

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

^۱دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران، ^۲دانشیار گروه شیلات، دانشکده

منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران، ^۳آستاد گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی،

دانشگاه تهران، تهران، ایران، ^۴آستاد گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران،

^۵استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، 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)، *Streptococcus agalactiae* (PTCC 1768)، *Lactobacillus lactis* (PTCC 1366)، *Bacillus subtilis* (ATCC)، *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)، *Esherichia coli* (PTCC 3315)، 1694) و قارچ *Candida albicans* مورد بررسی قرار گرفت. فیلم‌های شامل اسانس دارچین فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و نیز اثرات بازداری معنی‌داری را در مقابل قارچ مورد بررسی نشان دادند. در روکش‌ها و محلول تشکیل‌دهنده فیلم ناحیه بازداری با افزایش غلظت اسانس دارچین در ماتریکس پلیمر افزایش پیدا کرد ($P < 0/05$). به‌طور کلی ناحیه بازداری 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

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 زیست‌محیطی می‌باشند (Wang و همکاران، ۲۰۰۷؛ Campos و

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 (Mohan و همکاران، ۲۰۱۰). بیماری ناشی از مصرف غذاهای آلوده شده با باکتری‌های پاتوژن موجب نگرانی مهم در سلامت

* مسئول مکاتبه: bahramsomi@gmail.com

ماهی و جود دارنند و یا طی آلودگی ثانویه در ماهی رشد می کنند که خود موجب ضررهای اقتصادی و مشکلات مرتبط با سلامت می شود. یک استراتژی جالب برای کاهش دوز مصرفی اسانس با حفظ اثر بخشی آن ها می تواند همراهی این ترکیبات طبیعی با فیلم های 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 می کند و به این ترتیب غلظت های بالایی از ترکیبات فعال را برای دوره های زمانی طولانی در سطح فرآورده، جایی که بیش تر در معرض هجوم باکتری ها می باشد، حفظ می کند. به علاوه، اضافه کردن عصاره های گیاهی به پوشش های خوراکی به آن ها ویژگی ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می دهد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۰۷). همچنین این روکش ها به دلیل زیست تخریب پذیر بودن شان در بین مصرف کنندگان از محبوبیت بسیاری برخوردار هستند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a) و می توانند به عنوان جایگزین بالقوه برای مواد پلاستیکی مورد استفاده در صنعت بسته بندی مواد غذایی که مشکلات فراوانی را از نظر آلودگی های زیست محیطی ایجاد کرده اند، مورد استفاده واقع شوند (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰). فیلم ها و پوشش های خوراکی می توانند از انواع گسترده ای از مواد خام شامل هیدروکلئیدها (پلی ساکاریدها، پروتئین ها)، چربی ها و کامپوزیت ها (ترکیبی ساخته شده از دو طبقه قبلی) آماده شوند که در بسیاری از موارد فرآورده های جنبی صنایع مختلف هستند. در بین آن ها فیلم ها و پوشش های پروتئینی به دلیل ویژگی های عملکردی و تغذیه ای بیش تر مورد توجه اند.

پروتئین آب پنیر به عنوان فرآورده جنبی کارخانجات پنیرسازی، به مقدار زیاد تولید می شود. کنسانتره پروتئین آب پنیر می تواند فیلم های شفاف، انعطاف پذیر،

همکاران، ۲۰۱۰؛ Siripatrawan و Harte، ۲۰۱۰؛ Kuorwel و همکاران، ۲۰۱۱). برای برآورده کردن این خواسته یکی از چالش های بزرگ در صنایع غذایی کاهش افزودنی های شیمیایی رایج و استفاده از ترکیبات طبیعی در فرمولاسیون غذاست (Sánchez-González و همکاران، ۲۰۱۱). اسانس های 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 Dalggaard، ۲۰۰۲). آن ها می توانند به عنوان یک منبع خوب از عوامل ضد میکروب در برابر پاتوژن های غذا به کار گرفته شوند. برای مثال؛ در برخی از مطالعات منتشر شده امکان استفاده از اسانس های 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). اسانس های گیاهی و ترکیبات مؤثر آن ها در برابر انواع گسترده ای از میکروارگانیسم ها شامل باکتری های گرم منفی و گرم مثبت فعال شناخته شدند. معمولاً باکتری های گرم منفی به دلیل داشتن دیواره لیپو پلی ساکاریدی در غشاء خارجی خود نسبت به باکتری های گرم مثبت در برابر اسانس ها مقاومت بیش تری نشان می دهند، هر چند در برخی بررسی ها باکتری های گرم مثبت مقاومتی مانند باکتری های گرم منفی نشان دادند (Oussalah و همکاران، ۲۰۰۷). با این وجود استفاده از اسانس ها 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 فرآورده های غذایی و همچنین غیرفعال شدن بخشی از ترکیبات فعال آن ها به دلیل واکنش با بسیاری از مواد غذایی مانند ماهی، محدود می شود. ماهی در طول نگهداری در یخچال بسیار فسادپذیر است که این به طور اساسی به دلیل رشد سریع میکروارگانیسم هایی است که به طور طبیعی در

تشکیل‌دهنده پوشش مراحل هم‌زدن شدیدی را گذرانده بودند و نیز به‌علت وجود امولسیفایر، کف زیادی در محلول‌ها تشکیل شده بود، محلول به‌مدت 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)
Escherichia, *Pseudomonas putida* (PTCC 1694)
coli (PTCC 3315)
Bacillus, *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163)
subtilis (ATCC 465) و *Candida albicans* با استفاده از روش نفوذ در محیط آگاردار (Agar diffusion method) مورد بررسی قرار گرفت. میکروارگانیزم‌های مورد بررسی از دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردیدند. ارگانیزم‌ها به‌مدت یک شبانه‌روز در محیط کشت ب اچ آی آگار (BHI-agar) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. ۷۰ میکرولیتر از محلول‌های مختلف تشکیل‌دهنده فیلم بر روی چاهک‌هایی به قطر ۷/۹

بدون رنگ و بو با ویژگی‌های سدی خوب در برابر گازها، مواد معطر و روغن و ویژگی سدی ضعیف در مقابل آب تولید کند (Morris 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 به‌مدت 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 شامل 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 به‌مدت 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 به‌مدت ۲ دقیقه عمل هم‌زدن صورت گرفت تا اسانس‌ها به‌طور یکنواخت در مجموعه پخش شوند (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). چون محلول‌های

و با رعایت شرایط صحیح انتقال به آزمایشگاه فرآوری دانشکده علوم دریایی دانشگاه دانشکده تربیت مدرس منتقل گردید و پس از آماده سازی ماهی فیله‌هایی با وزن ۱۰۰-۸۰ گرم تهیه شد.

ایجاد پوشش بر روی فیله ماهی: برای ایجاد پوشش بر سطح فیله‌ها، ابتدا فیله‌ها به مدت ۱ دقیقه در محلول‌های تهیه شده غوطه‌ور گردیدند. سپس آن‌ها را از محلول خارج نموده و پس از گذشت تقریباً ۲ دقیقه، دوباره ۱ دقیقه دیگر در محلول پوششی قرار گرفتند. نمونه‌های کنترل بدون پوشش باقی ماندند. برای خشک کردن فیله‌ها آن‌ها را به مدت ۵ ساعت از صفحات مشبک استریل آویزان نموده و در دمای محیط (حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد) تا تشکیل پوشش بر روی فیله‌ها باقی ماندند (Jeon و همکاران، ۲۰۰۲؛ Yingyuad و همکاران، ۲۰۰۶) پس از خشک شدن پوشش، فیله‌ها به یخچال منتقل شده و در دمای 4 ± 2 درجه سانتی‌گراد 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 نمونه‌ها: برای شمارش باکتریایی نمونه‌ها، ۱۰ گرم از نمونه گوشت فیله در شرایط استریل با ۹۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۸۵ مخلوط و هموزن شد و به دنبال آن آن رقت‌های مورد نیاز تهیه گردید. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پور پلت مورد استفاده قرار گرفت. شمارش تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرماگرا در محیط پلیت کانت آگار به ترتیب در دماهای ۳۷ درجه 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 $\log CFU/g$ گزارش گردید (Hernández و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ibrahim Sallam، ۲۰۰۷؛ Arashisara و همکاران، ۲۰۰۴).

میلی‌متر در محیط کشت مولر هینتون آگار (MH-agar) ریخته شد. روکش‌های خوراکی تولید شده با استفاده از یک قالب به دیسک‌هایی به قطر ۱۳/۴ میلی‌متر تبدیل شدند. قبل از قرار دادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی‌لیتر کشت مایع (تقریباً برابر با 10^7-10^6) هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش انجام گرفت. سپس پلیت‌ها ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه قرار گرفتند. قطر هاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد و سپس از قطر دیسک کم شد. این اختلاف به عنوان ناحیه بازداری محلول تشکیل‌دهنده فیلم و روکش‌ها گزارش شد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰).

تهیه محلول پوششی از کنسانتره پروتئین آب پنیر: برپا 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 بالا 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 هم‌زدن توسط هم‌زن به میزان ۱/۵ درصد اسانس دارچین به محلول اضافه شد که به مدت ۲ دقیقه با هم‌زنایزر مخلوط شد. محلول کنترل با همین روش و بدون افزودن توئین و اسانس دارچین تهیه شد.

آماده‌سازی ماهی و تهیه تیمارهای مورد نیاز

آماده‌سازی ماهی: فیل ماهی مورد نیاز از مزرعه پرورش ماهی واقع در شهرستان بابلسر خریداری شد

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار SPSS17 انجام پذیرفت. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی به دست آمده از آزمایش‌های میکروبی از آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی دار ۵ درصد استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج فعالیت ضد میکروبی محلول تشکیل دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی در غلظت‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. روکش‌ها و محلول تشکیل دهنده فیلم بدون اسانس (شاهد) هیچ اثر بازداری را در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان ندادند. این نتایج در موافقت 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 تشکیل دهنده آن شد. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را به ترکیبات فرار موجود در آن‌ها نسبت داده‌اند. اسانس دارچین شامل مقادیر بالایی از سینامالدهید^۱ و اجنول^۲ می‌باشد (Hosseini و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). Ouattara و همکاران (۱۹۹۷) گزارش نمودند که 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؛ Valero و Salmerón، ۲۰۰۲؛ Rojas-Graü و همکاران، ۲۰۰۶؛ Goñi و همکاران، ۲۰۰۹؛ Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰a). نتایج نشان داد که هم در محلول تشکیل دهنده 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 تشکیل دهنده فیلم و روکش‌های خوراکی به ترتیب ۴/۷۵ و ۲۵/۳۷ میلی‌متر بود. باکتری *Bacillus subtilis* یک 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 تشکیل دهنده آن ۷۹/۱۹ و ۳۶/۱۵ میلی‌متر بود که همانند باکتری‌های گرم منفی مقاوت بالایی نشان 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 پنج 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

1- Cinnamaldehyde

2- Eujenol

ناحیه بازداری بر ضدقارچ در محلول تشکیل دهنده فیلم به طور معنی داری 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 میلی متر). این نتایج موافق با یافته‌های Dalirsani و همکاران (۲۰۱۱) و Singh و همکاران (۱۹۹۵) است که گزارش کردند دارچین می‌تواند از رشد قارچ جلوگیری کند.

اثرات اسانس‌ها ممکن است در نتیجه مقاومت بین سویه‌های مختلف باشد (Gómez-Estaca و همکاران، ۲۰۱۰). به‌طور کلی ناحیه بازداری در محلول تشکیل دهنده فیلم نسبت به فیلم‌های خوراکی بالاتر بود که ممکن است به دلیل انتشار غلظت بالاتر اسانس از 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،

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

نوع محلول	<i>L. lactis</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. putida</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
شاهد
م-د (۰/۴)	۱۲/۸۳±۰/۷۳ ^{c*}	۰/۰±۰/۰ ^c	۱۴/۹۱±۰/۸۷ ^b	۲۸/۵۶±۴/۴ ^c	۰/۰±۰/۰ ^c	۲۰/۱۷±۱/۰۵ ^b	۱۵/۰۴±۰/۹۵ ^b
م-د (۰/۸)	۱۷/۲۲±۰/۱۶ ^b	۱۳/۴۷±۰/۶۴ ^b	۱۵/۸۰±۴/۰۶ ^b	۳۶/۰۲±۴/۰۳ ^b	۲۲/۰۰±۱/۰۰ ^b	۲۰/۳۶±۱/۶۱ ^b	۱۲/۳۰±۱/۱۰ ^b
م-د (۱/۵)	۳۰/۵۹±۱/۵۳ ^a	۱۹/۷۹±۰/۷۴ ^a	۲۴/۹۶±۲/۹۶ ^a	۴۵/۷۴±۲/۰۱ ^a	۲۶/۲۱±۳/۲۳ ^a	۲۸/۱۷±۰/۴۷ ^a	۲۴/۸۱±۵/۶۶ ^a
ر-د (۰/۴)	۰/۰±۰/۰ ^c	۰/۰±۰/۰ ^B	۰/۰±۰/۰ ^C	۲۱/۳۴±۵/۰۹ ^C	۰/۰±۰/۰ ^B	۲۰/۶۷±۳/۰۵ ^B	۰/۰±۰/۰ ^B
ر-د (۰/۸)	۱۵/۸۹±۰/۹۹ ^B	۰/۰±۰/۰ ^B	۱۷/۷۱±۱/۳۰ ^B	۳۰/۴۵±۲/۷۹ ^B	۰/۰±۰/۰ ^B	۲۴/۶۹±۴/۱ ^B	۰/۰±۰/۰ ^B
ر-د (۱/۵)	۲۳/۲۷±۱/۲ ^A	۱۵/۳۶±۰/۴۷ ^A	۲۵/۸۰±۳/۰۵ ^A	۳۷/۲۵±۱/۹۶ ^A	۲۲/۱۸±۱/۲۹ ^A	۲۵/۳۳±۳/۰۲ ^A	۱۸/۸۷±۲/۳۵ ^B

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 ± معیار انحراف؛ حروف کوچک در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار در محلول‌های مختلف پروتئین آب پنیر است.

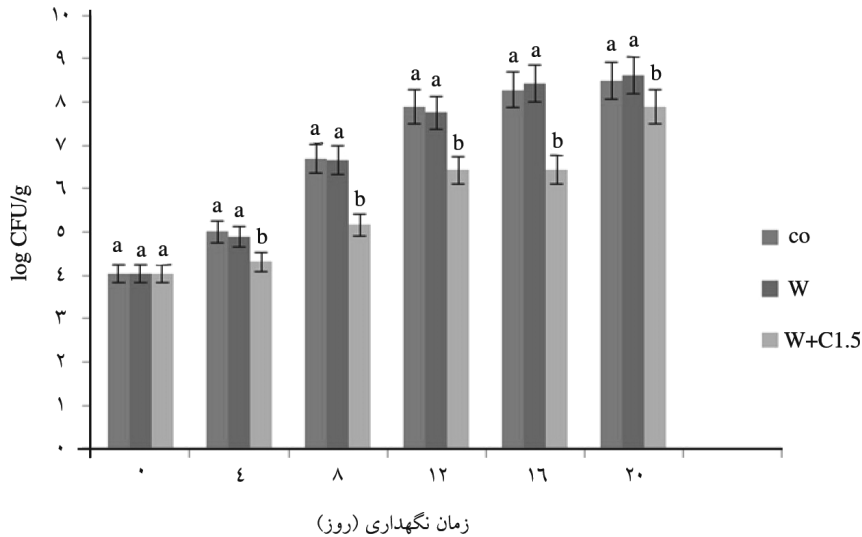
حروف بزرگ در هر ستون نشان از تفاوت معنی دار در روکش‌های مختلف پروتئین آب پنیر است.

با پروتئین آب پنیر غنی شده با اسانس دارچین موجب کند شدن رشد میکروبی به مقدار ۶/۴۴ و $7/98 \log \text{CFU/g}$ 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 رسیده بود. در بررسی انجام شده توسط Dalgaard و Mejholm (۲۰۰۲) دریافتند که به‌کارگیری اسانس مرزنگوش و

تغییرات بار میکروبی کل در شکل ۱ نشان داده شده است. 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. افزایش بار میکروبی کل در گوشت ماهی طی نگهداری ثابت شده است (Ojagh و همکاران، ۲۰۱۰b؛ Lu و همکاران، ۲۰۰۸). تا روز هشتم نگهداری میزان بار باکتریایی کل برای همه تیمارها در حد قابل قبول برای ماهی ($7 \log \text{CFU/g}$) بود (Ibrahim Sallam، ۲۰۰۷). هر چند تیمار شاهد و تیمار پوششی بدون اسانس دارچین به این عدد نزدیک‌تر بودند. پوشش فیله ماهی

نمودند که استفاده از پوشش کیتوزان به همراه اسانس دارچین توانست بار میکروبی کل را در ماهی فزل آلا کاهش دهد و زمان ماندگاری ماهی را طی نگهداری در یخچال افزایش دهد.

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

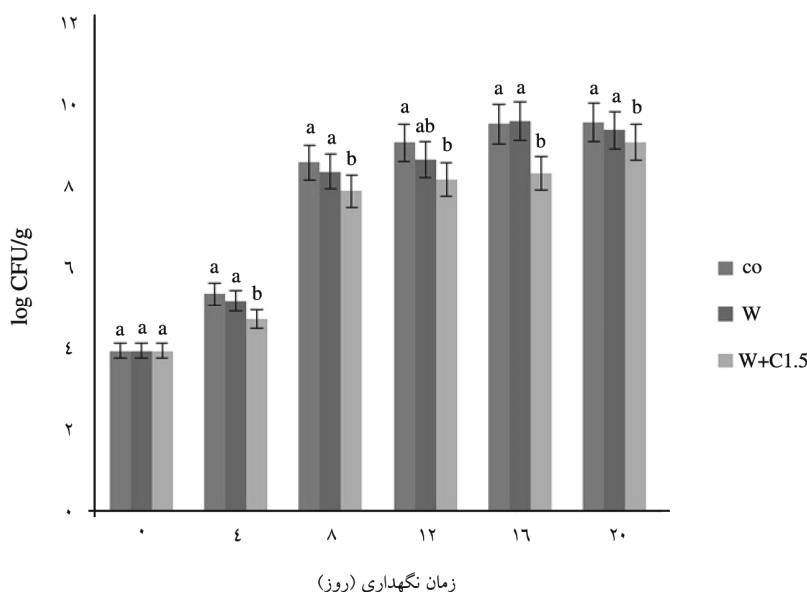


شکل ۱- تغییرات در مجموع بار باکتریایی کل تیمارهای مختلف نگهداری شده در دمای یخچال.

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

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. که 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 سرما گرا در روز صفر نگهداری log CFU/g ۳/۹۸ بوده است. میزان این باکتری‌ها با گذشت زمان نگهداری افزایش پیدا کرد. تعداد این باکتری‌ها در روز بیستم



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. 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*) fillets. Inter. J. Food Microbiol. 97, 209-214.
2. Burt, S.A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. Inter. J. Food Microbiol. 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., 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.
9. 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.
10. Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., and Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116, 982-989.
11. Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., GarcíaGarcía, B., and Garrido, M.D., 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquaculture dmeagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry.* 114, 237-245.
12. 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 Process. Preserv.* 33, 727-743.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Morr, C.V., and Ha, E.Y.W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional. *Food Sci. Nutr.* 33 (6), 431-476.
19. 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.
20. 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.
21. 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 Prot.* 60, 246-253.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. Singh, H.B., Srivastava, M., Singh, A.B., and Srivastava, A.K., 1995. Cinnamon bark oil, apotent fungitoxicant agent fungi causing respiratory tract mycoses. *Allergy*. 50, 995-9.
27. 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.
28. 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.
29. Wang, L., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., and Kerry, J.P., 2007. Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysacharied-based biopolymer films. *J. Food Sci. Technol.* 42, 1128-1138.
30. Yingyuad, S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S., and Siripatrawan, U., 2006. Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*. 19, 149-157.

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 Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Iran,

³Professor, Dept. of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran,

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, Gorgan, 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