Food Hygiene, Vol. 14, No. 54, Summer 2024

"Research article" **DOI: 10.71876/jfh.2024.1122822**

The effect of edible coatings based on carboxymethyl cellulose containing thyme essential oil and thyme essential oil nanoliposomes on the microbial characteristics of chicken fillet

Jabraeili Pour, S.[1] , Mirzaei, H.[2*] , Anarjan, N.[3] , Javadi, A.[2] , Behnajady, M.A.[4]

1. Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
4. Professor, Department of Chemistry, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

[*]Corresponding author's email: hmirzaei@iaut.ac.ir

(Received: 2024/ 6/26 Accepted: 2024/10/22)

Abstract

Active edible coatings containing antibacterial compounds offer a promising solution for extending the shelf life of chicken meat. This study aimed to investigate the effects of carboxymethyl cellulose (CMC)-based edible coatings, incorporating thyme essential oil in both macro-structured and microencapsulated (nanoliposomal) forms, on the microbial characteristics of chicken fillet meat during refrigerated storage. Four types of chicken fillet samples were prepared: (1) CMC-based coatings, (2) CMC-based coatings with thyme essential oil encapsulated in nanoliposomes, (3) CMC-based coatings with macro-structured thyme essential oil, and (4) a control group. The samples were stored at 4°C for 15 days and tested on days 1, 3, 6, 9, 12, and 15 for total bacterial count, psychrophilic bacterial count, *Enterobacteriaceae* count, and *Lactobacillus* count. The results demonstrated that bacterial populations increased in all groups over time. However, the bacterial count was significantly lower in the samples with coatings containing thyme essential oil nanoliposomes compared to the other groups, including those with macro-structured thyme essential oil coatings ($p \leq 0.05$). Additionally, samples with coatings containing macro-structured thyme essential oil showed significantly lower bacterial counts than the control and CMC-coated samples ($p \leq 0.05$). No significant difference in bacterial counts was observed between the control and CMC-coated groups. In conclusion, CMC-based active edible coatings containing thyme essential oil nanoliposomes effectively extended the shelf life of raw chicken fillet meat, offering a safe and efficient solution for preserving the quality and safety of chicken meat during refrigerated storage.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: nanoliposome, essential oil of thyme, active edible coatings, natural preservative, chicken fillet

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.71876/jfh.2024.1122822

اثر پوشش‌های خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس آویشن و نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن روی ویژگی‌های میکروبی فیله‌های مرغ

اثر اسانس آویشن روی ویژگی‌های میکروبی مرغ

شاهین جبرائیلی‌پور[۱]، حمید میرزایی[۲*]، نویده انرجان[۳]، افشین جوادی[۲]، محمدعلی بهنژادی[۴]

۱- دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳- استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴ - استاد گروه مهندسی شیمی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی ،تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: hmirzaei@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۴/۶ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۸/۱)

چکیده

پوشش‌های خوراکی فعال حاوی ترکیبات ضد باکتریایی می‌تواند یک راهکار کارآمد در افزایش ماندگاری گوشت مرغ باشد. هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر پوشش‌های خوراکی برپایه کربوکسی متیل سلولز (CMC)، حاوی اسانس آویشن (هم به‌صورت ماکروساختار و هم به‌صورت ریزپوشانی شده درسیستم‌های نانولیپوزومی) بر روی ویژگی‌های میکروبی گوشت فیله مرغ در طول دوره نگهداری در یخچال بود. برای این منظور نمونه‌های فیله مرغ در ۴ گروه با پوشش‌های برپایه CMC، برپایه CMC حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن، برپایه CMC حاوی اسانس آویشن و گروه کنترل تهیه و به مدت ۱۵ روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و در روزهای ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ از نظر شمارش کلی باکتری ها، شمارش باکتری‌های سرمادوست، تعداد آنتروباکتریاسه و تعداد لاکتوباسیلوس‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد جمعیت های باکتریایی در همه گروه‌های تحت مطالعه افزایش می‌یابد ولی در همه موارد جمعیت باکتریایی در نمونه‌های با پوشش‌های حاوی نانولیپوزوم اسانس آویشن بطور معنی‌دار کمتر از سایر نمونه ها و حتی کمتر از نمونه‌های با پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس آویشن ماکروساختار می‌باشد ($p\leq ۰/۰۵$). همچنین در نمونه‌های با پوشش‌های حاوی اسانس آویشن ماکروساختار بطور معنی‌دار کمتر از نمونه‌های دو گروه دیگر بود ($p\leq ۰/۰۵$). بین تعداد باکتری‌های شمارش شده در دو گروه کنترل و با پوشش CMC تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. در مجموع می‌توان گفت پوشش‌های خوراکی فعال برپایه CMC حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن تهیه شده یک راهکار کارامد و ایمن جهت افزایش ماندگاری گوشت فیله مرغ خام باشد.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم؛ اسانس آویشن؛ پوشش‌های خوراکی فعال؛ نگه‌دارنده طبیعی؛ گوشت فیله مرغ

مقدمه

با افزایش سریع جمعیت و احتیاج روزافزونی که به مواد غذایی بالأخص مواد پروتئینی احساس می‌شود، تأمین نیازهای غذایی انسان در جوامع بشری دردرجه اول اهمیت قرارگرفته است. از این‌رو، گوشت طیور می‌تواند به‌عنوان یک منبع پروتئین حیوانی در تغذیه انسان مورداستفاده قرار گیرد. درصد پروتئین بالا، چربی کمتر، ارزان بودن، پخت آسان و سریع، قابلیت هضم و جذب بالا، سهولت و سرعت بالای تولید از جمله عوامل ارجحیت گوشت ماکیان است (Dave *et al.*, 2011). از این‌رو با افزایش تقاضا برای مصرف این گوشت، توجه به کیفیت آن خصوصاً از نقطه نظر ایمنی میکروبی اهمیت زیادی پیدا کرده است. خصوصاً اینکه گوشت مرغ به دلیل دارا بودن مواد تغذیه‌ای بالا و نیز سایر عوامل داخلی مساعد، برای رشد اکثر میکروارگانیسم‌ها بستر بسیار مناسبی است. بنابراین این گوشت مرغ در بسته‌بندی معمولی در صورت نگهداری تا ۴ درجه سلسیوس، تنها تا ۳ روز ماندگاری دارد. در این راستا، تحقیقات مختلفی در خصوص افزایش ماندگاری گوشت مرغ انجام‌شده است که برخی از آن‌ها استفاده از فرآوری‌های فیزیکی و شیمیایی مانند تکنولوژی‌های فشار بالا، میدان‌های مغناطیسی و الکتریکی، مواد نگه‌دارنده و بسته‌بندی‌های پیشرفته است.

بسته‌بندی مواد غذایی از ورود عوامل خارجی مانند میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند. همچنین از غذا در برابر تغییر رنگ و طعم نامطلوب محافظت می‌کند. گوشت ازجمله گوشت ماکیان نیز از این قاعده مستثنا نیست و کیفیت و ایمنی آن به فناوری بسته‌بندی بستگی دارد. امروزه، یک سری فناوری‌های جدید بسته‌بندی مانند بسته‌بندی هوشمند و یا فعال و با استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی توسعه‌یافته است. این فناوری‌ها از کیفیت و ایمنی محصولات غذایی پشتیبانی می‌کنند و همچنین مصرف‌کنندگان را به خود جلب می‌کنند (Fang *et al.*, 2017). پوشش‌های خوراکی (Edible coating) به‌تنهایی یا حاوی مواد زیست فعال می‌تواند در راستای افزایش ماندگاری گوشت‌ها روش بسیار کارآمد باشد. پوشش‌های خوراکی حاوی مواد زیست فعال تحت عنوان پوشش خوراکی فعال شناخته می‌شوند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌میکروب‌ها در فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی زیست تخریب‌پذیر، باعث بهبود خواص و حفظ مواد غذایی می‌شود (SánchezGonzález *et al.*, 2011). در میان پوشش‌های مختلف خوراکی، به دلیل ویژگی‌های مطلوب، ایمنی و تنوع ساختار، از پلیمرهای پلی‌ساکاریدی در طیف گسترده‌ای در مواد غذایی استفاده می‌شود.

ازآنجایی‌که اسانس‌های گیاهی مانند اسانس آویشن از رایج‌ترین ترکیبات زیست فعال ضدمیکروبی و ضداکسیدانی طبیعی می‌باشند، استفاده از آن‌ها در ترکیبات مواد غذایی مختلف به‌عنوان نگه‌دارنده به‌شدت موردتوجه واقع‌شده‌اند. اسانس‌های گیاهی اغلب دارای مواد ترپنی اکسیژنه و غیراکسیژنه و نیز ترکیبات آلدئیدی و فنلی فرار و اغلب غیر قطبی بوده و نامحلول در آب می‌باشند (Firoozi *et al.*, 2020). اسانس آویشن (*Thymus vulgaris L.*)، به‌طور عمده از تیمول، کارواکرول، ۱،۸- سینئول، ترپینن-۴- اول و لینالول

تشکیل‌شده است که اغلب آن‌ها اثر ضدباکتریایی و ضداکسیدانی ثابت‌شده دارند. بااین‌حال، ساختار غیر قطبی، نامحلولی در آب، فرار بودن و ناپایداری شیمیایی و بوی تند، استفاده از آن‌ها در فرمولاسیون‌های غذایی را با چالش مواجه کرده است. در این راستا، نانوکپسوله کردن اسانس‌ها در سیستم‌های حامل نانوساختار مختلف می‌تواند چالش‌های مطرح‌شده را برطرف کرده و استفاده از آن‌ها را به‌آسانی با خواص تقویت یافته در سیستم‌های غذایی مختلف مقدور سازد (Almasi and Aziz, 2018; Anarjani *et al.*, 2013).

نانولیپوزوم‌ها سیستم‌های حامل نانوساختار هستند که قادرند با ایجاد لایه محافظتی دولایه، ترکیبات زیست فعال آب‌دوست یا آب‌گریز را در برگرفته و آن‌ها را در اندازه نانومتری درآورند. مولکول‌های آمفی‌فیلیک فسفولیپیدی از عمده مواد تشکیل‌دهنده ساختارهای نانولیپوزومی هستند. در کنار فسفولیپیدها، استرول‌ها مانند کلسترول و پلی‌اول‌هایی مانند گلیسرول نیز ممکن است در فرمولاسیون‌های نانولیپوزوم گنجانده شوند تا خواص لایه‌های محافظتی را اصلاح یا تقویت کنند (Mozafari, 2010). ازآنجایی‌که نانولیپوزوم‌ها، غیر سمی، زیست سازگار، و دارای قابلیت بالای کپسوله کردن و آزادسازی ترکیبات زیست فعال می‌باشند.

هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر پوشش‌های خوراکی بر پایه CMC حاوی اسانس آویشن آزاد و نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن روی ویژگی‌های میکروبی فیله‌های مرغ در طول دوره نگهداری در شرایط یخچالی بود.

مواد و روش‌ها

- تهیه نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن

وزیکول‌های چندلایه با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک - فراصوت تهیه شدند (Jabraeili Pour *et al.*, 2021; Almasi and aziz, 2018). اسانس آویشن (۰/۴ درصد) و لسیتین (طبق جدول ۱) مخلوط شده و سپس به‌طور کامل در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان-متانول (۵۰:۵۰ گرم در ولت) در یک بالون ته گرد حل شدند. سپس کلسترول و گلیسرول (طبق جدول ۱) به سیستم اضافه شدند و پس از انحلال کامل کلیه اجزا، حلال با استفاده از اواپراتور چرخان کم‌فشار (۰/۷ اتمسفر) و حمام آب ۴۵ درجه سلسیوس و سرعت ۷۰ دور در دقیقه به‌طور کامل از سیستم حذف‌شده و لایه فیلم نازک بر دیواره بالون تشکیل گردید. فیلم نازک تشکیل‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به‌طور مغناطیسی هم زده شد تا وزیکول‌های لیپوزوم تشکیل شود.

سپس لیپوزوم‌های تشکیل‌شده دو بار تحت تابش فراصوت با استفاده از یک دستگاه اولتراسوند (Sonics & Materials Vibracell، انگلستان) به مدت ۵ دقیقه (۳ دقیقه زمان استراحت)، در ۲۰ کیلوهرتز و ۱۰۰ وات در یک حمام آب یخ، به‌منظور کاهش اندازه وزیکول‌ها تا محدوده نانومتری و تهیه نانولیپوزوم‌ها قرار گرفتند. نانولیپوزوم‌های به‌دست‌آمده در ۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- تهیه پوشش‌های بر پایه کربوکسی‌متیل‌سلولز (Carboxymethyl cellulose)

جهت تهیه پوشش‌های خوراکی فاقد اسانس آویشن پودر کربوکسی‌متیل‌سلولز ۱ درصد (CMC)، به همراه ۱ درصد پودر گلیسرول در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. در پوشش‌های گیاهی حاوی اسانس ماکروساختار نیز علاوه بر مواد بالا، ۰/۴ درصد اسانس نیز به سیستم اضافه‌شده و کاملاً به مدت نیم ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شد. برای تهیه پوشش‌های خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن، ۱درصد CMC و گلیسرول به ۱۰۰ میلی‌لیتر از نانولیپوزوم‌های کلوئیدی تهیه‌شده در بخش قبل اضافه‌شده و به مدت نیم ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شدند. فرمولاسیون پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده در جدول (۱) نشان داده‌شده است.

جدول (۱)- فرمولاسیون پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده و اعمال‌شده روی فیله مرغ

نام اختصاری	توضیحات	اسانس آویشن درصد (وزنی)	فسفولیپید و پایدارکننده‌ها درصد (وزنی)	CMC درصد (وزنی)	گلیسرول درصد (وزنی)	آب درصد (وزنی)
Water	آب مقطر (شاهد)	۰	۰	۰	۰	۱۰۰
C.M.C	پوشش خوراکی بر پایه CMC	۰	۰	۱	۱	۹۸
E.O	پوشش خوراکی فعال حاوی اسانس ماکروساختار آویشن	۰/۴	۰	۱	۱	۹۷/۶
N.L.E.O	پوشش خوراکی فعال حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن	۰/۴	۳ درصد(کل مواد)	۱	۱	۹۴/۶

- آماده‌سازی فیله‌های مرغ و پوشش‌دهی آن‌ها

نمونه‌های سینه مرغ از بازار خریداری و بعد از پوست‌کنی و جدا کردن چربی‌ها به قطعات ۲۵ گرمی یکسان تقسیم شد. ابتدا به‌وسیله آب لوله‌کشی به‌طور کامل شست‌وشو داده شد تا ضمن گرفتن ضایعات و چربی‌های سطحی بار میکروبی آن کاهش یابد درنهایت هر یک از نمونه‌ها توسط آب مقطر به‌طور کامل آب‌کشی شد. سپس فیله‌های مرغ در پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده به مدت ۱۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس آب اضافی آن‌ها گرفته‌شده و در کیسه‌های پلی‌اتیلنی استریل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. فیله‌های مرغ در ۴ گروه قرار گرفتند. گروه پوشش یافته با CMC حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن (N.L.E.O)، گروه پوشش یافته با CMC حاوی اسانس آویشن ماکروساختار (E.O.)، گروه پوشش یافته با CMC (C.M.C) و گروه پوشش یافته با آب مقطر به عنوان گروه شاهد.

- ارزیابی میکروبی نمونه‌ها

برای این منظور در هرکدام از روزهای ۱، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ دوره نگهداری حداقل ۳ نمونه از هر گروه از فیله‌ها انتخاب و ۱۰ گرم از هر نمونه گوشت با ۹۰ میلی‌لیتر از محلول رینگر با استفاده از استوماکر

همگن‌سازی شده و سریال‌های رقت تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های موردنظر به‌صورت سطحی روی محیط‌های کشت ذی‌ربط کشت و گرمخانه‌گذاری صورت گرفت (Ghollasi-Mood *et al.*, 2016; Smolander *et al.*, 2004).

برای شمارش کلی باکتری‌های زنده (TVC) از پلیت کانت آگار و گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. جهت شمارش لاکتیک اسید باکتری‌ها (LAB) از MRS آگار و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت استفاده گردید. به‌منظور شمارش باکتری‌های سرمادوست نیز از TSA آگار (Tryptic Soy) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت استفاده شد. همچنین شمارش آنتروباکتریاسه‌ها توسط VRBG آگار (Violet Red Bile Dextrose/Glucose) و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت.

تجزیه‌وتحلیل آماری

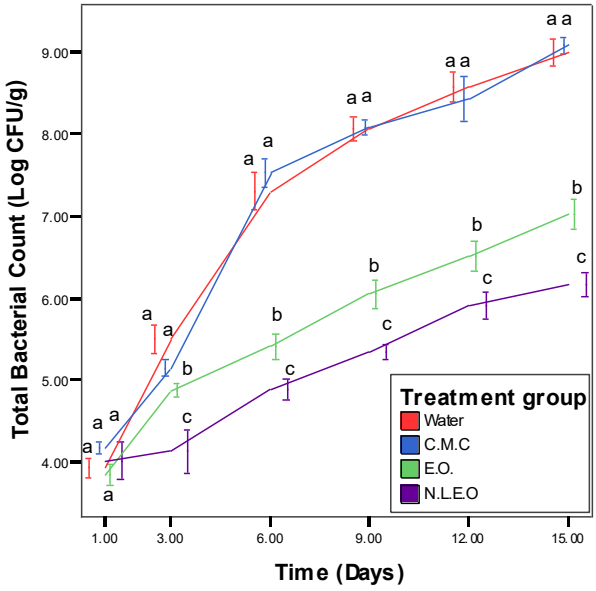
در بررسی اثر پوشش‌های خوراکی تهیه‌شده بر خواص میکروبی فیله‌های مرغ از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) استفاده‌شده و اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد برآورد گردید و داده‌ها در جداول و اشکال به‌صورت میانگین ± انحراف معیار برای سه تکرار ارائه شد. از نرم‌افزار Excel (office 2013) جهت رسم نمودارهای این قسمت استفاده گردید.

یافته‌ها

- شمارش کلی تعداد باکتری‌ها

با توجه به خاصیت ضد باکتریایی نانولیپوزم‌های اسانس آویشن به نظر می‌رسد که استفاده از پوشش‌های خوراکی فعال CMC برای فیله مرغ، جمعیت کلی میکروبی آن را کاهش دهد. نتایج در نمودار (۱) نشان داده‌شده است. چنانچه در این نمودار قابل‌تشخیص است در روز اول در جمعیت میکروبی کلی فیله‌های مرغ پوشش داده‌شده با پوشش‌های خوراکی مختلف تفاوت معناداری وجود نداشته است. با گذشت زمان جمعیت میکروبی کلیه نمونه‌ها افزایش‌یافته است. اما بااین‌حال، در حالیکه جمعیت میکروبی فیله‌های پوشش داده‌شده با CMC مشابه آب (شاهد) بوده است، نرخ رشد جمعیت برای فیله‌های دارای پوشش‌های خوراکی فعال حاوی اسانس‌ها بسیار کمتر است. این تفاوت معنادار در نرخ رشد جمعیت از روز سوم مشاهده‌شده و با گذشت زمان کاهش نرخ رشد باکتری‌ها محسوس‌تر شده است.

با مقایسه جمعیت میکروبی فیله‌های پوشش داده‌شده با پوشش خوراکی حاوی اسانس آویشن نانوساختار و ماکروساختار، می‌توان مشاهده کرد که از روز سوم نگهداری، اثربازدارندگی اسانس نانوساختار به‌صورت معنادار ($p<۰/۰۵$) بیشتر از اسانس ماکروساختار است و نرخ رشد باکتری‌ها کاهش بیشتری یافته است.

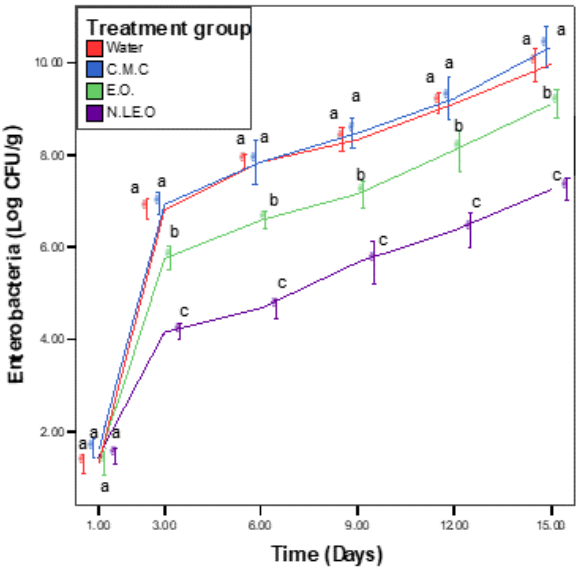


نمودار (۱)- میانگین لگاریتم تعداد کلی باکتری‌های موجود در نمونه‌های تحت تیمار در طول دوره نگهداری

a، b و c در هرکدام از روزهای مورد آزمایش تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار است ($p\leq$۰/۰۵).

- انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*)

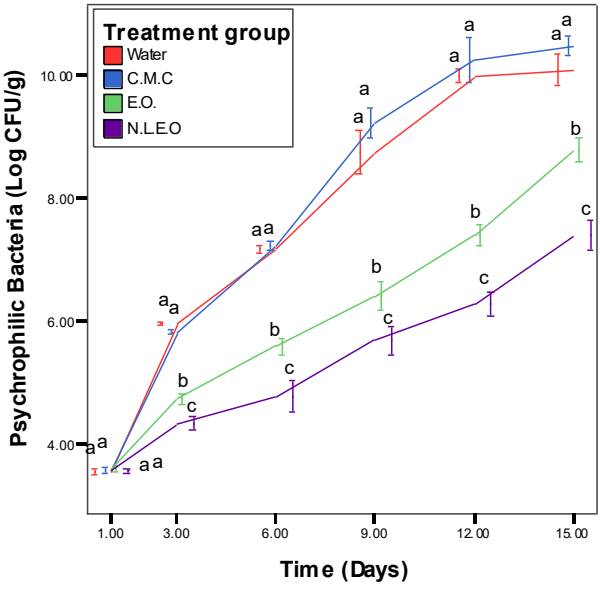
نتایج شمارش باکتری‌های انتروباکتریاسه در تیمارهای مختلف در طی نگهداری در نمودار (۲) مشاهده می‌شود. جمعیت باکتری‌های انتروباکتریاسه کلیه فیله‌ها (پوشش داده‌شده و کنترل) با گذشت زمان افزایش یافت. پوشش‌های خوراکی CMC هیچ اثر بازدارندگی در رشد این دسته از باکتری‌ها نشان ندادند به‌طوری‌که جمعیت میکروبی فیله‌های حاوی آن، با نرخ رشد نمونه‌های کنترل با سرعت افزایش یافت. ولی نمونه‌های حاوی پوشش‌های فعال (اسانس آویشن)، نرخ رشد میکروبی را از روز سوم به‌بعد به‌صورت معنادار کاهش داد ($p<$۰/۰۵). چنانچه انتظار می‌رفت تأثیر بازدارندگی اسانس نانوساختار روی این دسته از باکتری‌ها نیز به‌صورت معنادار ($p<$۰/۰۵) بیشتر از اسانس ماکروساختار بود.



نمودار (۲)- میانگین لگاریتم تعداد انتروباکتریاسه موجود در نمونه‌های تحت تیمار در طول دوره نگهداری
a، b و c در هرکدام از روزهای مورد آزمایش تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

- باکتری‌های سرمادوست

نتایج شمارش باکتری‌های سرمادوست در تیمارهای مختلف در طی نگهداری در نمودار (۳) نشان داده‌شده است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در تمامی تیمارها میزان باکتری‌های سرمادوست، در طی روزهای آزمون افزایش پیدا کرد. تعداد باکتری‌های سرمادوست در روز اول برای همه نمونه‌ها یکسان بوده ولی با افزایش زمان نگهداری نرخ رشد جمعیت آن‌ها تغییر پیداکرده است. نرخ رشد جمعیت میکروبی نمونه‌ها در روز سوم برای نمونه حاوی پوشش CMC تنها مشابه کنترل (آب مقطر) است ولی برای نمونه‌های حاوی اسانس‌های نانوساختار و ماکروساختار کمتر از نمونه حاوی پوشش CMC و گروه کنترل است. از روز سوم به بعد اثر بازدارندگی پوشش‌های حاوی اسانس نانوساختار بسیار بیشتر از اسانس ماکروساختار بوده و این برتریت برای پوشش‌های حاوی اسانس نانوساختار تا روز آخر نگهداری مشاهده گردید.

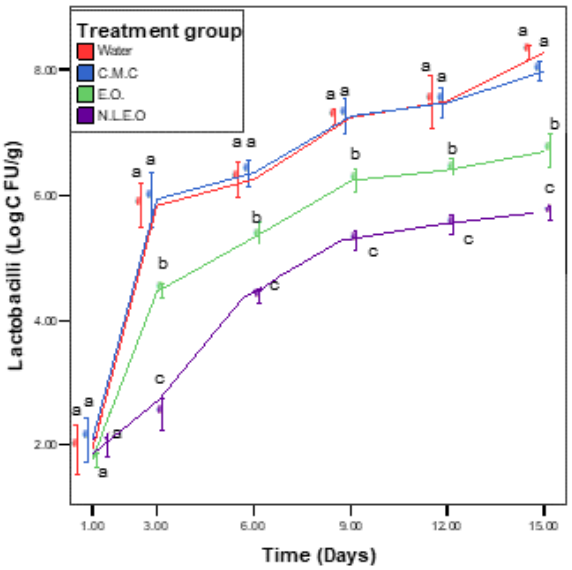


نمودار (۳)- میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌های سرمادوست موجود در نمونه‌های تحت تیمار در طول دوره نگهداری
$^{a, b, c}$ در هرکدام از روزهای مورد آزمایش تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

- شمارش باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک

در نمودار (۴)، تعداد باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در فیله‌های مرغ تحت تیمار طی دوره نگهداری نشان داده‌شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود شمارش باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک در نمونه‌های پوشش داده‌شده با اسانس به‌صورت معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل و پوشش‌های فاقد اسانس پایین‌تر بود ($p<۰/۰۵$).

پوشش‌های حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن از روز نخست نگهداری اثر بازدارندگی به‌مراتب بالاتری نسبت به پوشش‌های حاوی اسانس ماکروساختار داشتند.



نمودار (۴)- میانگین لگاریتم تعداد باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک موجود در نمونه‌های تحت تیمار در طول دوره نگهداری
$^{a, b}$ و ^{c} در هرکدام از روزهای مورد آزمایش تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف متفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که کاهش اندازه اسانس آویشن تا محدوده نانو و کپسوله کردن باعث افزایش عملکرد ضد میکروبی آن‌ها می‌شود. این امر می‌تواند به دلیل افزایش سطح اسانس در واحد حجم و محلول بودن در آب آن‌ها باشد که منجر به تسریع نفوذ و تراوش آن‌ها از دیواره سلولی می‌گردد. به‌علاوه پایداری و پراکندگی اسانس نانوساختار در ماتریکس پوشش‌های خوراکی نیز بهتر از اسانس ماکروساختار بوده و همین همگن بودن، منجر به بهتر شدن عملکردهای ضدمیکروبی آن‌ها می‌گردد. همچنین نانوکپسوله کردن قادر است از تبخیر و تخریب اسانس در طول زمان در سیستم جلوگیری کرده مقدار ماده نفوذکننده به داخل سلول باکتری را افزایش دهد. از طرف دیگر نانوکپسوله کردن باعث رهایش کنترل‌شده و پیوسته اجزای فعال اسانس شده و اثر ضدباکتریایی آن‌ها در طول زمان تداوم می‌یابد. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که اثر ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف به چند دسته عوامل مختلف مانند ویژگی‌های اسانس، ویژگی‌های جمعیت میکروبی و ویژگی‌های محیط بستگی دارد. غلظت اسانس، ترکیبات فعال موجود در آن و اندازه ذرات آن از ویژگی‌های اسانس هستند که روی اثر ضدباکتریایی آن‌ها مؤثرند. از طرفی نوع باکتری، جمعیت اولیه آن‌ها، فاز رشد آن‌ها و نوع محیط کشت مورداستفاده و نیز عوامل محیطی مانند pH، غلظت اسانس، میزان چربی، پروتئین، آنتی‌اکسیدان‌ها، مدت‌زمان و دمای نگهداری، ساختار فیزیکی مواد غذایی از دیگر عوامل تأثیرگذار روی اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها می‌باشند. اگر اسانس‌ها به‌صورت پوشش خوراکی بر مواد غذایی اعمال شوند، فرمولاسیون پوشش خوراکی نیز اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Zang *et al.*, 2020).

همان‌طور که از نتایج تحقیق حاضر برمی‌آید، خاصیت ضدباکتریایی نانولیپوزم‌های اسانس آویش، از روز سوم نگهداری به‌صورت معنی‌دار (p<۰/۰۵) افزایش‌یافته است. محققی در یک مطالعه، امولسیون‌ها و نانوامولسیون‌های اسانس زنیان رومی را تهیه و آن‌ها را در ساختار پوشش‌های خوراکی بر پایه آلژینات وارد کرده و اثر بازدارندگی آن‌ها را روی جمعیت میکروبی فیله‌های مرغ بررسی کرده است. نتایج آن تحقیق نشان داد که نانوامولسیون اسانس زنیان رومی که در اندازه ۱۵۶/۲ نانومتر بودند، در مقایسه با امولسیون‌های معمولی آن‌ها، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) کمتری (۴ برابر کمتر) در برابر رشد باکتری‌ها داشتند. این تحقیق نشان داد که پوشش‌های آلژیناتی حاوی نانوامولسیون‌های اسانس زنیار رومی قادر است ماندگاری فیله‌های مرغ نگهداری شده در یخچال را به مقدار قابل‌توجهی افزایش دهد (Kazemeini *et al.*, 2021). در تحقیق دیگری نیز اثر اسانس ترخون ماکروساختار و نانوساختار در پوشش‌های برپایه کیتوزان-ژلاتین روی ورق‌های گوشت خوک مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج این تحقیق پوشش‌های حاوی اسانس نانوساختار با سرعت بالاتری رشد باکتری‌ها را در طول نگهداری کاهش می‌داد (Zang *et al.*, 2020).

چنانچه در تحقیق حاضر مشاهده گردید تأثیر بازدارندگی اسانس نانوساختار روی باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه نیز به‌صورت معنی‌دار بیشتر از اسانس ماکروساختار بود (p<۰/۰۵). در یک مطالعه نیز، اثر اسانس نانوساختار و ماکروساختار کاکوتی به همراه نایسین روی ماندگاری گوشت نگهداری شده در یخچال بررسی شد و در آن تحقیق مشاهده گردید که اسانس نانوساختار کاکوتی قادر است رشد باکتری‌های گروه انتروباکتریاسه را به‌طور معنی‌دار کاهش دهد (Shahbazi *et al.*, 2016).

در تحقیق حاضر، اثر بازدارندگی پوشش‌های حاوی اسانس نانوساختار بر روی باکتری‌های سرمادوست معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). در پژوهشی محققان اثر پوشش‌های کربوکسی‌متیل‌کیتوزان حاوی اسانس پونه کوهی را روی خواص میکروبی فیله مرغ بررسی کردند. نمونه‌ها در شرایط هوازی، در دمای ۴ درجه سلسیوس تا ۱۴ روز نگهداری شدند. تعداد کل باکتری‌ها در نمونه‌های شاهد از روز ۶ و نمونه‌های تیمارشده با اسانس پونه کوهی از روز ۱۰ به بعد به‌بیش از ۷ log CFU/g رسید. نکته جالب‌توجه نتایج آن‌ها این بود که *لیستریا مونوسایتوژنز* با دوز تلقیح اولیه 10^5 cfu/g بعد از روز ۴ دیگر جداسازی نشد (Khanjari *et al.*, 2013).

همان‌طور که نتایج حاصله از تحقیق حاضر نشان داد، اثر بازدارندگی پوشش‌های حاوی اسانس نانوساختار روی باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). در همین راستا، گروهی از محققان نیز نشان دادند که اسانس گیاه کاکوتی، اثر ضد باکتریایی در رشد باکتری‌های آغازگر ماست داشته و نرخ رشد آن‌ها را کاهش داده‌اند. نتایج این پژوهش نشان داد که تعداد باکتری‌های آغازگر در همه نمونه‌های ماست در طول نگهداری کاهش معنی‌داری داشت (Mehraban *et al.*, 2007).

در مطالعه‌ی دیگر اثر نانوامولسیون اسانس آویشن روی باکتری‌های عامل فساد گوشت ماهی بررسی شده

است. طبق گزارش این مطالعه، تبدیل اسانس به نانومولسیون با اندازه ذرات ۴۴۷/۶ نانومتر منجر به افزایش چشمگیر اثر ضدباکتریایی آن‌ها در مقابل باکتری‌های انتخاب‌شده می‌گردد. مطابق نتایج این تحقیق دیواره سلولی باکتری‌های مجاورت یافته با نانومولسیون‌های اسانس آویشن شکسته می‌شوند. مطابق نظر این محققان اجزای فنلی اسانس آویشن باعث بر هم خوردن تعادل لیپیدی در دیواره سلولی باکتری‌ها شده و به داخل سلول نفوذ کرده و با اجزای داخل سلول واکنش داده و موجب مرگ آن سلول‌ها می‌شود (Ozogul *et al*., 2020). به نظر می‌رسد اصلی‌ترین مکانیسم اثر اسانس آویشن صدمه به غشاء سیتوپلاسمی آن‌ها و افزایش نفوذپذیری آن‌ها و پدیده ایجاد دپلاریزاسیون (depolarization) است (Xu *et al*., 2008).

در تحقیقات انجام‌شده در سال‌های اخیر اسانس‌های گیاهی به‌صورت نانوساختار درآمده و در فرمولاسیون پوشش‌های خوراکی مختلف واردشده‌اند و اثر آن‌ها روی ماندگاری برخی مواد غذایی بررسی‌شده است. با این وجود تحقیقاتی که درزمینهٔ تولید نانولیپوزوم‌های اسانس‌های گیاهی و واردکردن آن‌ها در سیستم‌های پوشش خوراکی بسیار محدود است. در این راستا در تحقیقی، نانولیپوزم‌های اسانس سیر را وارد پوشش خوراکی بر پایه کیتوزان کرده و اثر آن‌ها بر فیله‌های سینه مرغ بررسی شد. نانولیپوزم‌های تهیه‌شده در این تحقیق در اندازه ۱۵۲/۵ نانومتر و پتانسیل زتای برابر با ۴۹/۸ – میلی‌ولت بوده و منجر به کاهش معنادار ($p<۰/۰۵$) تعداد باکتری‌های سرمادوست و تعداد کل باکتری‌ها در طول زمان نگهداری در فیله‌ها گشت. طبق نتایج آن‌ها پوشش‌های حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس سیر دارای اثر بازدارندگی بسیار بیشتر در مقابل رشد باکتری‌های موردمطالعه در مقایسه با پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس ماکروساختار بود که این گزارش منطبق بر نتایج مشاهده‌شده در تحقیق حاضر نیز است (Kamkar *et al*., 2021).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پوشش‌های خوراکی ضد باکتری تهیه‌شده با استفاده از CMC به‌عنوان ماده اصلی تشکیل‌دهنده فیلم و افزودن نانولیپوزوم آویشن یا آویشن ماکروساختار قادر است یک محافظ ایمن و زیست‌تخریب‌پذیر برای گوشت فیله مرغ فراهم کند که با رهایش آرام و کنترل‌شده مواد فعال ضد باکتریایی موجود در اسانس آویشن، اثر ضد باکتریایی در طول زمان از خود نشان داده و نرخ رشد باکتری‌های مولد فساد یا مسمومیت‌زای گوشت را کاهش دهد. همچنین مشاهده گردید که اثر ضدباکتریایی پوشش‌های خوراکی حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن بیشتر از پوشش‌های خوراکی حاوی اسانس آویشن ماکروساختار می‌باشد. بنابراین در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که پوشش‌های خوراکی فعال برپایه CMC حاوی نانولیپوزوم‌های اسانس آویشن یک راهکار بسیار کارآمد و ایمن جهت افزایش ماندگاری گوشت فیله مرغ خام در شرایط نگهداری در یخچال و قبل از پخت است.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Anarjan N, Nehdi IA and Tan CP. (2013) Influence of astaxanthin, emulsifier and organic phase concentration on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. Chemistry Central Journal 7(1): 1-14.
- Anarjan N, Tan CP, and Nehdi IA, *et al*. (2012) Colloidal astaxanthin: Preparation, characterisation and bioavailability evaluation. Food Chemistry 135(3): 1303-1309.
- Aziz SG-G and Almasi H. (2018) Physical Characteristics, Release Properties, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Thyme (Thymus vulgaris L.) Extract-Loaded Nanoliposomes. Food and Bioprocess Technology 11(8): 1552-1565.
- Dave, D., and Ghaly, A.E., (2011). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review.American Journal of Agricultural and Biological Sciences 6 (4): 486-510.
- Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R.D., and Johnson, S.K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. Trends in Food Science and Technology 61: 60-71.
- Jabraeili Pour, S., Mirzaei, H., Anarjan, N., Javadi, A. and Behnajady, M.A. (2021) Nanoliposomal thyme (Thymus vulgaris) essential oil: Effects of formulation parameters. Food Science and Technology International, 28(3): 257-272.
- Kamkar, A., Molaee-aghaee, E., Khanjari, A., Akhondzadeh-basti, A., Noudoost, B., Shariatifar, N.,and Soleimani, M. (2021). Nanocomposite active packaging based on chitosan biopolymer loaded with nano-liposomal essential oil: Its characterizations and effects on microbial and chemical properties of refrigerated chicken breast fillet. International Journal of Food Microbiology 342: 109071-79.
- Kazemeini, H., Azizian, A., and Adib, H. (2021). Inhibition of Listeria monocytogenes growth in turkey fillets by alginate edible coating with Trachyspermum ammi essential oil nano-emulsion. International Journal of Food Microbiology 344, 109104-111
- Khanjari, A., Karabagias, I.K., and Kontominas, M. G. (2013). Combined effect of N, O-carboxymethyl chitosanand oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. LWT-Food Science and Technology 53(1), 94-99.
- Li, T., Li, J., Hu, W., Zhang, X., Li, X., and Zhao, J. (2012). Shelf-life extension of crucian carp (Carassius auratus) using natural preservatives during chilled storage. Food Chemistry 135(1), 140-145.
- Mehraban, S.M., Karazhyan, R., Hadad, K.M., Habibi, N.M., and Beiraghi, T.S. (2007). Effect of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* on yoghurt starter culture activity. Iranian Journal of Food Science and Technology 3(4), 47-55
- Mozafari, M. (2010). Nanoliposomes: Preparation and Analysis. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 605, 29-50.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S., Vongkamjan, K., and Amnuaikit, T. (2020). Influence of stabilising agents on the properties of liposomal encapsulated ethanolic coconut husk extract. International Journal of Food Science & Technology 55(2), 702-711.
- Ozogul, Y., Kuley Boğa, E., Akyol, I., Durmus, M., Ucar, Y., Regenstein, J. M., *et al*. (2020). Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. Food Bioscience 36, 100635-41.
- Sánchez-González L, Pastor C, Vargas M, Chiralt A, González-Martínez C, and Cháfer M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. Postharvest Biology and Technology 60(1), 57-66
- Shahbazi, Y., Shavisi, N., and Mohebi, E. (2016). Effects of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin, both separately and in combination, to extend shelf life and control *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus* in raw beef patty during refrigerated storage. Journal of Food Safety 36(2), 227-236.
- Xu, J., Zhou, F.Ji, B.P., Pei, R.S., and Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli, Letters in Applied Microbiology 47 (3), 174-179.