مطالعهٔ اثر ضدقارچی نانوامولسیون و اسانس گیاه زنیان (Trachyspermum ammi) بر روی قارچ آسپرژیلوس نایجر (Aspergillus niger) و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در ماندگاری همبرگر

پریسا نعیم[۱]، حامد اهری*[۲]، مریم عطایی[۳]

چکیده

همبرگر، به عنوان یک فراورده ی گوشتی، یکی از حساس‌ترین مواد غذایی پروتئینی است که می‌تواند محیط مناسبی برای رشد باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها باشد. از این رو خطر احتمالی مسمومیت غذایی و امکان آلودگی این محصول، بالاست. در تحقیق حاضر اثرات ضد قارچی اسانس و نانوامولسیون اسانس زنیان بر روی همبرگر آلوده به قارچ آسپرژیلوس نایجر با تعیین MIC (Minimum Inhibitation concentration) و MFC (Minimum fungicidal concentration) با روش رقیق سازی بر روی محیط مایع ((Microdilution)) انجام شد. به منظور ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس زنیان بر همبرگر از روش کمی اندازه‌گیری تعیین تیوباربیتوریک اسید استفاده شده است. براساس نتایج آزمون‌ها، MIC و MFC برابر ۱۸۷/۵ و۳۷۵ میلی‌لیتر برای اسانس و ۱۱/۷۱ و۲۳/۴۳ میلی‌لیتر برای نانواسانس به دست آمد و اسانس و نانوامولسیون اسانس زنیان اثر مهاری بر روی رشد گونه‌ی قارچی مورد آزمایش بر روی همبرگر در تمامی روزهای آزمون داشتند و نانوامولسیون اسانس به طور معنی‌داری حاوی اثرضدقارچی بالاتری نسبت به خود اسانس بود ($p<۰/۰۵$) و در آزمون TBARS نشان داده شد که اسانس زنیان و نانواسانس باعث کاهش شاخص TBA در این آزمون شده که نشان‌دهنده‌ی اثر آنتی‌اکسیدانی در همبرگر می‌باشد. در این آزمون اختلاف معنی‌داری بین اسانس و نانو اسانس زنیان مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: *قارچ آسپرژیلوس نایجر، زنیان، نانوامولسیون اسانس، همبرگر، آنتی‌اکسیدان*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۸

مقدمه

در سال‌های اخیرتا حد زیادی افراد به مصرف غذاهایی که فاقد نگهدارنده هستند به ویژه مواردی که درترکیب آنها از گوشت استفاده شده و از جمله آنها می‌توان به فرآورده‌های گوشتی منجمد نظیر همبرگر اشاره نمود، تمایل پیدا کرده‌اند. با این همه، گزارش‌های روزافزون بیماری‌های منتقله از غذا و بویژه آلودگی ثانویه محصولات غذایی در خلال مراحل بعد از فرآوری، مسئله سلامت مواد غذایی را مطرح می کنند. گوشت به عنوان بیشترین ماده‌ی تشکیل دهنده‌ی همبرگر، یکی از حساس‌ترین مواد غذایی پروتئینی است که تحت تأثیر میکروب‌ها واقع می‌شود. شمارش کلی میکروبی یکی از مبانی قضاوت کیفیت بهداشتی یک ماده‌ی غذایی در نظر گرفته می‌شود. که این روش در تعیین شرایط بهداشتی و کنترل دما حین تولید و نگهداری محصول، تعیین میزان فساد ماده اولیه، قابلیت نگهداری، بالا رفتن درجه حرارت یخچالی که مواد غذایی فسادپذیر در آن نگهداری می‌گردند، مورد استفاده است. از جمله آزمایش‌های میکروبی در صنعت همبرگر می‌توان از شمارش کلی میکروبی، شمارش کلی فرم‌ها، جست و جو و شمارش استافیلوکوکوس اورئوس، جست و جوی سالمونلا و شمارش کپک و مخمر نام برد.(۳)

Aspergillus niger یک قارچ و یکی از شایع‌ترین گونه‌های جنس Aspergillus است که سبب ایجاد یک عارضه به نام کپک سیاه می‌شود و یک عنصر معمول مواد غذایی است. شواهد اخیر نشان می‌دهد برخی از زنجیره‌های A.niger تولید A. ochratoxin همچنین تولید ایزوفلاون orobol می‌کنند(۷).

با توجه به نگرانی‌های عمومی در خصوص عوارض نگهدارنده‌های شیمیایی توجه تولید کنندگان و مصرف‌کنندگان

۱- دانشجوی مقطع کارشناسی‌ارشد، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- دانشیار، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

dr.h.ahari@gmail.com

۳- استادیار، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مثل اسانس‌های گیاهی معطوف شده است تا به عنوان جانشین مناسب آنتی میکروب‌ها و آنتی‌اکسیدان های سنتتیک معرفی گردد که به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلیک سلامت مصرف کنندگان را بهبود می‌بخشد. استفاده از آنها به عنوان ترکیبات جدید بدست آمده از گیاهان به دلیل خواص ضد میکروبی آن علیه طیف وسیعی از باکتری ها، مخمرها و قارچ‌ها،روند رو به توسعه دارد. به همین دلیل تحقیقات جامع‌تر در حیطه‌ی این گیاهان و شناسایی اثرات ضد قارچی اسانس آنها در غلظت‌های مناسب به عنوان آنتی اکسیدان و ضد میکروب مناسب علیه پاتوژن‌ها و قارچ‌ها در فرآورده‌های گوشتی، ضرورت دارد(۱).

زنیان از قدیم به عنوان ادویه و نگهدارنده‌ی مواد غذایی مورد استفاده بوده است. اسانس این گیاه حاوی ترکیب شیمیایی تیمول است که ۴۰ تا ۵۰٪ اسانس این گیاه را تشکیل می‌دهد. به همین دلیل در رقت‌های بالا اثرات ضد قارچی،آنتی اکسیدانی،ضد میکروبی قوی از خود نشان داده است. دانه ی زنیان می‌تواند علیه بعضی میکروب‌ها اثر کند. به همین دلیل از اسانس آن به عنوان یک ضد میکروب قوی (مشابه تیمول) استفاده می‌شود و در صنعت غذا به عنوان یک نگهدارنده‌ی طبیعی در ماندگاری مواد غذایی مورد بحث قرار گرفته است(۲).

مصرف اسانس‌ها عموماً به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری هایی در کاربرد همراه است علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می کنند که این امر خوشایند مصرف کنندگان نیست؛بنابراین، امروزه تلاش می‌شود تا تأثیرات نامطلوب اسانس‌ها کاسته شود. یکی از روش‌های به حداقل رساندن این تأثیرات نامطلوب، استفاده از نانوامولسیون آنهاست که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار، محافظت آنها در برابر تأثیرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود. به رغم مزایا و خواص منحصر به فرد نانو امولسیون‌ها هنوز با چالش‌هایی از جمله پذیرش و سلامت سامانه‌های غذایی روبرو است. از این رو انجام تحقیقات در زمینه‌ی امکان کاربرد سامانه‌های نانوامولسیونی در صنایع غذایی یک نیاز ضروری تلقی می گردد.(۸)

Eleiwa و همکاران در سال ۲۰۱۳ با تحقیقی که بر روی اثر مهارکنندگی اسانس شوید بر روی رشد مخمر در گوشت چرخ شده تیمار شده با غلظت‌های ۲٪ و ۰/۵٪ از اسانس شوید در طی ۸ روز نگهداری در دمای 4^{0C} به این نتیجه رسیدند رشد مخمر در نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۲٪ از اسانس شوید در طی ۸ روز از ۴/۰۱ به ۴/۹۳ log cfu /g رسید و در نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۰/۵٪ از ۵/۹۵ به ۸/۸۱ log cfu /g رسید که نشان می‌دهد غلظت ۲٪ از اسانس شوید دارای اثرگذاری بالاتری در مهارکنندگی کپک و مخمر دارد(۵).

سنگ آتش و همکاران در سال ۱۳۹۰ با بررسی اثر اسانس آویشن و زنیان بر جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس پارازتیکوس در پسته با تلقیح سوش خالص آسپرژیلوس پارازتیکوس، دریافتند که به دلیل وجود ترکیب ضد میکروبی تیمول در عصاره زنیان، این عصاره با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر و آویشن با تیمول کمتر و با غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر لیتر توانستند نسبت به کنترل رشد قارچ عمل نمایند و اختلاف کاملا معنی‌دار آماری در سطح $p<0/01$ نشان داد. بنابرین به این نتیجه رسیدند که رفع مشکل آلودگی پسته به آفلاتوکسین از طریق جلوگیری از رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس به کمک اسانس‌های آویشن و زنیان امکان‌پذیر است(۲).

Murthy و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت ضد قارچی عصاره زنیان را بر روی قارچ آسپرژیلوس اوکراسئوس بررسی کرد و تاثیرات آن را بر رشد میسیلیوم قارچ‌ها و ژرمیناسیون اسپورهای این قارچ به اثبات رساند که در ppm ۲۵۰ زنیان ژرمیناسیون اسپورها را مهار کرد(۹).

Bairwa و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد قارچی اسانس زنیان بر علیه اپیدرموفایتون فلوکوزوم، میکروسپوروم کنیس و ترایکوفایتون متاگروفایتیس در غلظت ۹۰۰ppm شناسایی شده است و تیمول به عنوان یک ترکیب ضد سم قارچی در اسانس زنیان شناسایی شد(٤).

در زمینه فعالیت ضد قارچی اسانس گیاه زنیان و به کار بردن آن جهت حذف یا متوقف کردن رشد قارچ‌ها و یا افزایش زمان ماندگاری همبرگر تا کنون مطالعه جامعی انجام نشده است. در بیشترمطالعات انجام شده، ارزیابی اثر ضد میکروبی به روش انتشار دیسک صورت گرفته، در حالی که روش انتشار دیسک یک روش غربالگری برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم ها نسبت به مواد بازدارنده می‌باشد و این روش تحت تأثیر میزان و سرعت انتشار مواد بازدارنده در محیط کشت قرار دارد از طرفی روش‌های ارزیابی مختلف، می‌تواند سبب به دست آمدن نتایج متفاوت در اندازه گیری میزان اثر ضد میکروبی محاسبه شده در تحقیقات مختلف شود. با این تفاصیل هدف از این پژوهش مطالعهٔ تلقیحی اثر ضد قارچی اسانس *Trachyspermum ammi* با نانوامولسیون اسانس آن بر روی قارچ *Aspergillus niger* و بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی آن در همبرگر، متأثر از زمان نگهداری می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه مذکور از نوع مقطعی بوده وشامل ٤٠ نمونه و ٢٠ تیمار برای آزمون میکروبی و ٢٠ تیمار برای آزمون شیمیایی بوده است. آزمایشات با دو تکرار صورت گرفت.

تهیه اسانس مورد مطالعه

اسانس زنیان از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه و به دنبال شناسایی ترکیبات اسانس، ١٦ ترکیب مختلف ارگانیک در آن شناسایی شد که ٩٨/٥١٪ آن را شامل می شدند. تولید اسانس به روش اولترا سونیک بوده و مقدار مورد نیاز از اسانس به روش کم هزینه در هربار به صورت جداگانه تامین گردید .برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس زنیان به میکروارگانیزم‌های قارچی و باکتریایی، از این اسانس بر روی محیط کشت برده و هیچ گونه آلودگی مشاهده نگردید.

تهیه نانوامولسیون

ابتدا در دمای ۷۰ درجه سلسیوس، ۸۰ گرم از سورفکتانت توئین ۸۰ را در ۵ گرم آب دیونیزه حل کرده و ۵ گرم اسانس به آن افزوده شد. پس از انحلال کامل، ترکیب فوق را تا دمای اتاق سرد کرده و تحت همزدن با سرعت ۱۲۰۰ دور بر دقیقه، ۸۵ گرم روغن کانولا به صورت قطره قطره به آن افزوده شد جهت تشکیل نانوامولسیون نهایی، این ترکیب به مدت ۱۲ ساعت در این شرایط هم زده شد. تاریخ استفاده از ماده ی نانوامولسیون ٤٥ روز است که بعد از آن جهت القا خاصیت آنتی میکروبی مجدد شارژ شد. اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون، با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور DLS تعیین گردید.

تعیین اندازه ذره‌های نانوامولسیون‌ها

از دستگاه DLS جهت تعیین میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون ساخته شده بر حسب چگالی و حجم و تعداد ذرات استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون قارچی استاندارد

پس از کشت تازه از قارچ آسپرژیلوس نایجر، سوسپانسیون قارچی از طریق برداشت قطری حدود ١ میلی‌متر از کشت تازه در داخل سرم فیزیولوژی آماده گردید. در نهایت اندازه گیری و تنظیم شفافیت سوسپانسیون با شفافیت ثابت و مشخص شده سوسپانسیونی معادل ٠/٥ مک فارلند انجام شد و غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ٥٣٠ نانومتر قرائت، و میزان OD قارچ آسپرزیلوس نایجر را معادل باOD لوله ٠/٥ مک فارلند که بیانگروجود $1/5\times10^{8}$cfu/ml است، مطابقت گردید. همزمان با این کار از لام نئوبار نیز برای

شمارش سلول‌ها و یا اسپورهای قارچی و تعیین میزان اسپور برابر با استاندارد استفاده گردید(۱).

تعیین کمترین غلظت ممانعت از رشد (MIC)

در این پژوهش برای سنجشMIC از روش میکرو دایلوشن براث استفاده گردید. برای تعیین MIC ابتدا به هر خانه‌ی میکروپلیت به مقدار ۱۰۰میکرولیتر محیط کشت RPMI اضافه کرده و سپس۱۰۰ میکرولیتراسانس زنیان به اولین خانه از سمت چپ اضافه کرده و با سمپلر مخلوط کردیم. برای تهیه سریال رقت‌ها، از خانه‌ی اول ۱۰۰ میکرولیتربرداشته و به گوده‌ی دوم اضافه کرد و مخلوط کردیم و به همین ترتیب رقت ۱/۲ از اسانس در هر گوده رقیق تر شده و در نهایت از لوله شماره ۱۰، ۱۰۰ میکرولیتر اسانس خارج کرده و دور ریختیم. سپس به هریک از گوده‌ها به میزان ثابت ۱۰۰ میکرولیتراز سوسپانسیون قارچی استاندارد با رقت ۱ به ۱۰(۱/۵ ×10^{7}cfu/ml) اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت‌های متفاوت اسانس گردد. لوله شماره ۱۱ محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰میکرولیتر سوسپانسیون قارچی به عنوان کنترل مثبت یا GC و لوله شماره ۱۲ که فقط حاوی محیط کشت است به عنوان کنترل منفی یا SC در نظر گرفته شد که هیچ گونه آلودگی نداشت. در نهایت داخل انکوباتور گذاشته و بعد از ٤٨ ساعت نتیجه را مطابق با یک قاعده‌ی کلی برای نشان دادن میزان رشد یا کدورت در مقایسه با حفره کنترل که رشد ۱۰۰٪ دارد، استفاده شد. در این آزمون گوده‌ای که در کمترین غلظت مانع از رشد گردیده به عنوان MIC در نظر گرفته شد. این مرحله برای اسانس و نانو اسانس به طور هم زمان و جداگانه انجام شد.(۸)

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی یا MFC

جهت تعیین MFC، با استفاده از سمپلر، از لوله MIC و دو لوله قبل از آن، به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و به روی محیط PDA برده و بعد از کشت به مدت یک هفته انکوبه کردیم، بعد از این زمان رقتی در هر پلیت که مانع رشد کامل قارچ شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی (تقریباً معادل ۹۹/۵-۹۹٪ فعالیت کشندگی) وجود داشت به عنوان MFC در نظر گرفته شد(۸).

آماده‌سازی همبرگر

ابتدا گوشت همبرگرممتاز بسته بندی شده از فروشگاه عرضه کننده‌ی محصولات گوشتی تهیه شده و تحت شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید و به مقدار مورد نیاز وزن شد(٦). گرم برای هریک از گروه‌های مورد مطالعه). سپس غلظت مشخص از اسانس و نانواملسیون اسانس به آن افزوده شد.(جدول۲). و برای رسیدن به رقت ۱/۱۰ به ازای هر ۹ گرم همبرگر ۱ سی‌سی سوسپانسیون قارچی 10^{7} اضافه گردید و نمونه‌ها در دمای ٤ درجه در داخل یخچال نگهداری شدند.

ارزیابی اثر ضدقارچی اسانس و نانو اسانس زنیان بر روی همبرگر

ارزیابی در روزهای اول و سوم و ششم و نهم برای همبرگرهای آلوده به قارچ در ۳ گروه حاوی اسانس زنیان و سوسپانسیون قارچی، گروه شاهد حاوی سوسپانسیون قارچی وگروه حاوی نانواسانس زنیان و سوسپانسیون قارچی به روش رقت سازی و در نهایت کشت رقت‌های ایجاد شده در محیط کشت سابورودکستروز آگار به این ترتیب انجام گرفت.ابتدا در ٦ عدد لوله ۹ سی سی سرم فیزیولوژی اضافه گردید.۱/۵گرم همبرگر را وزن کرده، به داخل لوله ی اول ریخته با سواپ استریل خوب مخلوط کرده و ورتکس انجام داده شد،۱۰ تا ۱۵ دقیقه ماند،سپس با سمپلر یک سی سی از مایع را داخل لوله ی دوم ریخته و به همین ترتیب رقت سازی تا لوله‌ی ٦ ادامه داده شد و در نهایت ۱ سی‌سی از لوله ٦ خارج کرده و دور ریخته شد. همین کار را با غلظت MFC اسانس انجام داده.از هر لوله ۱۰۰ میکرولیترداخل پلیت های جداگانه حاوی محیط کشت ریخته و به مدت ٤٨ ساعت داخل انکوباتر قرار داده شد و

سپس شمارش قارچ آسپرزلوس نایجر از پلیت های هر گروه انجام شد.

اندازه‌گیری تیوباربیوتیک اسید در همبرگر

۲ گرم از نمونه همبرگر را با ۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید به مدت ۲ دقیقه در مخلوط‌کن مخلوط نموده، سپس ظرف مخلوط‌کن با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد و به مخلوط قبلی اضافه گردید. در پایان کل مخلوط با یک فیلتر کاغذی صاف گردید. ۵ میلی‌لیتر از عصاره تری‌کلرواستیک اسید گوشت را با ۵ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیوتیک اسید ۰/۰۱ مولار، در یک لوله آزمایش مخلوط کرده و به مدت ۱ ساعت در حمام ۱۰۰ درجه سلسیوس گذاشته شد تا رنگ ایجاد گردد. نتایج حاصل در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد(۳).

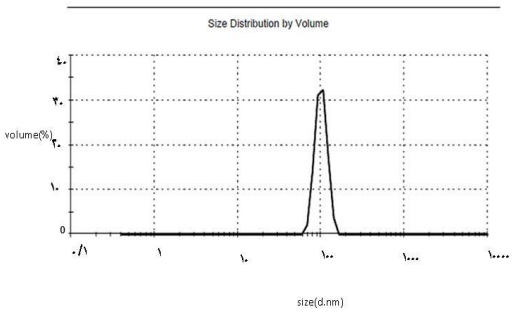
تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام گردید و تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام پذیرفت و تفاوت میان تیمارها با یکدیگر و با گروه کنترل، توسط آزمون آماری دانکن در سطح ۰/۰۵، آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) ارزیابی شد.

نتایج

۱- بررسی اندازه ذرات نانو امولسیون اسانس

نتایج این اندازه‌گیری که به روش DLS انجام شد به شرح زیر می‌باشد.



نمودار ۱ـ پراکندگی ذرات نانو امولسیون اسانس بر حسب حجم

بر اساس نمودار میانگین اندازه‌ی ذرات محلول نانوامولسیون اسانس گیاه زنیان ۱٤٦ نانومتر گزارش گردید.

۱-۲ نتایج آزمون تعیین غلظت MIC و MFC اسانس و نانوامولسیون اسانس زنیان

نتایج آزمایشات MIC نشان داد که اسانس زنیان و نانو اسانس زنیان هر دو دارای تأثیر بالا و موثر بر روی آسپرژیلوس نایجر می‌باشند.همچنین در این مطالعه نتایج آزمون تعیین MIC وMFC به روش ماکرودایلوشن انجام شد و نتایج در جدول ۱ ارائه شد.

جهت تعیین MFC این جدایه‌ها، بعد از تعیین MIC و مشخص شدن گوده‌ها، رقت‌های قبل از آن به روی محیط‌های آگار PDA منتقل و کشت داده که بعد از زمان انکوباسیون، رقت‌هایی که در پلیت آگار رشدی نداشتند، به عنوان MFC گزارش شدند.

جدول ۱- غلظت اسانس/نانوامولسیون مورد نیاز جهت اضافه کردن به نمونه همبرگر

	غلظت مورد نیاز برای ٦ گرم همبرگربر حسب میلی‌لیتر	
	MIC	MFC
اسانس	۱۸۷/۵ml	۳۷۵ ml
نانواسانس	۱۱/۷۱ml	۲۳/٤۳ ml

۲-۲- نتایج شمارش قارچ آسپرژیلوس نایجر در نمونه همبرگر

نتایج شمارش قارچ در همبرگر حاوی اسانس ونانواسانس زنیان در طی نگهداری در دمای یخچالی در طی ۹ روز در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

جدول۲- شمارش قارچ آسپرژیلوس نایجر در همبرگرآلوده همراه با اسانس و نانواسانس زنیان و بدون آن در دمای یخچالی در طی ۹ روز نگهداری بر حسب (Log cfu/g) (میانگین±انحراف معیار)

گروه	تیمار	روز ۱	روز ۳	روز٦	روز۹
۱	شاهد	۳/۳۸± ۰/۰۹[a]	٤/۸۷ ± ۰/۱ [a]	۵/۱۳ ± ۰/۱[a]	۵/۷۲ ± ۰/۰٦ [a]
۲	MFC اسانس	۳/۰٦ ± ۰/۱۵[b]	۳/۸٦ ± ۰/۰۵ [c]	٤/٤۸ ± ۰/۱۱[c]	۵/۲۱ ± ۰/۲۳ [c]
۳	MFC نانواسانس	۲/۸۲±۰/۰۷ [c]	۳/۱۱ ± ۰/۱۲ [d]	۳/٤۵ ± ۰/۱[e]	٤/۰٤ ± ۰/۱[e]

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان‌دهنده‌ی تفوت معنی‌دار در جدول است($p<۰/۰۵$).

۳-۲- ارزیابی نتایج اثرگذاری اسانس و نانواسانس زنیان در نمونه همبرگر آلوده به قارچ همراه با اسانس و نانواسانس زنیان و بدون آن در دمای یخچالی در طی ۹ روز نگهداری

شمارش قارچ برای نمونه‌ی شاهد از۳/۳۸ Log cfu/g در روز اول و به۵/۷۲ Log cfu/g در روز نهم رسید. و بر اساس نتایج بدست آمده در تمامی تیمارها روند افزایشی شمارش قارچ در روز اول تا نهم با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت($p<۰/۰۵$).

شمارش قارچ درتیمار حاوی غلظت MIC اسانس Log cfu/g ۳/۱۱ در روز اول و به ترتیب در روز سوم و ششم و نهم به ٤ و ٤/٦۵ و۵/٤۳ Log cfu/g رسید. و شمارش قارچ در تیمار حاوی غلظت MIC نانواسانس ۲/۹٤در روز اول و به ترتیب در روز سوم و ششم و نهم به ۳/۲۸و۳/۷٦ و ٤/۲۵ Log cfu/g رسید. براساس نتایج بدست آمده کاهش رشد قارچ درتیمارهای حاوی غلظت MIC نانواسانس اختلاف معنی‌داری باتیمار حاوی غلظت MIC اسانس دارد ($p<۰/۰۵$).

بر اساس نتایج آماری در جدول (۲)، شمارش قارچ در تیمارهای حاوی غلظت MFC نانواسانس۲/۸۲ Log cfu/g در روز اول و تا روز نهم نهم به٤/۰٤ Log cfu/g رسید وشمارش قارچ درتیمار حاوی غلظت MFC اسانس Log ۳/۰٦ cfu/g در روز اول و روز نهم به۵/۲۱ Log cfu/g رسید. کاهش رشد قارچ در درتیمارهای حاوی غلظت MFC نانواسانس اختلاف معنی‌داری باتیمارهای حاوی غلظت MFC اسانس دارد. ($p<۰/۰۵$).

همانطور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود تیمارهای حاوی غلظت نانو اسانس منجر به کاهش روند افزایشی شمارش کلی قارچ شده به نحوی که در تمامی روزها شمارش قارچ در همبرگر حاوی غلظت MIC و MFC نانو اسانس نسبت به سایر تیمارها به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است($p<۰/۰۵$).

در طی ۹ روز نگهداری رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر در تیمارها کاهش قابل‌توجهی داشت و در مقایسه، در غلظت‌های MIC اسانس و MFC اسانس و MIC نانو اسانس و MFC نانواسانس به ترتیب اثر مهارکنندگی فارچ افزایش می یابد که در نهایت بیشترین اثر مهارکنندگی در غلظت MFC نانواسانس اتفاق افتاده است.

۳- نتایج سنجش شاخص تیوباربیتوریک اسید (TBARS) در همبرگر حاوی اسانس و نانواسانس زنیان در دمای یخچالی در طی ۹ روز نگهداری

نتایج بررسی روند کاهش شاخص TBARS درآزمایشگاه مواد غذایی به انجام رسیده و آنالیز نتایج آن در جدول ٤ گزارش شده است.

جدول۳- نتایج اندازه‌گیری سنجش شاخص تیوباربیتوریک اسید (TBARS) در همبرگر حاوی اسانس و نانواسانس در طی نگهداری در دمای یخچالی به مدت ۹ روز بر حسب (mg malonaldehyde/kg) (میانگین± انحراف معیار)

گروه	تیمار	روز ۱	روز ۳	روز ٦	روز ۹
۱	**شاهد بدون اسانس**	۱/۱٤±۰/۰٤^{a}	۱/۷٦± ۰/۱۷^{a}	۲/۳۲± ۰/۱۱^{a}	۲/۸٦±۰/۱٦^{a}
۲	**MFC نانو اسانس**	۱/۰۹ ± ۰/۰۲^{a}	۱/٦۲± ۰/۰٤ ^{b}	۲/۰۹± ۰/۰٦ ^{b}	۲/۷±۰/۱٦^{b}
٤	**MFC اسانس**	۱/۱۳±۰/۰٦^{a}	۱/۷۱± ۰/۱۱ ^{a}	۲/۱۷± ۰/۰٦^{bc}	۲/۷٤± ۰/۱^{b}

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده ی تفوت معنی‌دار در جدول است($p<۰/۰۵$).

۱-۳- ارزیابی نتایج اندازه‌گیری سنجش شاخص تیوباربیتوریک اسید(TBARS)

شاخص TBA در نمونه‌ی شاهد ۱/۱٤ MDA/kg بوده است که تا روز نهم به ۲/۸٦ MDA/kg رسید و شاخص TBA در تیمار حاوی غلظت MIC اسانس ۱/۱۳ MDA/kg بوده و تا روز نهم به۲/۷٦ MDA/kg رسید. شاخص TBA در تیمار حاوی غلظتMIC نانو اسانس ۱/۱۱ MDA/kg بوده است که تا روز نهم به۲/۷۱ MDA/kg رسید. بر اساس نتایج تیمارهای حاوی غلظت MIC اسانس و نانواسانس در روزهای ٦ و ۹ دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد هستند ($p<۰/۰۵$).

بر اساس نتایج، تیمارهای حاوی غلظت MIC اسانس و نانواسانس در طی ۹ روز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند($p<۰/۰۵$).

بر اساس نتایج جدول (۳) به طورکلی تیمار حاوی غلظت MFC اسانس و نانوامولسیون اسانس زنیان در تیمارهای همبرگر در روزهای ۳ و ٦ و ۹ آزمون منجر به کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$). در شاخص تیوباربیتوریک اسید نسبت به تیمارهای شاهد شده است.

به طورکل می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که اضافه کردن نانوامولسیون اسانس زنیان در تیمارهای همبرگر تا روز نهایی آزمون منجر به کاهش معنی‌داری در شاخص تیوباربیتوریک اسید نسبت به تیمارهای شاهد شده است ($p<0.05$) و اختلاف معنی‌داری با تیمارهای دیگر ندارد.($P>0.05$).

بحث

ایمنی خواص مواد غذایی،خصوصا مواد غذایی فسادپذیر مانند گوشت و فرآورده‌های آن، می‌تواند تحت تاثیر واکنش های بسیاری مانند تغییرات میکروبی و شیمیایی و... قرار بگیرد. همان‌طور که گفته شد، تاکنون در ایران اسانس‌های برخی گیاهان دارویی از جمله اسانس گیاه زنیان موثر شناخته شده‌اند و می‌توانند با شرکت در واکنش‌های شیمیایی نظیر اکسیداسیون‌ها و داشتن فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی موجب افزایش ماندگاری فرآورده‌های گوشتی بشوند(٦). همانطور که گفته شد مصرف اسانس‌ها تاثیرات نامطلوب دارند، به همین دلیل درون گیری اسانس‌ها توسط نانوامولسیون‌ها نشان دهنده‌ی یک استراتژی نوید بخش برای غلبه بر محدودیت‌های آنها، کاهش دوز و افزایش ایمنی دراز مدت این ترکیبات در سامانه‌های غذایی است. از طرفی اندازه‌ی ذره‌ای نانوامولسیون معیاری برای میزان پایداری آن است. هرچه اندازه ذره‌ای بزرگتر و محدوده‌ی تزیع اندازه ذره‌های حاصل بیشتر باشد نانوامولسیون ناپایدارتر است(۸). در این تحقیق توزیع اندازه ذرات نانوامولسیون حدود ۱٤٦ نانومتر بود (نمودار ۱) که پایداری آن را نشان می‌داد.

مقایسه نتایج پژوهش حاضر با نتایج تحقیق Eleiwa و همکاران در سال ۲۰۱۳ که بر روی اثر مهارکنندگی اسانس شوید بر روی رشد کپک و مخمر در گوشت چرخ شده تیمار شده با غلظت‌های ۲٪ و ۰/۵٪ ازاسانس شوید در طی ۸ روز نگهداری در دمای 4^{0C} به این نتیجه رسیدند رشد کپک در نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۲٪ از اسانس شوید در طی ۸ روز از ٤/۰۱ به ٤/۹۳ log cfu /g رسید و در نمونه‌ی تیمار شده با غلظت ۰/۵٪ از ۵/۹۵ log cfu /g به ۸/۸۱ رسید که نشان می‌دهد و رنج تغییرات شمارش کپک در این تحقیق از ۲/۷۲ شروع شده و به ۵/۸۲ log cfu /g می‌رسد. نشان می‌دهد که رشد قارچ در این تحقیق کمتر بوده و تأثیرگذاری زنیان به مراتب قوی‌تر است(۵).

سنگ آتش و همکاران در سال ۱۳۹۰ با بررسی اثر اسانس آویشن و زنیان بر جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس پارازتیکوس در پسته با تلقیح سوش خالص آسپرژیلوس پارازتیکوس، دریافتند که به دلیل وجود ترکیب ضد میکروبی تیمول در عصاره زنیان، این عصاره با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر لیتر و آویشن با تیمول کمتر و با غلظت ۲۰۰میکرو گرم بر لیتر توانستند نسبت به کنترل رشد قارچ عمل نمایند و اختلاف کاملا معنی‌دار آماری در سطح p<۰/۰۱ نشان داد. بنابرین به این نتیجه رسیدند که رفع مشکل آلودگی پسته به آفلاتوکسین از طریق جلوگیری از رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس به کمک اسانس‌های آویشن و زنیان امکان‌پذیر است. این تحقیق نیز همانند تحقیق مذکور خاصیت ضد قارچی اسانس زنیان را تأیید می‌کند(۲).

Murthy و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت ضد قارچی عصاره زنیان را بر روی قارچ آسپرژیلوس اوکراسئوس بررسی کردند و تاثیرات آن را بر رشد میسیلیوم قارچ‌ها و ژرمیناسیون اسپورهای این قارچ به اثبات رساندند که در ۲۵۰ ppm زنیان ژرمیناسیون اسپورها را مهار کرد. نتیجه‌ی این تحقیق با تحقیق مذکورمبنی بر اثر ضدقارچی اسانس زنیان بر گونه‌های قارچی آسپرژیلوس همخوانی دارد(۹).

Bairwa و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات ضد قارچی اسانس زنیان بر علیه اپیدرموفایتون فلوکوزوم، میکروسپوروم کنیس و ترایکوفایتون منتاگروفایتیس در غلظت ppm ۹۰۰ شناسایی شده است و تیمول به عنوان یک ترکیب ضد سم قارچی در اسانس زنیان شناسایی شد. در آنالیز ترکیبات موجود در اسانس در تحقیق مذکور نیز تیمول بیشترین درصد را در ترکیبات اسانس زنیان شامل می‌شد و اصلی‌ترین عامل اثرگذاری اسانس زنیان به‌شمار آمد(٤).

اسانس زنیان مورد استفاده در این تحقیق از باریج اسانس تهیه شده و آنالیز ترکیبات موجود در آن انجام گردید که مهمترین ترکیب آن تیمول بوده که میزان آن ٤٥/٩٤٪ تخمین زده شده است. نتایج MIC و MFC نانو اسانس زنیان نشان داد که با محدوده MIC و MFC مشاهده شده از اسانس زنیان متفاوت بود که این نشان دهنده تاثیر گذاری بیشترنانو اسانس زنیان نسبت به اسانس زنیان می‌باشد.

چنانچه در این تحقیق مشاهده شد، با توجه به MIC، و MFC در ارتباط با نانو اسانس زنیان و اسانس زنیان و همچنین شمارش کلونی‌ها در طی روزهای مختلف نشان می‌دهد که به طور کلی ترکیب نانو اسانس زنیان دارای اثرات ضدقارچی قوی‌تری نسبت به اسانس زنیان می‌باشد.

همچنین در این تحقیق مشاهده گردید استفاده از نانو اسانس زنیان دارای تاثیر معنی‌داری بر روی کاهش TBA دارد شاخص TBA در تیمار حاوی غلظتMFC نانواسانس MDA/kg ۱/۰۹ بوده است که در روزهای سوم و ششم و نهم به ترتیب ۱/٦۲ و ۲/۰۹ و ۲/۷ MDA/kg رسید و بر اساس نتایج جدول(۳)، این تیمار تا روز نهایی آزمون باعث کاهش TBA نسبت به نمونه‌ی شاهد گردید و بر اساس نتایج آماری تفاوت معنی‌داری در خاصیت آنتی اکسیدانی بین دو گروه تیمارهای همبرگر حاوی اسانس و نانو اسانس زنیان مشاهده نگردید.

بر اساس نتایج آماری در جدول (۲)، شمارش قارچ در تیمار حاوی غلظت MFC نانواسانس Log cfu/g ۲/۸۲ در روز

اول و به ترتیب در روز سوم و ششم و نهم به ۳/۱۱ و ۳/٤٥ و Log cfu/g٤/۰٤ رسید که در مقایسه با تیمارهای دیگر بهترین حالت اثر مهارکنندگی را در آزمون شمارش کلی قارچ نشان داد.

با توجه به نتایج آزمون شمارش قارچی میتوان نتیجه گرفت که نانو اسانس زنیان با اختلاف قابل مقایسه ای نسبت به اسانس زنیان دارای فعالیت ضدقارچی قوی مشابه با برخی از عوامل ضدقارچی تجاری است و می‌تواند برای انتخاب آن در مطالعات آینده شاخص باشد.

مطالعات زیادی در سال‌های اخیر در ارتباط با ارزیابی حساسیت قارچها به ترکیبات ضد قا رچی گیاهی انجام شده است که با نتایج متغییر همراه بودند. متغییر بودن نتایج به روش‌های متفاوت مورد استفاده در آزمایش مانند زمان انکوباسیون، دمای مورد استفاده، محیط مصرفی، غلظت سوسپانسیون مورد استفاده و دفعات تکرار کشت از یک نمونه بستگی دارد. بنابراین مطالعات بیشتری برای معتبر سازی این فاکتورها مورد نیاز است. با توجه به خواص تائید شده اسانس و نانو اسانس زنیان در تحقیق حاضر و سایر مطالعات انجام شده و نوع ترکیب مؤثر این گیاه، روند تجاری تبدیل این مواد موثر به داروهای ضد قارچی و میکروبی و استفاده از این ترکیبات در ماندگاری سایر فرآورده‌های گوشتی و مواد غذایی انجام گیرد.

فهرست منابع

۱. حسینی، س.، شعبانی، ش.، دلفان آذری، ف.(۱۳۹٤): بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس میخک در همبرگر خام طی نگهداری در انجماد، نشریه بهداشت مواد غذایی، ۵ (۱): ٧٦-٦٧.

۲. سنگ‌آتش، م.، هاشم پور، الف.، مرتضوی، س.، مسکوکی، ع. (۱۳۹۰): اثر ضدقارچی اسانس‌های طبیعی آویشن و زنیان بر جلوگیری از رشد آسپرژیلوس پارازتیکوس در پسته. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی زابل، ۵ (۳): ١٦-٢٣.

3. Akbarmivehie, M., Baghaei, H. (2016): The Effect of Addition Parsnip Herb and its Extract on Momtaze Hamburger Shelf Life. Eur. Online. J., Nat. Soc. Sci. 5(1): 132-146.
4. Bairwa, R., Sodha, R.S., Rajawat, B. S. (2012): Trachyspermum ammi. J. Pharmacogn. Phytochem. 6(11): 56-60.
5. Eleiwa, N., Mahamoud, E. (2014): Antifungal activity of Dill Essential Oil(Anethum graveolens in Minced Meat. J., Essent. Oil. Res.2(1): 6-12.
6. Gandomi, H., Abbaszade, S., Jebellijavan, A., Sharifzade, A. (2013): Chemical comstituents, Antimicrobial and Antioxidative effects of Trachyspermum Ammi essential oil. J., Food Process.Preserv. 51(14): 1690-1695.
7. Gemeda, N., Woldeamanuel, Y., Asrat, D. (2014): Effect of Cymbopogon martinii, Foeniculum vulgare, and Trachyspermum ammi Essential Oils on the Growth and Mycotoxins Production by Aspergillus Species. Int .J. Food.Sci.20(14):373-381
8. Moghimi, R., Ghaderi, L.,Rafati, H., Aliahmadi, A. (2016): Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against E. coli. Food. Chem. 19(4): 410-415.
9. Murthy, P., Bhaskarrao, B., Khanum, H. (2016): Inhibitory effects of Ajowan (Trachyspermum ammi) ethanolic extract on A. ochraceus growth and ochratoxin production. Turk. J., Biol. 33(3): 211-217.