

بررسی خواص ضد میکروبی فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس گشنیز و پوست لیموترش و تأثیر آن بر افزایش زمان ماندگاری گوشت گوسفند در دمای یخچال

ناصر صداقت¹، مهدی محمدحسینی²، سارا خشنودی-نیا²، محمد باقر حبیبی نجفی³، آرش کوچکی⁴

- 1- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران، پست الکترونیک: sedaghat@um.ac.ir
- 2- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
- 3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
- 4- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 93/2/25

تاریخ پذیرش: 93/5/16

چکیده

سابقه و هدف: رشد میکروبی مهم‌ترین دلیل فساد گوشت و فراورده‌های گوشتی است که ضمن تغییر بافت و مزه فرآورده خسارت اقتصادی و مسمومیت نیز به دنبال دارد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص ضد میکروبی فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس (گشنیز و پوست لیموترش) و تأثیر آن در کاهش بار میکروبی گوشت گوسفند می‌باشد.

مواد و روش‌ها: فیلم کربوکسی متیل سلولز (CMC) با افزودن اسانس‌های گشنیز و لیموترش در چهار سطح (0/1، 0/2، 0/3 و 0/4 درصد حجمی/حجمی محلول فیلم) تهیه و اثر آنها در محیط آگار بر روی بار میکروبی کل، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آنوروژنس بررسی شد. فیلم CMC حاوی 0/4 درصد اسانس گشنیز یا اسانس لیموترش و فیلم فاقد اسانس روی گوشت پیچیده و از نظر بار میکروبی (بار میکروبی کل، باکتری‌های استافیلوکوکوس، کلی فرم و سودوموناس) و pH با نمونه شاهد در طول 8 روز نگهداری در دمای یخچال ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) مقایسه شد.

یافته‌ها: فیلم‌های حاوی اسانس گشنیز و لیموترش در محیط کشت آگار در مقابل میکروارگانیسم‌های اشرشیاکلی و سودوموناس آنوروژنس خاصیت ضد میکروبی داشتند، اما تأثیر معنی‌داری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نداشتند. فیلم CMC باعث کاهش بار میکروبی کل و باکتری‌های سودوموناس، کلی فرم و استافیلوکوکوس گوشت شد و عملکرد فیلم حاوی اسانس بهتر از فیلم فاقد اسانس بود ($P < 0/05$). تأثیر ضد میکروبی اسانس لیمو بر سودوموناس به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از اسانس گشنیز بود. حضور فیلم کربوکسی متیل سلولز باعث کاهش pH گوشت شد.

نتیجه‌گیری: فیلم کربوکسی متیل سلولز-اسانس لیموترش با کاهش بار میکروبی گوشت، تخریب بافت و افزایش pH را به تعویق انداخت. لذا این فیلم می‌تواند به‌عنوان یک پوشش اقتصادی و زیست‌تخریب‌پذیر برای افزایش ماندگاری گوشت گوسفند در دمای یخچال پیشنهاد شود.

واژگان کلیدی: کربوکسی متیل سلولز، اسانس گشنیز، گوشت گوسفند، اسانس لیموترش، ماندگاری

• مقدمه

غذایی و ترکیبات ضد میکروبی) کارایی این ترکیبات محدود می‌شود (3). روش جدیدی که برای برطرف کردن این محدودیت وجود دارد استفاده از فیلم‌های خوراکی حاوی مواد ضد میکروبی است. بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی که در فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی استفاده می‌شوند از فساد میکروبی در ماده غذایی جلوگیری کرده و خطر رشد

گوشت و فرآورده‌های گوشتی در زمان نگهداری مستعد فساد میکروبی هستند (1). یکی از روش‌های سنتی کنترل رشد میکروبی استفاده از محلول‌های ضد میکروبی به روش غوطه‌وری یا اسپری روی سطح گوشت است (2) در این روش به دلیل رهایش کنترل نشده و غیر فعال شدن بخشی از این ترکیبات ضد میکروبی (به دلیل ارتباط متقابل ترکیبات ماده

حاوی اسانس لیموترش یا گشنیز و ارزیابی قدرت ضدباکتریایی فیلم‌ها روی سوش‌های خالص عامل فساد گوشت قرمز و هم‌چنین استفاده از این فیلم‌ها برای توسعه زمان ماندگاری گوشت قرمز نگهداری شده در یخچال انجام شد.

• مواد و روش‌ها

مواد: گوشت تازه گوسفند و دانه گشنیز (Corianderum Sativum) (خریداری شده از بازار محلی مشهد)، اسانس پوست لیموترش (Citrus lemon (L.)Burm.f.f) (تهیه شده از شرکت باریج اسانس، ایران، این اسانس بر اساس 14-19 میلی گرم در میلی لیتر لیمون استاندارد شده است)، کربوکسی متیل سلولز با دانسیته پایین (شرکت سیگما آلد ریچ، آمریکا)، امولسیفایر توئین 80 و گلیسرول (شرکت مرک، آلمان) سودوموناس آئروژنس (PTCC6538) و استافیلوکوکوس ارئوس (PTCC25923) (تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ) و باکتری اشرشیاکلی (E.coli O157H7) (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد). محیط کشت‌های نوترینت آگار، مک کانکی آگار، پلیت کانت آگار، بردپارکر آگار (از شرکت مرک آلمان)، قرص رینگر و آب پپتونه و مخلوط زرده تخم، CFC آگار، تلوریت پتاسیم (شرکت سیگما آلد ریچ، آمریکا).

اسانس گیری از بذر گشنیز: برای اسانس گیری از دانه‌های گشنیز از روش عصاره گیری آبی (hydro distillation) استفاده گردید. در این روش 100 گرم از دانه‌های گشنیز را در بالن‌های دستگاه کلونجر ریخته سپس 650 میلی لیتر آب تصفیه شده به آن اضافه شد، بالن‌های کلونجر را به دستگاه تقطیر کلونجر متصل و محتویات آن حرارت داده شد. 3 ساعت بعد از جوشش محتویات بالن اسانس از آب مقطر جدا و قابل جمع آوری گردید (17).

تهیه فیلم خوراکی کربوکسی متیل سلولز: فیلم کربوکسی متیل سلولز با کمی تغییر به روش قنبرزاده و همکاران 2010 تهیه شد (18). محلول فیلم به وسیله حل کردن 1 گرم کربوکسی متیل سلولز در 100 میلی لیتر آب مقطر و افزودن 50 درصد وزنی کربوکسی متیل سلولز (0/5 گرم) گلیسرول به عنوان نرم کننده و افزودن یک درصد امولسیفایر توئین 80 تهیه شد. محلول فیلم را روی گرم کننده مجهز به همزن مغناطیسی (با سرعت 1200 دور در دقیقه) به منظور حل شدن کامل کربوکسی متیل سلولز تا دمای 80°C حرارت می دهیم. پس از سرد شدن محلول، اسانس لیموترش یا گشنیز (0/1، 0/2، 0/3، 0/4 درصد حجمی/حجمی) جداگانه به محلول‌های کربوکسی متیل سلولز افزوده و 4 دقیقه هم زده

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را کاهش می‌دهند. با توسعه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی ضد میکربی استفاده از اسانس‌های ادویه جات و گیاهان به عنوان ترکیب ضد میکربی متداول شد. معمولاً ترکیبات ترپنی حاوی گروه‌های فنلی مانند انواع اسانس‌های گیاهی تأثیر خوبی بر باکتری‌های بیماری‌زا دارند. در سال‌های اخیر، تحقیقات فراوانی برای ارزیابی آثار ضد میکربی انواع عصاره‌ها و ادویه‌ها صورت گرفته است (4). از آن‌جا که این ترکیبات کاملاً طبیعی هستند، خطر کمتری نسبت به نگهدارنده شیمیایی برای سلامت انسان و محیط زیست دارند (5).

فعالیت ضد میکربی اسانس‌ها مربوط به ترکیبات منوترپنی آنهاست. در مواد غذایی بین ترکیبات غذا (پروتئین، چربی) و ترکیبات فنلی تأثیر متقابل وجود دارد، که این موضوع باعث کاهش فعالیت ضد میکربی ترکیبات فنلی می‌شود. بنابراین حضور اسانس‌های روغنی در فرمولاسیون فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی موجب ثبات این ترکیبات می‌شود. این دست فیلم‌ها و پوشش‌ها از طریق آزادسازی تدریجی ترکیبات ضد میکربی آلودگی سطحی مواد غذایی را کاهش می‌دهند (6). در فرآورده‌های گوشتی استفاده از پوشش‌ها و فیلم خوراکی نه تنها می‌تواند خاصیت سلامت محصول را بهبود بخشد، از افت رطوبت در مدت نگهداری گوشت جلوگیری کرده و کاهش طعم و جذب بو را نیز کنترل می‌کند (7، 8). تنوع پوشش‌های خوراکی و اسانس‌های گیاهی در کنار تلاش برای تولید محصولاتی با حداقل ماده شیمیایی، در سال‌های اخیر پوشش‌های خوراکی حاوی مواد ضد میکربی را به یکی از پرفرودارترین حوزه‌های پژوهش تبدیل کرده است.

بعضی فیلم‌ها و پوشش‌ها که تاکنون در مورد آنها پژوهش انجام گرفته است عبارتند از: فیلم کازئینات کلسیم و سدیم حاوی کارواکرول (9)، ایزوله پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن (5)، پوشش ژلاتین حاوی اسانس برگ لیمو (lemongrass) و ترنج (10)، کیتوزان حاوی اسانس میخک، دارچین و آویشن (11)، فیلم خوراکی پروتئین شیر دارای اسانس پونه (12)، کیتوزان حاوی عصاره پونه (13)، ایزوله پروتئین سویای حاوی دارچین و زنجبیل (14) پوشش کیتوزان حاوی عصاره چای (15)، فیلم پروتئین سویا حاوی نایسین و عصاره انگور (16). اما در میان این پژوهش‌ها تاکنون از اسانس‌های پوست لیموترش (به اختصار در متن از واژه اسانس لیموترش استفاده شده است) و گشنیز در ترکیب با فیلم کربوکسی متیل سلولز (CMC) استفاده نشده است. لذا این مطالعه با هدف تهیه فیلم خوراکی بر پایه کربوکسی متیل سلولز

50 ± 5 گرم تقسیم کرده و سپس به 4 گروه بدون پوشش (شاهد)، گوشت پوشش داده شده با فیلم کربوکسی متیل سلولز فاقد اسانس، فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی 0/4 درصد حجمی/حجمی اسانس لیموترش و پوشش دار با فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی 0/4 درصد حجمی/حجمی اسانس گشنیز، تقسیم شدند. سپس گوشت ها به یخچال با دمای 4°C منتقل شدند. از گوشت ها به منظور انجام آزمون های میکربی در روز صفر، دوم، چهارم، ششم و هشتم نمونه برداری صورت گرفت. نمونه برداری و تهیه سوسپانسیون میکربی از گوشت ها به روش رینز (WCR) انجام شد (21). از سوسپانسیون حاصله طبق استاندارد ملی 8923-2 رقت های اعشاری تهیه شد (22).

شمارش استافیلوکوکوس، اشرشیا کلی و سودوموناس به ترتیب مطابق استاندارد شماره 1-6806، 2964 و 4791 مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد. انجام کشت پورپلیت (Pure plate) و شمارش کلی در گوشت و فرآورده های آن طبق استاندارد شماره 9263 مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران صورت گرفت (23-26).

تأثیر فیلم خوراکی تولید شده روی pH گوشت؛ گوشت ها اعم از پوشش دار و بدون پوشش در روزهای تعیین شده از یخچال خارج و پس از جدا کردن فیلم خوراکی از گوشت، pH گوشت طبق استاندارد ملی 1028 توسط pH متر اندازه گیری شد (27).

تجزیه و تحلیل آماری؛ آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شد. آنالیز واریانس نتایج نیز با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت. مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن و در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد.

• یافته ها

خاصیت ضد میکربی فیلم خوراکی در محیط آگار؛ افزودن اسانس به فیلم کربوکسی متیل سلولز باعث خاصیت ضد میکربی فیلم در برابر اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژنس گردید و در اطراف فیلم رشد میکربی صورت نگرفت ($P < 0/05$). نوع اسانس بر میزان ممانعت کنندگی فیلم در برابر اشرشیاکلی تأثیر معنی دار داشت و عملکرد اسانس لیموترش در کنترل اشرشیاکلی بهتر بود. با این حال نوع اسانس تأثیر معنی داری در خاصیت ضد میکربی فیلم کربوکسی متیل سلولز در برابر سودوموناس آئروژنس نداشت ($P > 0/05$). با افزایش غلظت هر یک از اسانس ها، خاصیت ضد میکربی فیلم افزایش یافت. فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس در غلظت های 0/1 تا

شد. سپس محلول در قالب های پلی اتیلنی ریخته شده و برای یک ساعت در محیط آزمایشگاه و زیر هود تحت خلأ به منظور کاهش حباب قرار داده شد. بعد از آن محلول فیلم به داخل آون فن دار تحت دمای 37°C انتقال داده شد و فرایند خشک کردن به مدت 20 ساعت ادامه یافت و در نهایت فیلم های سالم و بدون حباب و ترک برای انجام آزمون انتخاب شدند.

اندازه گیری ویژگی ضد میکربی فیلم؛ برای اندازه گیری ویژگی های ضد میکربی لازم است محلول استاندارد 0/5 مک فارلند و سوسپانسیون میکربی 0/5 مک فارلند تهیه شود. برای تهیه استاندارد های مک فارلند ابتدا محلول سولفات باریم (99/5 میلی لیتر اسید سولفوریک 1% و 0/5 میلی لیتر کلرید باریم 1/175%) با دانسیته نوری مشخص تهیه شد. استاندارد 0/5 مک فارلند کدورتی معادل با یک سوسپانسیون باکتریایی معادل با $1/5 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ ایجاد می کند. برای تهیه سوسپانسیون میکربی به کشت 24 ساعته از هر باکتری نیاز است. بنابراین 24 ساعت قبل از آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار آگار مغذی (Nutrient agar) تلقیح انجام شد. پس از رشد کشت مربوطه سطح آن با محلول رینگر شسته و سوسپانسیون غلیظ میکربی حاصل شد. سپس مقداری از سوسپانسیون میکربی درون لوله استریل درب دار حاوی محلول رینگر ریخته و کدورت آن با اسپکتروفتومتر (طول موج 530 نانومتر) اندازه گیری شد. رقت سازی محلول سوسپانسیون تا زمان برابر شدن کدورت محلول 0/5 مک فارلند و سوسپانسیون میکربی ادامه یافت (19).

برای تعیین خاصیت ضد میکربی فیلم خوراکی از روش نفوذ ترکیب ضد میکروبی فیلم در محیط آگار (Film disk agar diffusion assay) استفاده شد. در این روش فیلم ها به صورت صفحه های دایره ای با قطر 6 میلی متر بریده و به محیط کشت آگار مغذی که از قبل با $10^5 - 10^6 \text{ cfu/ml}$ میکروارگانیسم از یکی از انواع استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژنس یا اشرشیاکلی تلقیح شده بود منتقل شدند. پس از آن پتری دیش های حاوی محیط کشت آلوده همراه با فیلم های ضد میکربی برای مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C نگهداری شدند. برای دانستن میزان ممانعت کنندگی فیلم خوراکی از رشد میکروارگانیسم ها قطر هاله های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت 0/01 میلی متر اندازه گیری شد (20).

تعیین خاصیت ضد میکروبی فیلم تولید شده روی فلور میکروبی گوشت؛ قبل از تعیین تأثیر فیلم تولید شده روی بار میکروبی و pH گوشت ابتدا گوشت ها را به قطعاتی با وزن

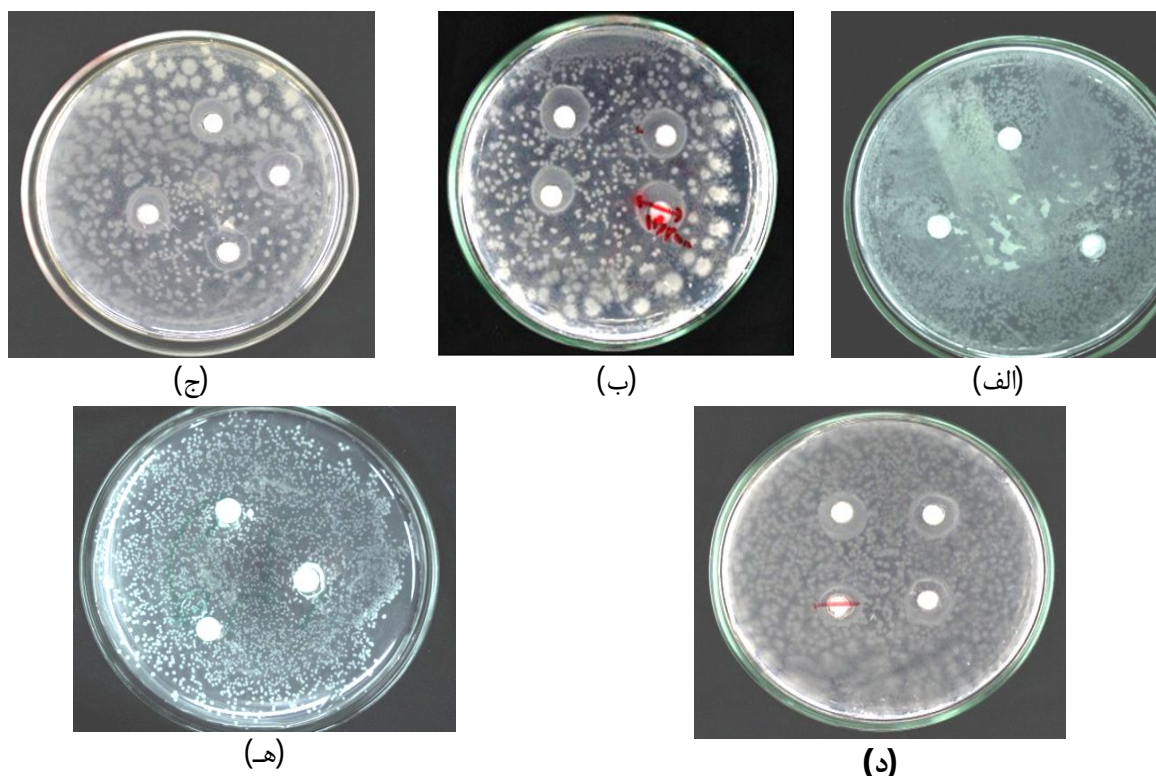
گشنیز و لیموترش در غلظت‌های مختلف هر یک از اسانس‌ها در جدول 1 نمایش داده شده است.

0/4 درصد حجمی/حجمی اثر معنی‌داری بر استافیلوکوکوس اورئوس نداشت (شکل 1). اندازه هاله تشکیل شده توسط دیسک‌های فیلم CMC حاوی اسانس

جدول 1. اندازه هاله ایجاد شده توسط فیلم CMC حاوی غلظت‌های مختلف اسانس گشنیز و لیموترش

نوع میکروارگانیسم	غلظت اسانس (درصد حجمی/حجمی)	هاله ایجاد شده توسط اسانس لیمو ترش (میلی متر)	هاله ایجاد شده توسط اسانس گشنیز (میلی متر)
سودوموناس آئورژنز	0	0	0
سودوموناس آئورژنز	0/1	11/375±0/8 ^{d*}	11/475±1 ^d
سودوموناس آئورژنز	0/2	12/750±1/07 ^{cd}	13/675±2 ^{bc}
سودوموناس آئورژنز	0/3	14/450±0/5 ^b	14/875±1/2 ^{ab}
سودوموناس آئورژنز	0/4	14/975±0/4 ^{ab}	16±0/9 ^a
E.coli O ₁₅₇ H ₇	0	0 ^e	0 ^e
E.coli O ₁₅₇ H ₇	0/1	11/90±0/5 ^d	14/30±0/3 ^{bc}
E.coli O ₁₅₇ H ₇	0/2	13/825±0/3 ^c	14/60±0/5 ^{bc}
E.coli O ₁₅₇ H ₇	0/3	15/30±1/1 ^b	15/150±1/6 ^b
E.coli O ₁₅₇ H ₇	0/4	16/775±0/2 ^a	17/450±0/4 ^a
استافیلوکوکوس ارئوس	0	0	0
استافیلوکوکوس ارئوس	0/1	0	0
استافیلوکوکوس ارئوس	0/2	0	0
استافیلوکوکوس ارئوس	0/3	0	0
استافیلوکوکوس ارئوس	0/4	0	0

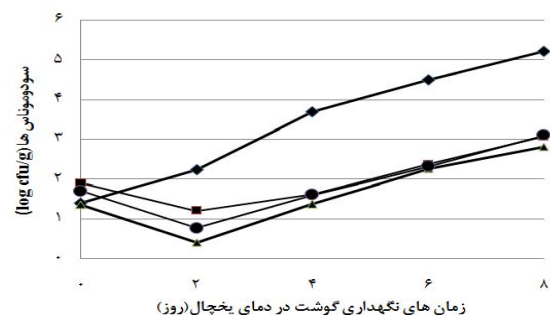
*حروف مشترک نشانه عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح 5 درصد است.



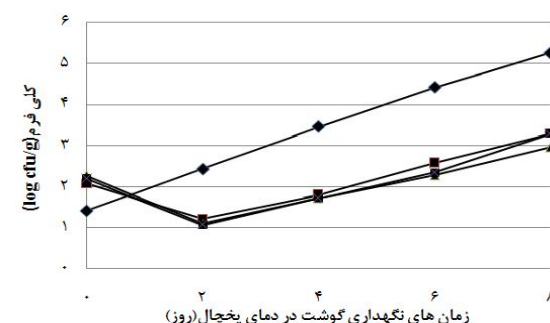
شکل 1. نمایش تأثیر فیلم CMC (الف) بدون اسانس بر اشرشیاکلی (ب) 0/2% اسانس گشنیز بر اشرشیاکلی (ج) 0/2% اسانس لیمو ترش بر اشرشیاکلی (د) 0/3% درصد اسانس لیموترش بر روی سودوموناس آئورژنس (ه) 0/4% اسانس گشنیز بر روی استافیلوکوکوس اورئوس

ضدمیکروبی نشان داد اما این فیلم روی سودوموناس‌های گوشت تأثیر معنی‌داری نداشت.

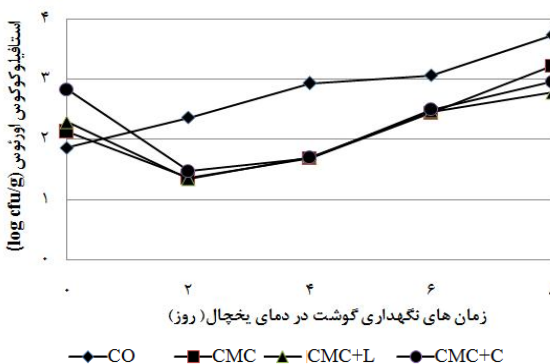
در مورد اثر فیلم CMC روی اشرشیاکلی، نتایج هیچ تفاوت معنی‌داری را بین نمونه‌های دارای پوشش CMC حاوی اسانس و فاقد اسانس نشان نداد. اما بین نمونه‌های حاوی پوشش کربوکسی‌متیل سلولز و نمونه شاهد تفاوت در سطح 5 درصد معنی‌دار بود (شکل 3-ب).



(الف)



(ب)



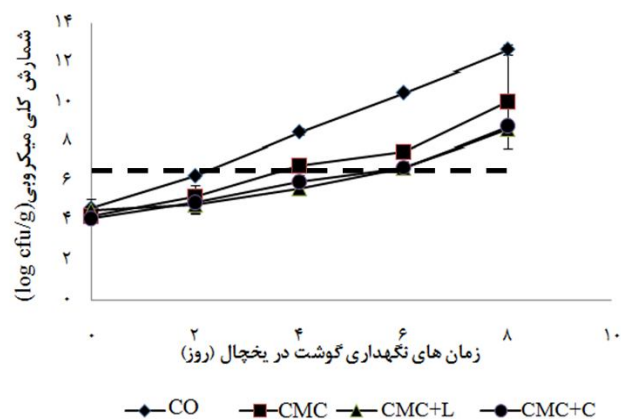
(ج)

شکل 3. تأثیر نوع پوشش در طی زمان نگهداری در یخچال بر شمارش کلی (الف) سودوموناس‌ها (ب) کلی‌فرم‌ها (ج) استافیلوکوکوس در گوشت تازه گوسفند.

CO: گوشت فاقد پوشش، CMC: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC فاقد اسانس، CMC+L: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC حاوی 0/4 v/v اسانس لیموترش، CMC+C: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC حاوی 0/4 v/v اسانس گشنیز. (---: حداکثر میزان مجاز بار میکروبی کل)

خاصیت ضد میکروبی فیلم خوراکی روی فلور میکروبی

گوشت: بر اساس جداول آنالیز واریانس و نتایج آماری در نمونه‌های پوشش‌داده‌شده با فیلم CMC حاوی اسانس، به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های دارای فیلم CMC فاقد اسانس شمارش کلی میکروب‌ها (Total count) کمتر بود ($P<0/05$). به‌طوری که میانگین بار میکروبی گوشت پوشش‌داده‌شده با فیلم حاوی اسانس لیموترش 6/0553، فیلم حاوی اسانس گشنیز 6/1193، فیلم فاقد اسانس 6/7447 و در گوشت بدون پوشش 8/5347 logcfu/g بود. علی‌رغم این که تأثیر اسانس لیموترش در کنترل بار میکروبی بهتر بود، تفاوت بین دو اسانس معنی‌دار نبود. زمان نگهداری گوشت در یخچال در شمارش کلی میکروبی گوشت تأثیر معنی‌داری داشت ($P<0/05$). با گذشت زمان شمارش کلی میکروبی در گوشت‌های فاقد فیلم خوراکی با سرعت زیادی افزایش یافت، اما این روند افزایشی در گوشت پوشش‌داده‌شده با فیلم و به‌ویژه فیلم حاوی اسانس به‌طور معنی‌داری کمتر بود (شکل 2).



شکل 2. اثر نوع فیلم خوراکی طی زمان نگهداری بر شمارش کلی

میکروبی گوشت تازه گوسفند

CO: گوشت فاقد پوشش، CMC: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC فاقد اسانس، CMC+L: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC حاوی 0/4 v/v اسانس لیموترش، CMC+C: گوشت پوشش‌داده شده با فیلم CMC حاوی 0/4 v/v اسانس گشنیز. (---: حداکثر میزان مجاز بار میکروبی کل)

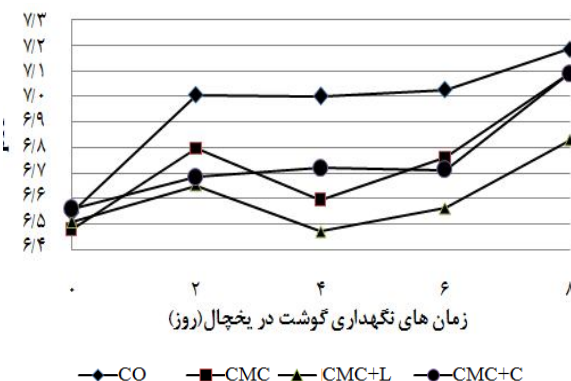
هم‌چنین شمارش باکتری‌های سودوموناس‌ها نشان داد تعداد این میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های دارای فیلم CMC به‌طور معنی‌داری کمتر از نمونه شاهد بود ($P<0/05$). مقایسه بین فیلم‌های حاوی اسانس لیموترش و گشنیز نشان داد، اسانس لیموترش اثر ضدمیکروبی بهتری نسبت به اسانس گشنیز داشت، اما این اختلاف معنی‌دار نبود (شکل 3-الف).

زمانی که فیلم کربوکسی‌متیل سلولز حاوی اسانس گشنیز روی محیط کشت سودوموناس‌اوترژنس اعمال شد خاصیت

با این حال حضور اسانس‌ها در فیلم کربوکسی‌متیل سلولز تأثیر معنی‌داری بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس نداشت. همسو با یافته‌های این مطالعه Seydim و همکاران (2006) تأثیر معنی‌داری در خصوص اسانس رزماری در فیلم پروتئین آب‌پنیر جهت کنترل رشد استافیلوکوکوس اورئوس گزارش نکردند. آنها دلیل احتمالی این مسئله را غلظت پایین اسانس‌های به کار رفته در فیلم به منظور ممانعت استافیلوکوکوس اورئوس دانستند (20). احتمالاً در این پژوهش نیز همین امر صادق بوده است. مغایر با یافته‌های مطالعه حاضر Oussalah و همکاران (2004) گزارش کردند که ترکیب 1 درصد اسانس پونه کوهی در فیلم پروتئین آب‌پنیر در کنترل اشرشیاکلی و سودوموناس‌های موجود بر سطح گوشت گاو مؤثر است (12). Pelissari و همکاران (2009) حداقل غلظت مؤثر اسانس پونه کوهی را برای ممانعت در برابر استافیلوکوکوس اورئوس 2% محلول فیلم پروتئین آب‌پنیر اعلام کردند (13). مطالعه هایونی و همکاران (2008) نیز نشان داد اسانس مریم گلی در شرایط آزمایشگاهی، اثرات ضد میکربی معنی‌داری علیه گونه‌های سودوموناس و استافیلوکوکوس نداشت. آنها بیان داشتند، در بروز خصوصیات ضد میکربی اسانس‌ها در گوشت و سایر محصولات عواملی همچون دمای نگهداری، نوع بسته‌بندی، میزان اکسیژن، میزان و نوع میکروارگانیزم‌های سطحی و نیز عواملی همچون میزان چربی، پروتئین و شرایط فیزیکیوشیمیایی محصول دخالت دارند (31). با این حال Ahmad و همکاران (2012) تأثیر ضد میکربی فیلم ژلاتین ماهی حاوی اسانس برگ‌لیمو را بر باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی-موریم) کمتر از باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریامنوسیتوژنس) عنوان کردند. آنها دلیل این امر را حضور غشای خارجی اضافی در باکتری‌های گرم منفی اعلام کردند (10). Arrieta و همکاران (2013) نیز فیلم کازئینات کلسیم و سدیم حاوی کارواکرول مانع باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوس دانستند (9). مکانسیم فعالیت ضد میکربی اسانس‌های روغنی علاوه بر حمله این ترکیبات به فسفولیپیدهای موجود در دیواره سلولی و متعاقباً افزایش نفوذپذیری و نشت سیتوپلاسم و خروج ATP (4) به عوامل دیگری نیز وابسته است؛ تفاوت بین ترکیبات فنلی اسانس (این امر نیز خود وابسته به واریته گیاه، اقلیم، زمان برداشت و شرایط ذخیره‌سازی است) موجب تغییر در عملکرد انواع اسانس می‌شود (32) به علاوه واکنش بین ترکیبات مختلف اسانس و آنزیم‌های دیواره سلولی (29) از

همان‌طور که پیش‌تر توضیح داده شد، حضور اسانس در فیلم خوراکی تأثیر معنی‌داری بر استافیلوکوکوس اورئوس تلقیح‌شده به آگار نداشت. چنین نتایج مشابهی در مورد استافیلوکوکوس‌های موجود در گوشت نیز حاصل شد. با این حال تفاوت بین تعداد استافیلوکوکوس‌های گوشتی پوشیده شده با فیلم کربوکسی‌متیل سلولز و گوشت فاقد پوشش در سطح 5 درصد معنی‌دار بود.

بررسی اثر فیلم خوراکی روی pH گوشت: آنالیز واریانس و نتایج آماری نشان داد pH در نمونه‌های حاوی فیلم CMC به طور معنی‌داری کمتر از نمونه شاهد بود ($P < 0/05$). مقایسه بین pH گوشت دارای فیلم CMC با و بدون اسانس نشان داد، پوشش‌های دارای اسانس لیموترش به‌طور معنی‌داری دارای pH کمتری هستند. تفاوت pH نمونه پوشش‌داده شده با فیلم بدون اسانس و حاوی اسانس گشنیز در سطح 5 درصد معنی‌دار نبود (شکل 4).



شکل 4. pH گوشت تازه گوسفند در طی زمان نگهداری در یخچال تأثیر نوع پوشش بر

• بحث

خاصیت ضد میکربی فیلم خوراکی در محیط آگار: حضور فیلم‌های کربوکسی‌متیل سلولز حاوی اسانس مانع رشد اشرشیاکلی شد. Fazilah و همکاران (2006) اعلام کردند که فیلم خوراکی آلژینات-نشاسته حاوی 0/1 تا 0/4 درصد اسانس علف لیمویی در برابر اشرشیاکلی دارای خاصیت ضد میکربی بود (28). محققین دیگر نیز فیلم‌های خوراکی حاوی اسانس پونه، آویشن، برگ‌لیمو و دارچین، عصاره انگور و سیر را مانع رشد اشرشیاکلی عنوان کردند (16, 29, 30).

همچنین فیلم‌های CMC حاوی اسانس از رشد سودوموناس آئروژنس نیز جلوگیری کردند. این مطالب بیان‌گر این است که ترکیبات ضد میکربی از فیلم به محیط کشت مهاجرت و از رشد میکروارگانیزم جلوگیری می‌کنند.

با یا بدون اسانس روی گوشت با کاهش بار میکروبی روند تخریب بافت گوشت را کندتر ساخت. در این میان pH گوشت دارای فیلم کربوکسی متیل سلولز-اسانس لیموترش به طور معنی داری کمتر از گوشت پوشیده شده با فیلم حاوی اسانس گشنیز بود تنفس گوشت و فعالیت میکروبی باعث تولید دی اکسید کربن می شود، Bifani و همکاران (2009) با تحقیق در مورد نفوذپذیری به گازها در فیلم های کربوکسی متیل سلولز حاوی عصاره گیاهی به این نتیجه رسیدند که نوع و غلظت عصاره به کار رفته در پوشش ها بر نفوذپذیری این فیلم ها نسبت به گاز دی اکسید کربن مؤثر است. حضور برخی ترکیبات (مانند اسانس ها و عصاره های گیاهی) در فیلم خوراکی می تواند باعث کاهش یا افزایش انحلال دی اکسید کربن در فیلم کربوکسی متیل سلولز شده و به این ترتیب نفوذپذیری فیلم به این گاز را تحت تأثیر قرار دهد (38). به نظر می رسد حضور اسانس روغنی گشنیز و لیموترش در فیلم خوراکی به ویژه اسانس لیموترش نفوذپذیری به گاز دی اکسید کربن کاهش داده و متعاقباً باعث افزایش غلظت گاز دی اکسید کربن در بسته شده است که این افزایش غلظت گاز با کاهش pH همراه است که به نوبه خود می تواند بر روی کاهش فلور میکروبی گوشت نیز مؤثر باشد.

اثر زمان نگهداری گوشت روی pH در سطح 5 درصد معنی دار بود، که این امر ناشی از آزادی تدریجی ترکیبات ضد میکروبی از فیلم بود. در ابتدا تعداد میکروارگانیسم ها از میزان غلظت ترکیب ضد میکروبی بیشتر بود لذا از روز 0 تا روز 2 شاهد افزایش pH گوشت در راستای فعالیت میکروارگانیسم ها بودیم، اما از روز دوم به بعد با افزایش غلظت ماده ضد میکروبی و دی اکسید کربن حاصل از تنفس گوشت رفته رفته بیش تر شده و متعاقباً میکروارگانیسم ها کم تر شده اند و تجزیه ترکیبات از ته نیز در گوشت کاهش می یابد، بدین ترتیب pH گوشت با سرعت کمتری بالا می رود.

در مجموع می توان گفت فیلم حاوی اسانس، به ویژه اسانس پوست لیموترش، پتانسیل خوبی در کاهش بار میکروبی گوشت گوسفند داشت، ضمن این که افزایش pH و تخریب بافت گوشت طی دوران نگهداری را به تعویق می اندازد. در نتیجه فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس لیموترش می تواند به عنوان یک پوشش اقتصادی و مؤثر و در عین حال زیست تخریب پذیر در افزایش زمان ماندگاری گوشت در دمای یخچال پیشنهاد شود.

دیگر نکات مؤثر بر عملکرد ضد میکروبی این ترکیبات است. Hosseini و همکاران (2009) طبیعت و ویژگی های ساختاری ماتریکس حامل اسانس روغنی و نحوه ساخت آن را نیز بر ویژگی های ضد میکروبی فیلم مؤثر دانسته اند (11).

خاصیت ضد میکروبی فیلم خوراکی روی فلور میکروبی گوشت: فیلم CMC با و بدون اسانس باعث کاهش شمارش کلی میکروب های گوشت شد. از آن جایی که فیلم CMC جاذب الرطوبه است با کاهش فعالیت آبی به طور معنی داری امکان رشد را از میکروب ها می گیرد. فیلم CMC دارای اسانس گشنیز یا لیموترش نسبت به فیلم بدون اسانس به دلیل در مورد اثر بخشی بیش تر فیلم حاوی اسانس بر فلور میکروبی گوشت نیز باید گفت دلیل این امر به خاصیت ضد میکروبی اسانس ها و آزادی تدریجی آنها از فیلم طی زمان نگهداری گوشت در یخچال برمی گردد. Pohlman و همکاران (2009) نیز فیلم ژلاتینی حاوی لاکتات پتاسیم را در کاهش باکتری های استیک گوشت گاو مؤثر دانستند (33).

در استاندارد ملی ایران شماره 2394 میزان حداکثر میکروارگانیسم های مجاز 10^6 در گرم یا سانتی متر مربع، میزان اشرشیا کلی 50 در گرم، میزان استافیلوکوکوس های کواگولاز مثبت 5×10^5 بیان شده است (34). به این ترتیب در حالی که در گوشت بدون پوشش بعد از دو روز شمارش میکروبی کل به بالای حد استاندارد رسید، این زمان در گوشت قرمز پوشش داده شده با اسانس به حدود 6 روز افزایش یافت (شکل 2).

مقایسه بین تعداد سودوموناس های موجود در گوشت دارای فیلم CMC و بدون پوشش نشان داد به علت جاذب الرطوبه بودن CMC و جذب آب گوشت و کاهش فعالیت آبی، متعاقباً رشد میکروب ها کاسته می شود (35) نتایج بخش قبل نشان داد اسانس های گشنیز و لیموترش نسبت به سودوموناس ها خاصیت ضد میکروبی دارند. اما زمانی که فیلم CMC حاوی اسانس گشنیز روی گوشت کشیده شد اثر ضد میکروبی معنی داری نداشت که علت آن می تواند تفاوت مقاومت گونه های مختلف سودوموناس به ترکیبات ضد میکروبی باشد (29).

اثر فیلم خوراکی روی pH گوشت: pH نمونه های دارای فیلم CMC کمتر از نمونه شاهد بود. در گوشت با گذشت زمان بافت توسط فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم های گوشت تخریب می شود، این تخریب بافت با تجزیه ترکیبات پروتئینی و تولید ترکیبات از ته همراه است که این ترکیبات باعث افزایش pH گوشت می شوند (36، 37). حضور فیلم کربوکسی متیل سلولز

• References

- Cardenas FC, Giannuzzi L, Zaritzkay NE. Mathematical modeling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Sci* 2008; 79: 509-20.
- Zinoviadou K, Koutsoumanis KP, Biliaderis CG. Physical and thermomechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobial, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocoll* 2010; 24: 49-59
- Pinheiro AC, Bourbon AI, Quintas MA., Coimbra MA, Vicente AA. K-carrageenan/chitosan nanolayered coating for controlled release of a model bioactive compound. *Innov Food Sci & Emer Tech* 2012; 16: 227-232.
- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94(3), 223-253.
- Meshkani M, Mortazavi A, Pourfallah Z. Antimicrobial and physical properties of a chickpea protein isolate-based film containing essential oil of thyme using response surface methodology. *Iranian J Nutr Sci Food Tech* 2013; 8(1): 93-104 [in Persian].
- Buonocore GG, Del Nobile M, Panizza A, Battaglia G, Nicolais L. Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial films intended for food packaging applications. *J Food Sci* 2003; 68(4): 1365-70.
- Coma V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci* 2008; 78: 90-103.
- walsh, HM, Kery JP. Meat packaging. Meat processing improving quality. London: Wood head & CRC press 2002: 417-43.
- Arrieta MP, Peltzer MA, Garrigós MC, Jiménez A. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *J Food Eng* 2013; 114: 486-94.
- Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, Agustini TW. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocoll* 2012; 28:189-99.
- Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process and Preserv* 2009; 33: 727-43.
- Oussalah M, Caillet S, Salmiéri S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric Food Chem* 2004; 52(18): 5598-5605.
- Pelissari FM, Grossmann MVE, Yamashita F, Pineda EAG. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *Journal of Agric Food Chem* 2009; 57(16): 7499-7504.
- Atares L, Jesus C, Talens P, Chiralt A. Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *J food Eng* 2010; 99: 384-91.
- Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J Food Eng* 2010; 98: 443-52.
- Sivaroban T, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Res Int* 2008; 41(8): 781-85.
- Dadalioglu I, Evrendilek G. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogenesis. *Journal of Agric Food Chem* 2004; 52(26): 8255-60.
- Ghanbarzadeh B, Almasi H. Physical properties of edible emulsified based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *Int j Biol Macromolecules* 2011; 48: 44-49.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. Philadelphia: W.B. Sunder. company, 2011. p. 182-276.
- Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int* 2006; 39(5): 639-44.
- Lillard HS. Comparison of sampling methods and implications for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. *J Food Prot* 1988; 51: 405-408.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 2: specific rules for the preparation. ISIRI no 8923-2. 1st revision, Karaj: ISIRI; 2006 [in Persian].
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Enumeration of coagulase – Positive staphylococci (*staphylococcus aureus* and other species) – Test method Part 1 :Technique using baird – parker agar medium. ISIRI no 6806-1. 2nd revision, Karaj: ISIRI; 2005 [in Persian].
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Specification and test methods for egg yolk powder. ISIRI no 2964. 2nd revision, Karaj: ISIRI; 1994 [in Persian].
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Meat and Meat products - Enumeration of pseudomonas Spp. ISIRI no 4791. Karaj: ISIRI; 1999 [in Persian].
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique. ISIRI no 9263. 1st revision, Karaj: ISIRI; 2007 [in Persian].

27. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Meat and meat products – Measurement of pH – Reference test method. ISIRI no 1028. 1st revision, Karaj: ISIRI; 2007 [in Persian].
28. Fazilah A, Maizura M, Norziah MH. Antimicrobial Activity And Physical properties of Sago starch – Alginate edible film incorporate with lemon grass essential oil. National Conference Food Science & Nutrition, University of Malaysia Sabah, 13-14 December 2006: 32-37
29. Emiroglu Z K, Yemis GP, Coskun BK, Candogan K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Sci 2010; 86(2): 283-288.
30. Rojas-Graü MA, Avena-Bustillos RJ, Olsen C, Friedman M, Henika PR, Martín-Belloso O, et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginateapple puree edible films. J Food Eng 2007; 81(3): 634-641.
31. Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H and et al. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. Int J Food Microbiol 2008; 125: 242–251.
32. Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. J Food Sci 2005; 70: M45–M51.
33. Pohlman FW, Brown Jr AH, Dias-Morse PN, McKenzie LM, Rojas TN, Mehall LN, Evaluation of Potassium Lactate Incorporated Gelatin Coating as an Antimicrobial Intervention on Microbial Properties of Beef Steaks. Arkansas Animal Science Department Report 2007; AAES Res Series 574: 117-119.
34. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Microbiology red meat - Carcasses, minced red meat - Specifications and test methods. ISIRI no 2394. 1st revision, Karaj: ISIRI; 2007 [in Persian].
35. Sayanjali S, Ghanbarzadeh B, Ghiassifar S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. LWT-Food sci and technol 2011; 44: 1133-38.
36. Kennedy C, Buckley DJ, Kerry JP. Influence of different gas compositions on the short-term, storage stability of mother-packaged retailready lamb packs. Meat Sci 2005; 69: 27–33.
37. Jouki M, Khazaei N. Effects of Storage Time on Some Characteristics of Packed Camel Meat in Low Temperature. Int J Anim Vet Adv 2011; 3(6): 460-64.
38. Bifani V, Ramirez C, Ihl M, Rubilar M, Garcia A, Zaritzky N. Effects of murta (*Ugni molinae* Turcz) extract on gas and water vapor permeability of carboxymethylcellulose-based edible films.. LWT-Food sci and technol 2007; 40: 1473–81.

Antimicrobial Properties of CMC-based Edible Films Incorporated with Coriander and Citrus Lemon Essential oils on the Shelf-life of Fresh Lamb-meat at Refrigerator Temperature

Sedaght N^{1*}, Mohammad-Hosseini M², Khoshnoudi-nia S², Habibi MB³, Koocheki A⁴

1. *Corresponding author: Associate Prof, Dept.of Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

E-mail: sedaghat@um.ac.ir

2. M.Sc Graduate in Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

3. Prof, Dept.of Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

4. Associate Prof, Dept.of Food Science, College of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Received 15 May, 2014

Accepted 7 Aug, 2014

Background and Objectives: Microbial spoilage of meat and meat products leads to the development of off-odors, tissue breakdown, economic damages, and toxic effects to humans. The objective of this study was to assess the microbial properties and efficacy of coriander and lemon oils incorporated with carboxymethyl-cellulose (CMC) to minimize the presence of pathogenic-bacteria in lamb meat.

Materials and Methods: CMC films containing coriander and lemon oil (0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4%v/v film solution) were prepared. Antimicrobial properties of the films were investigated on *Staphylococcus-aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas-aeruginosa* on agar medium. CMC films with 0.4% essence or without essence were wrapped around the meats and stored at 4±1°C for 8 days. The coated and uncoated samples were analyzed periodically to determine microbiological properties (total bacteria count, *Coliform*, *Staphylococcus.spp* and *Pseudomonas.spp*) and pH.

Results: Both films containing essence had antimicrobial effects on the nutrient-agar medium against the *Escherichiacoli* and *Pseudomonas-aeruginosa*, while they had no anti-microbial effects on *Staphylococcus-aureus*. As compared with the control samples, significant decrease was observed in total count bacteria, *coliform*, *Staphylococcus.spp* and *Pseudomonas.spp* in lamb meat samples treated with CMC films (p<0.05). The anti-microbial effect of lemon oils on *Pseudomonas.spp* was significantly greater than coriander. The CMC films with or without essence caused a decrease in pH of the meat samples.

Conclusion: The CMC films enriched with essence, especially lemon essence, delayed tissue breakdown, and increases the pH by reducing the bacterial growth. Therefore, use of citrus lemon film as an economical and biodegradable coating has a good potential for increasing the shelf-life of lamb meat at the refrigerator temperature.

Keywords: Carboxymethyl cellulose, Coriander essence, Lamb meat, Lemon essence, Shelf-life