مهارکنندگی باکتری‌ها و حداقل میزان باکتری‌کشی باکتری‌ها برای چهار باکتری یکسان بود و به ترتیب برابر با ۱/۴۱ و ۲/۸۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. استفاده از کیتوزان همراه با اسانس لیمو سبب کاهش شمارش کلی باکتری‌ها، سرمادوست‌ها و انتروباکتریاسه‌ها در دو دمای مذکور در ماهی قزل‌آلا شد ($p<0/05$). همچنین اثرات ضد باکتریایی اسانس لیموی تنها در حالت سینرژیستی اسانس لیمو با کیتوزان کمتر بود ($p<0/05$). بنابراین می‌توان از این پوشش همراه با اسانس جهت افزایش زمان ماندگاری ماهی قزل‌آلا استفاده نمود.

واژگان کلیدی: کیتوزان، لیمو، قزل‌آلا.

مقدمه

ماهیان و فرآورده‌های آن‌ها، به علت فعالیت آبی بالا، pH نزدیک خنثی، مقادیر نسبتاً بالای اسیدهای آمینه آزاد و حضور آنزیم‌های اتولیزکننده نسبت به گوشت و سایر فراورده‌های گوشتی نسبت به فساد باکتریایی و فساد اکسیداتیو در طی نگهداری حساس‌تر است (خضری احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۴؛ علی بیگی و همکاران، ۱۳۹۲). برای به تعویق انداختن فساد اکسیداتیو و باکتریایی ماهی و فرآورده‌های آن می‌توان از روش‌هایی همچون کنترل درجهٔ حرارت و کاهش آن، بسته‌بندی تحت خلأ، بسته بندی در اتمسفر تغییر یافته، افزودن عوامل ضد میکروبی مانند نمک و افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد. البته باید توجه شود که تعدادی از روش‌های ذکر شده برای نگهداری ماهی که به شکل تازه و خام که از تقاضای زیادی در بین مصرف‌کنندگان برخوردار است کاربرد ندارد (Kerry et al., 2006; Lin and Lin, 2005).

دماهای یخچالی برای نگهداری بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده است ولی در مورد ماهی و فرآورده‌های آن به دلیل رشد میکروب‌های سرمادوست به همراه تجزیه آنزیمی و

بیوشیمیایی فساد ایجاد خواهد شد. بنابراین می‌توان از شناورسازی ماهی در مواد ضد باکتریایی و یا اسپری این مواد بر روی سطح آن‌ها جهت افزایش زمان ماندگاری استفاده کرد (خضری احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۴؛ ذوالفقاری و همکاران، ۱۳۸۹). امروزه با توجه به دیدگاه نامطلوب مصرف‌کنندگان در خصوص افزودنی‌های شیمیایی و مضرات آن‌ها در مواد غذایی، گرایش به سمت استفاده از افزودنی‌های طبیعی است (Sharafati Chaleshtori et al., 2013). با این حال به‌دلیل آزاد شدن این ترکیبات مانند اسانس‌ها به صورت کنترل‌نشده در ماده غذایی و ایجاد بوها و طعم‌های تند و یا غیرفعال شدن قسمتی از این ترکیبات فعال به‌دلیل واکنش با مواد غذایی، عملکرد آن‌ها کاهش می‌یابد (Quintavalla and Vicini, 2002). بنابراین می‌توان با استفاده از پوشش‌های خوراکی حاوی ترکیبات ضد میکروبی که به صورت کندتر سبب آزادسازی این ترکیبات به داخل گوشت می‌شوند و سبب حفظ غلظت‌های بالاتر ترکیبات ضد میکروبی در سطح گوشت می‌شود کارایی این روش را افزایش داد (خضری احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۴).

فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر و با قابلیت خوراکی مختلف با منشا پلی‌ساکارید، پروتئین و چربی برای افزایش زمان ماندگاری انواع مختلفی از مواد غذایی استفاده می‌شوند. کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر غیر سمی و زیست تخریب‌پذیر که از کیتین موجود در پوسته خارجی سخت پوستان به‌دست می‌آید در صنایع غذایی مورد مصرف می‌باشد. در مطالعات گذشته اثرات ضدباکتریایی، ضدسرطانی و کاهش‌دهندگی کلسترول توسط کیتوزان گزارش شده‌است (Perricone et al., 2015; Younes and Rinaudo, 2015). خاصیت ضد باکتریایی کیتوزان مربوط به وجود بار مثبت مولکول‌های آن و نتیجه‌ی واکنش با ملکول‌های با بار منفی غشای سلول باکتری می‌دانند (Younes and Rinaudo, 2015). با این حال (Ouattara et al., 2000) به کاهش خاصیت آنتی‌باکتریایی کیتوزان هنگام استفاده از آن به شکل پوشش و یا فیلم اشاره کرده‌اند (Ouattara et al., 2000).

مطالعات گذشته استفاده از اسانس‌های گیاهی را برای محافظت از انواعی از مواد غذایی در مقابل میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زا نشان داده‌اند (Perricone et al., 2015; Sharafati Chaleshtori et al., 2015a). لیمو یکی از اسانس‌های معطر و مناسب به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی، بویژه لیمونن، آلفاترپینئول و بتاپینن به عنوان عوامل ضدمیکروبی یک افزودنی غذایی با پتانسیل خوب است. در مطالعه‌های گذشته اثرات ضدمیکروبی تعدادی از اسانس‌ها و عصاره‌ها بر روی گوشت و ماهی نشان داده‌شد (Perricone et al., 2015; Speranza et al., 2010). اثرات ضدمیکروبی برخی از فیلم‌های خوراکی حاوی اسانس‌ها و عصاره‌ها به‌وسیله تعدادی از محققان ارزیابی شده‌است. با این وجود به‌دلیل اینکه تاکنون مطالعه‌ای در به کارگیری از اسانس لیمو همراه با کیتوزان بر روی گوشت ماهی وجود ندارد بنابراین هدف از این بررسی اثر پوشش کیتوزان همراه با اسانس لیمو بر کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا در دماهای ۱±۲ و ۱±۸ درجه سانتی‌گراد بود.

مواد و روش کار

تهیه اسانس و آماده‌سازی کیتوزان و نمونه ماهی اسانس لیمو با درجه غذایی و استاندارد شده بر اساس میزان ترکیب لیمونن با غلظت ۷۰/۷۸ درصد و دانسیته ۰/۸۵ گرم در میلی‌لیتر در ۲۰ درجه سانتیگراد، از شرکت باریج اسانس تهیه شد. همچنین کیتوزان با وزن ملکولی متوسط از شرکت سیگما (کشور آمریکا) خریداری گردید. برای تهیه فیلم، ابتدا محلول اسید استیک دو درصد تهیه و سپس محلول کیتوزان دو درصد در اسید مذکور تهیه و پس از حل شدن

کامل (۲/۵ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد) و عبور دادن از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱، به میزان دو درصد حجمی-حجمی از پلاستی سایزر گلیسرول به محلول اضافه گردید (Fernandes et al., 2012). سپس محلول کیتوزان همراه با اسانس لیمو با غلظت های ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد تهیه شد.

نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن تقریبی ۲۰±۳۵۰ گرم از مراکز فروش ماهی در شهر کاشان خریداری و سریعاً در کنار یخ به آزمایشگاه کنترل غذای دانشگاه علوم پزشکی کاشان انتقال یافتند. پس از شست و شوی اولیه توسط آب سرد استریل، به قطعات ۱۰ گرمی تقسیم شدند. گروه‌های تیمار و کنترل شامل: ۱) گوشت ماهی بدون اسانس و پوشش کیتوزان، ۲) گوشت ماهی بدون اسانس و همراه با پوشش کیتوزان ۳) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس لیمو ۴) گوشت ماهی با پوشش کیتوزان و غلظت ۰/۵ درصد اسانس لیمو ۵) گوشت ماهی با غلظت ۰/۲۵ درصد اسانس لیمو و ۶) گوشت ماهی با غلظت ۰/۵ درصد اسانس لیمو بودند. به منظور پوشش نمونه‌ها توسط محلول کیتوزان، آنها را یک دقیقه در محلول غوطه ور نموده و به مدت ۳۰ دقیقه مجاورت هوا خشک کردیم. سپس کلیه نمونه‌های آماده‌سازی شده در دو دمای ۱±۲ و ۱±۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و آنالیزهای میکروبی بر روی آن‌ها در روزهای صفر، سه و شش صورت پذیرفت.

فعالیت ضد میکروبی

جهت تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس لیمو و کیتوزان از باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* (۱۱۶۶: PTCC)، *سالمونلا تایفی* (۱۶۰۹: PTCC)، *استرپتوکوکوس پایوژنز* (۱۴۴۷: PTCC) و *شیگلا دیزانتری* (۱۱۸۸:) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران استفاده شد. سپس باکتری‌های مورد نظر جهت تهیه سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند به محیط کشت تریپتیک سوی براث منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری‌ها (MBC) با استفاده از روش میکرودایلوشن اندازه‌گیری گردید. به این صورت که برای هر تست ۹ چاهک از پلیت الیزا انتخاب شد و به هر کدام ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث اضافه، سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل لوله ۰/۵ مک فارلند به همه چاهک‌ها اضافه نمودیم. سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی اسانس لیمو معادل (۶۶۶-۵/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه کردیم. چاهک شماره ۸ صرفا حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت به عنوان کنترل منفی و چاهک شماره ۹ حاوی ۱۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث باضافه ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حجم نهایی در تمامی چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر بود. پس از مخلوط کردن نمونه‌ها توسط شیکر (۲۰ ثانیه با ۳۰۰ دور در دقیقه) آنها را به مدت ۲۴- ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده و چاهک‌ها را از نظر وجود کدورت و یا عدم کدورت مورد بررسی قرار دادیم رقت چاهک حاوی کمترین غلظت اسانس که باعث جلوگیری از رشد باکتری (عدم ایجاد کدورت) شد به عنوان میزان حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد باکتری (MIC) تعیین گردید. سپس از نمونه‌های چاهک‌های بدون کدورت بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار پاساژ داده و میزان حداقل غلظت‌کشندگی باکتری (MBC) نیز تعیین شد (Sharafati Chaleshtori et al., 2015).

آزمون‌های میکروبی

نمونه‌های ۱۰ گرمی هر کدام از تیمارهای مورد نظر به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد (رقت ۱-)، سپس رقت‌های بعدی با استفاده از لوله‌های رقت به‌دست آمد. شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل و انتروباکتریاسه‌ها به ترتیب در محیط کشت plate count agar و ویولت ردبایل گلوکز آگار (VRBGA) به روش کشت سطحی انجام و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. شمارش باکتری‌های سرما دوست در محیط کشت Glutamat Starch Phenol Red Agar (GSPAgar) به روش کشت سطحی انجام و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد (خضری احمدآباد و همکاران، ۱۳۹۴؛ ذوالفقاری و همکاران، ۱۳۸۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمون‌های میکروبی با دو بار تکرار و به صورت میانگین به‌دست آمده همراه با انحراف معیار گزارش گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ و آزمون واریانس و آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج، اسانس لیمو دارای اثرات ضد میکروبی بوده و این اثرات در جدول شماره ۱ قابل مشاهده می‌باشد. اثرات ضد میکروبی اسانس برای هر چهار باکتری مشابه بود ولی اثرات ضد میکروبی آن نسبت به فیلم کیتوزان کمتر بود. حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به فیلم کیتوزان به ترتیب برای *استرپتوکوکوس پایوژنز* و *سالمونلا تایفی* بودند.

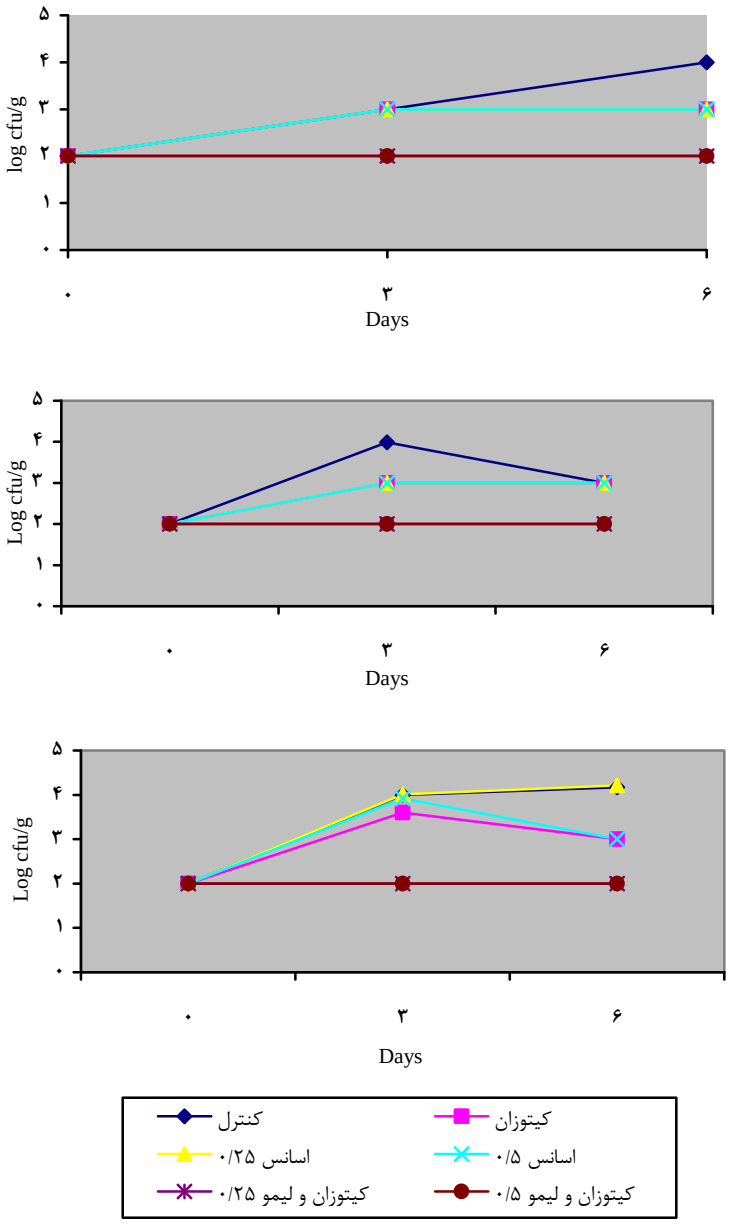
جدول ۱- حداقل میزان مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل میزان کشندگی باکتری‌ها (MBC) تحت تاثیر اسانس لیمو و کیتوزان بر روی *شیگلا دیزانتری*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تایفی* و *استرپتوکوکوس پایوژنز*

	شیگلا دیزانتری		*لیستریا مونوسیتوژنز*		*سالمونلا تایفی*		*استرپتوکوکوس پایوژنز*	
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
اسانس لیمو	۱/۴۱	۲/۸۱	۱/۴۱	۲/۸۱	۱/۴۱	۲/۸۱	۱/۴۱	۲/۸۱
پوشش کیتوزان	۰/۵	۱	۰/۵	۱	۱	۲	۰/۲۵	۰/۵

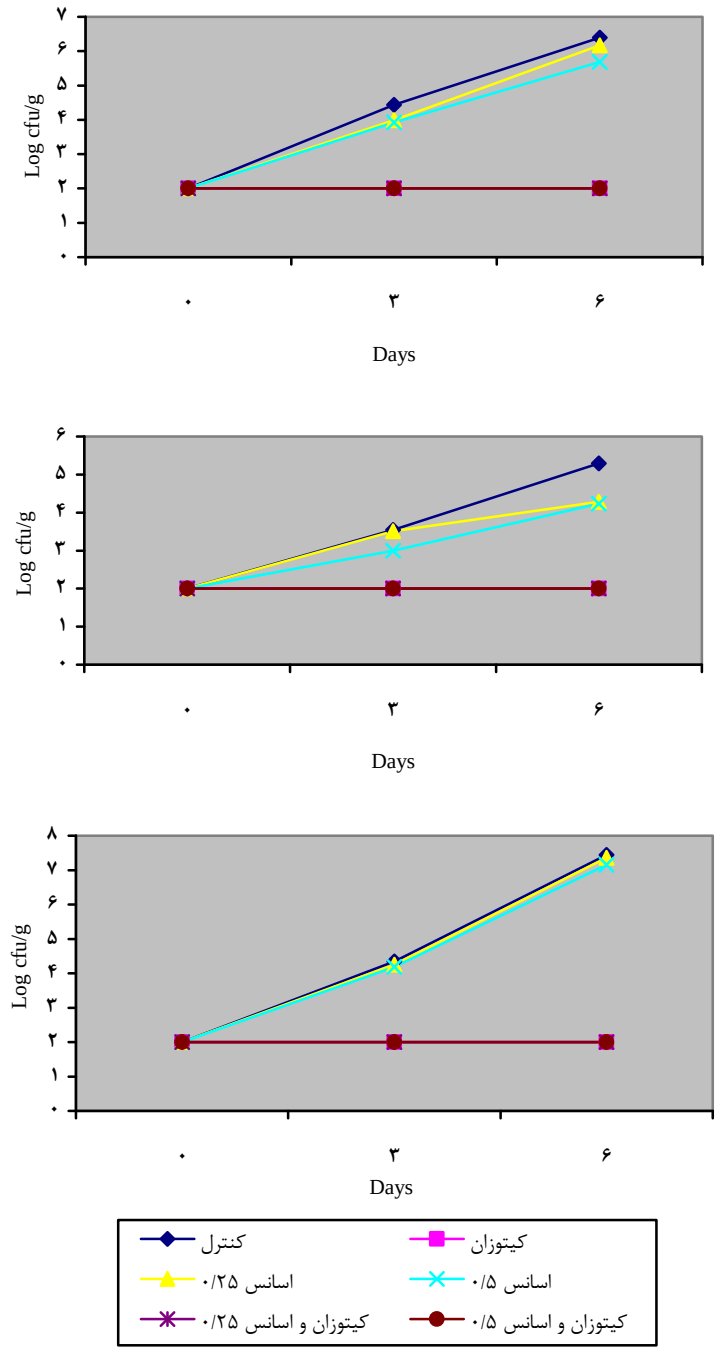
نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که برای شمارش کلی باکتری‌ها در روز صفر، بین گروه کنترل و تیمارها در دمای ۱±۲ درجه سانتیگراد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P>۰/۰۵). در روز سوم میزان شمارش کلی باکتری‌ها در دو تیمار کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۲۵ درصد و کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۵ درصد معادل $cfu/g <10^2$ بود که نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ششم در گروه کنترل شمارش کلی باکتری‌ها نسبت به سایر گروه‌ها افزایش نشان داد (P<۰/۰۵) با این حال کمترین میزان رشد در گروه‌های

کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۲۵ درصد و کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۵ درصد مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست آمده برای شمارش انتروباکتریاسه‌ها در دمای ۱±۲ درجه سانتیگراد، در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در روز سوم شمارش انتروباکتریاسه‌ها به حدود 10^4 cfu/g رسید که با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین در این روز میزان رشد انتروباکتریاسه‌ها در تیمارهای فقط حاوی اسانس ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد نسبت به همراه بودن با پوشش کیتوزان بیشتر بود. تصویر شماره ۱ میزان کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا را پس از استفاده از اسانس‌ها و پوشش کیتوزان همراه با اسانس‌ها در روزهای مختلف نشان می‌دهد. اثرات اسانس‌ها و فیلم کیتوزان در مورد شمارش سرمادوست‌ها در روزهای مختلف در تصویر ۱ نشان داده شده‌است. با این وجود در روز ششم گروه‌های اسانس ۰/۵ درصد و کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۲۵ درصد و کیتوزان همراه با اسانس لیمو ۰/۵ درصد سبب کاهش تعداد باکتری‌ها نسبت به سایر تیمارها به صورت معنی‌داری شده‌است (P<۰/۰۵).

نتایج این مطالعه نشان داد که در دمای ۱±۸ درجه سانتیگراد، در روز صفر بین گروه‌های کنترل و تیمار تفاوت معنی‌داری در شمارش کلی باکتری‌ها و شمارش انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها وجود ندارد. همان‌طور که در تصویر ۲ قابل مشاهده است در روز سوم در گروه کنترل شمارش کلی باکتری‌ها، شمارش انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها افزایشی بوده که به صورت معنی‌داری با تمام گروه‌ها مشاهده می‌شود (P<۰/۰۵). در روز سوم در تیمار کیتوزان و تیمارهای کیتوزان همراه با غلظت‌های مختلف اسانس افزایشی در تعداد کلی باکتری‌ها، شمارش انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها صورت نگرفت ولی در تیمارهای اسانس ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد لیمو رشد قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. در روز ششم نتایج نشان داد که غلظت‌های اسانس لیمو نسبت به تیمار کیتوزان و کیتوزان همراه با غلظت‌های مختلف اسانس نتوانستند اثر معنی‌داری در کاهش شمارش کلی باکتری‌ها، شمارش انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها داشته باشند. به هر حال مشخص شد که با افزایش غلظت اسانس کاهش در شمارش انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها صورت گرفته است (P<۰/۰۵) (تصویر ۲).



شکل ۱-اثر غلظت‌های مختلف اسانس لیمو و کیتوزان همراه با اسانس لیمو بر کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا در دمای ۱±۲ درجه سانتی‌گراد (اشکال از بالا به پایین به ترتیب مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها، انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها می‌باشد).



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف اسانس لیمو و کیتوزان همراه با اسانس لیمو بر کیفیت میکروبی ماهی قزل‌آلا در دمای ۱±۸ درجه سانتیگراد (اشکال از بالا به پایین به ترتیب مربوط به شمارش کلی باکتری‌ها، انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها می‌باشد.

بحث

لیمو به‌طور سنتی به عنوان یک افزودنی معطر به انواع غذاها استفاده می‌شود. براساس نتایج به‌دست آمده این مطالعه، اسانس لیمو در شرایط آزمایشگاهی به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی به‌ویژه که حاوی ترکیب لیمونن با غلظت ۷۰/۷۸ درصد بود، اثرات ضد باکتریایی نشان داد. در مطالعات دیگر محققان که همسو با مطالعه فوق بود بیشترین میزان ترکیب

اسانس لیمو را لیمونن، آلفا ترپینئول و بتاپینن گزارش کردند (Reichling et al., 2006; AL-Jabri et al., 2014). ترکیبات موجود در اسانس‌ها که شامل انواع مونوترپن‌ها، سسکوئی‌ترپن‌ها و مشتقات اکسیژنه آن‌ها می‌باشند دارای اثرات ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (AL-Jabri et al., 2014). اثرات ضد باکتریایی اسانس لیمو در مطالعات گذشته در شرایط آزمایشگاهی بر روی *اشریشیاکلی* O157:H7، *کمپیلوباکتر ژژونی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و مدل‌های غذایی مانند پنیر نشان داده شده‌است (Fisher and Phillips, 2006; Gammariello et al., 2008). در بررسی حاضر نیز اثر ضد باکتریایی اسانس بر روی چهار باکتری منتقله از غذا نشان داده‌شد که در مقایسه با کیتوزان اثر کمتری داشت که می‌تواند یکی از دلایل آن نوع تهیه کیتوزان باشد که در شرایط اسیدی تهیه شده‌است. تفاوت‌هایی که در میزان خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس‌ها در بررسی‌های محققان مشاهده می‌شود که می‌تواند در اثر وجود ترکیبات متفاوت در اسانس‌ها، که آن نیز متاثر از فاکتورهایی همچون موقعیت جغرافیایی، دما، مرحله رشد گیاه، زمان برداشت گیاه، فاکتور زمین و به‌طور کلی فاکتورهای محیطی و ژنتیکی گیاه باشد (Goze et al., 2009).

با توجه به دیدگاه و عملکرد جدید سازمان‌های متولی بهداشت مواد غذایی و مصرف‌کنندگان غذا همانند سازمان جهانی بهداشت (WHO) در جایگزین نمودن نگهدارنده‌های طبیعی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی مضر مانند بوتیلیتد هیدروکسی تولوئن (BHT)، بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (BHA)، نیترات و نیترت‌ها، تا کنون مطالعات متعددی روی اثرات ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی مختلف صورت پذیرفته است (Sharafati Chaleshtori et el., 2014). به‌دلیل اثرات ناخواسته احتمالی که اسانس‌ها در غلظت‌های زیاد بر طعم و بوی غذا می‌گذارند، استفاده از آن‌ها را به تنهایی به عنوان یک نگهدارنده غذایی محدود می‌سازد. بنابراین در سال‌های اخیر استفاده از تکنولوژی مانعی[1] در جهت افزایش اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی توام با سایر عوامل درون اثر و برون اثر علیه میکروب‌های بیماری‌زای مهم مواد غذائی، روبه گسترش است (Sharafati Chaleshtori et al., 2014). براساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داده‌شد که استفاده از پوشش کیتوزان به‌تنهایی و یا همراه با غلظت‌های مختلف اسانس لیمو سبب جلوگیری از رشد کلی باکتری‌ها، انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها در دو دمای ۱±۲ و ۱±۸ درجه سانتیگراد شد. همچنین با افزایش غلظت اسانس اثرات ضد میکروبی نیز در مدل غذایی ماهی مشخص شد به‌طوری‌که در دمای ۱±۸ درجه سانتیگراد، اسانس لیموی ۰/۵ درصد سبب کاهش رشد انتروباکتریاسه‌ها و سرمادوست‌ها نسبت به اسانس لیموی ۰/۲۵ درصد شد ($P<0/05$). همچنین در این بررسی مشخص شد استفاده از دماهای پایین در جلوگیری از رشد باکتری‌ها همزمان با استفاده از سایر روش‌ها در افزایش مدت زمان ماندگاری ماهی قزل‌آلا موثر است.

اثرات ضد باکتریایی پوشش‌های کیتوزانی به‌دلیل بار مثبت گروه‌های آمینی آن‌ها و واکنش با گروه‌های آنیونی سطح سلولی باکتری‌ها است که نهایتا باعث مرگ باکتری‌ها می‌شود. همراه شدن پوشش کیتوزان با اسانس‌ها سبب افزایش اثرات ضد میکروبی شده‌است. اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها را می‌توان به ترکیبات فنولی نسبت داد که به سبب وجود این ترکیبات می‌توانند با حمله به فسفولیپیدهای غشا سلولی سبب افزایش نفوذپذیری و خارج شدن محتویات سیتوپلاسم شود به‌علاوه این ترکیبات می‌توانند به آنزیم‌های

[1] -Hurdle Technology

موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها نیز تاثیرگذارند (Wu et al., 2013). در بررسی اثرات ترکیبات ژلاتین همراه با کیتوزان و اسانس پونه علیه *اشریشیاکلی* O157:H7 را نشان داده‌اند. در بررسی صورت گرفته شده نشان داده‌شد که با گذشت زمان بر تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی بر روی ماهی افزوده شد ولی در نمونه‌های ژلاتین همراه با کیتوزان و اسانس پونه مقدار افزایش کمتر بوده است (Wu et al., 2014). در بررسی ها نشان داده‌شده که استفاده از فیلم‌های حاوی ترکیبات ضد باکتریایی مانند اسانس‌ها و عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیکی مانند نایسین به‌دلیل اینکه به مرور این ترکیبات را در غذا رها می‌سازند موثرترند نسبت به زمانی که این ترکیبات را به تنهایی در غذا اضافه می‌کنند (Sánchez-Ortega et al., 2014).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشانگر این بود که اسانس لیمو دارای خاصیت ضد باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی است. از طرفی خاصیت ضد باکتریایی اسانس وقتی با پوشش کیتوزانی همراه شد سبب بهبود وضعیت میکروبی ماهی قزل‌آلا به‌ویژه در دمای بالای دمای یخچالی شد که می‌توان ترکیب مذکور را به‌عنوان یک پوشش بسته‌بندی مناسب در صنایع تبدیلی غذایی معرفی نمود. همچنین پیشنهاد می‌گردد با توجه به نتایج به‌دست آمده جهت استفاده گسترده و عملی از این اسانس‌ها بررسی‌های سم‌شناسی و اقتصادی و میکروبی بیشتری صورت گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری کارمندان آزمایشگاه کنترل غذای معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی کاشان کمال تشکر را دارند.

منابع

۱. خضری احمدآباد، محمد.، رضائی، مسعود و اجاق، سید مهدی. (۱۳۹۴). اثرپوشش خوراکی پروتئین آب پنیر بر کیفیت میکروبی فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نگهداری شده در شرایط سرد. فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، سال ۱۲، شماره ۴۹، صفحه ۲۰-۱۱.

۲. ذوالفقاری، مهدی.، شعبانپور، بهاره و فلاح زاده، ساناز. (۱۳۸۹). مقایسه تاثیر عصاره‌های آویشن شیرازی، پیاز و کاکوتی کوهی بر زمان ماندگاری فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) . پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، سال ۱۲، شماره ۲، صفحه ۱۲۹-۱۲۱.

۳. علی‌بیگی، طیبه.، علیزاده دوغیکلائی، ابراهیم و زکی‌پور رحیم‌آبادی، اسحق. (۱۳۹۲). بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی پوست پرتقال بر کیفیت فیله‌ی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)هنگام نگهداری در یخچال (۴ °c). مجله شیلات، سال ۶۶، شماره ۲، صفحه ۱۹۷-۱۸۵.

4. AL-Jabri, N.N., and Hossain, M.A. 2014. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci. 3: 247-253.
5. Fernandes, I.P., Leite, E., Vilas-Boas, D., Amaral, J.S., and Barreiro, M. 2012. Production of chitosan based films enriched with oregano essential oil for increased antibacterial activity. 11º Encontro de Química dos Alimentos. Bragança, Portugal, 16-19 Set.
6. Fisher, K., and Phillips, C. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. J Appl Microbiol. 101: 1232–1240.
7. Gammariello, D., Di Giulio, S., Conte, A., and Del Nobile, M.A. 2008. Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese. J Dairy Sci. 91: 4138-4146.
8. Goze, I., Alim, A., Tepe, A. S., Sokmen, M., Sevgi, K., and Tepe, B. 2009. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of Origanum rotundifolium Boiss. from Turkey. J Med Plants Res. 3**:** 246-254.
9. Kerry, J., O'grady, M., and Hogan, S. 2006. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. Meat Sci. 74**:** 113-130.
10. Lin, C.C., and Lin, C.S. 2005. Enhancement of the storage quality of frozen bonito fillets by glazing with tea extracts. Food control. 16**:** 169-175.
11. Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Begin, A., and Holley, R. A. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in

Essential Oil in Beef Burger. J Agr Sci Tech. 17: 817-826.

18. Sharafati-Chaleshtori, R., Rafieian-Kopaei, M., Drees, F., Sharafati-Chaleshtori, A., and Salehi, E. 2014. Use of Tarragon (Artemisia Dracunculus) Essential Oil as a Natural Preservative in Beef Burger. Ital J Food Sci. 26: 427-432.
19. Sharafati Chaleshtori, R., Rokni, N., Razavilar, V., and Rafieian Kopaei, M. 2013. The Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activity of Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Essential Oil and Its Chemical Composition. Jundishapur J Microbiol. 6(9): e7877.
20. Speranza, B., and Corbo, M.R. 2010. Essential oils for preserving perishable foods: possibilities and limitations. In: Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Sinigaglia M. (ed). Application of Alternative Food-Preservation Technologies to Enhance Food Safety & Stability. Sharjah, Bentham Publisher, 35–57.
21. Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., and Zhang, Q. 2013. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. Food Hydrocoll. 32: 42-51.
22. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., Li, J., and Zhang, Q. 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) skin gelatin-chitosan films incorporated with processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. Int J Food Microbiol. 62**:** 139-148.
12. Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., and Bevilacqua, A. 2015. Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. Front Microbiol. 6: 76.
13. Quintavalla, S., and Vicini, L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. Meat sci. 62**:** 373-380.
14. Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., and Saller, R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview. Forsch Komplementmed. 16: 79-90.
15. Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E.M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J.E., and Regalado, C. 2014. Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. ScientificWorld J. 248935: 1-18.
16. Sharafati Chaleshtori, R., Rafieian-Kopaei, M., and Salehi, E. 2015a. Bioactivity of Apium petroselinum and Portulaca oleracea Essential Oils as Natural Preservatives. Jundishapur J Microbiol. 8: e20128.
17. Sharafati Chaleshtori, R., Rokni, N., Rafieian-Kopaei, M., Drees, F., and Salehi, E. 2015b. Antioxidant and Antibacterial Activity of Basil (Ocimum basilicum L.)

oregano essential oil for fish preservation. Food Packaging and Shelf Life. 2: 7-16.

23. Younes, I., and Rinaudo, M. 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. Mar Drugs. 13: 1133-1174.

The effect of chitosan coating contained lemon essential oil on microbial quality of rainbow trout

Sharafati-chaleshtori R*, Taghizadeh M, Miri S, Asadi Z, Abdipor M, Shiri V

Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

***Corresponding author:** *Sharafati.reza@gmail.com*

Accepted: 24 July 2015 Received: 11 May 2015

Abstract

There is a growing interest to replace synthetic chemicals by natural compounds as essential oils in food industries. The purpose of this study was the effect of chitosan coating contained lemon essential oil on microbial quality of rainbow trout. In this experimental study, after prepared lemon essential oil, evaluated antibacterial activities against *Shigella dysenteriae, Listeria monocytogenes, Streptococcus pyogenes* and *Salmonella typhi* by micro dilution method. The effects of chitosan with concentrations of 0.25% and 0.5% (v/w) of lemon essential oil at 2±1 °C and 8±1 °C were examined on microbial quality of rainbow trout in zero, 3 and 6 days. Results showed that Minimum inhibitory concentration and Minimum bactericidal concentration for above bacteria was same and was to equal 1.41 mg/ml and 2.81 mg/ml, respectively. The use of chitosan and lemon essential oil caused decrease the total count of bacteria, enterobacteriaceae and psychrotrophic bacteria in two temperature above ($P<0.05$). Also, antibacterial effects of alone lemon essential oil compared with synergistic chitosan with lemon essential oil was lower ($P<0.05$). Therefore, the film contained essential oil above can be used for increase of shelf life rainbow trout.

Keywords: Chitosan, Lemon, Rainbow trout.