

خاصیت ضد میکروبی کیتوسان گستره وسیعی از میکروارگانیسم ها را که شامل قارچها و باکتریها و ویروسها می شود در برمی گیرد. این ویژگی کیتوسان به فاکتورهایی مثل نوع کیتوسان، درجه پلیمریزاسیون، میزان، ترکیب شیمیایی غذایی سوستر، شرایط محیطی مثل میزان فعالیت آبی سوستر یا میزان رطوبت آن یا هر دو بستگی دارد. بین خاصیت ضد میکروبی کیتوسان و مشتقاتش هم تفاوتی وجود دارد. کیتوسان اثر ضد میکروبی سریعتری روی قارچها و جلبکها نسبت به باکتریها دارد. اثر بازدارندگی کیتوسان در $\text{pH}=6$ بیشتر از $\text{pH}=7$ است چون در محیط بازی گروههای آمینی آزاد هستند [۲].

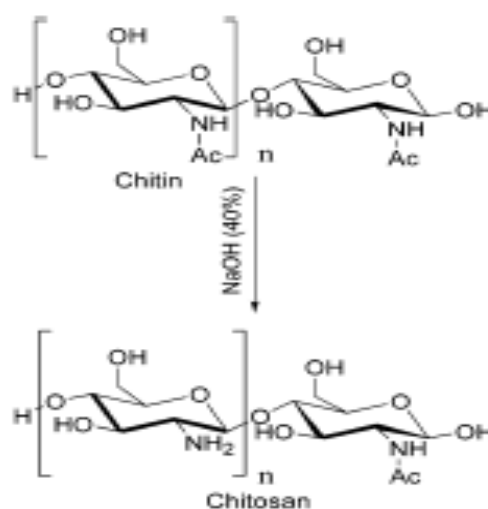
امروزه روشهای جدید نگهداری از مواد غذایی به سمت استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی و کاهش استفاده از مواد شیمیایی پیش می رود. تحقیقات زیادی روی خواص ضد میکروبی داروهای گیاهی و ادویه جات مختلف انجام شده است. خاصیت ضد میکروبی این مواد به نوع آنها، نوع فعالیت ضد میکروبی آنها، نوع میکروارگانیسم و در نهایت نوع ماده غذایی بستگی دارد. وانیلین از جمله مواد گیاهی است که از قدیم به عنوان یک ماده معطر در تهیه غذاهای مختلف به کار می رود و در ضمن خاصیت ضد میکروبی هم دارد. وانیلین (۴- هیدروکسی - ۳- متوکسی بنزوالدهید) بخش اعظمی از دانه وانیل را تشکیل می دهد. در این پروژه علاوه بر کیتوسان از وانیلین هم به عنوان یک ماده ضد میکروب استفاده شده است [۳].

هدف ما در این پروژه بررسی تأثیر ضدقارچی کیتوسان همراه با اسانس وانیلین بر روی میوه توت فرنگی به عنوان نوعی پوشش خوراکی است.

۲- فساد

عوامل مختلفی همچون عوامل فیزیکی، فعالیت آنزیم های موجود در میوه یا سبزی، فعالیت میکروبی و یا ترکیبی از این عوامل میوه ها و سبزیهای خام را فاسد می کنند. اگر چه در هر سبزی یا میوه ای فساد خاصی توسط انواع ویژه ای از میکروارگانیسم ها رخ می دهد، اما غالبا بعضی از فسادهای میکروبی بیشتر در سبزیها و میوه ها دیده می شوند که از متداولترین آنها می توان به پوسیدگی کپکی خاکستری

خارجی سخت پوستان است. کیتوسان سه گروه فعال شامل یک گروه آمینی و دو گروه هیدروکسیلی در $\text{C}-2$ و $\text{C}-6$ دارد از طریق ایجاد تغییراتی در این گروهها مشتقات مختلفی از کیتوسان بدست می آید که کاربردهای زیادی دارند [۴]. کیتین و کیتوسان به خاطر مزایای زیاد و کاربردهایی که گستره وسیعی از صنایع را در بر می گیرد بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و در سالهای اخیر مطالعات زیادی روی آنها و مشتقاتشان انجام شده است.



شکل ۱ ساختمان شیمیایی کیتوسان

از کاربردهای پلیمرهای کیتینی در صنایع غذایی می توان به نگهداری مواد غذایی و جلوگیری از فساد میکروبی آنها، تولید فیلمها و پوششهایی با قابلیت زیست تخریب پذیری، بازیافت مواد زائد ناشی از فرآوری مواد غذایی، در فرآیند تصفیه آب و شفاف سازی و آب میوه ها اشاره کرد [۴].

کیتوسان به خاطر خاصیت بازدارندگی رشد بسیاری از باکتریهای بیماریزا و قارچها در فیلمهای ضد میکروبی و پوششهای خوراکی مورد استفاده قرار می گیرد. توضیحات مختلفی برای این ویژگی کیتوسان ارائه شده است. تأثیر متقابل مولکولهای پلی کاتیونی کیتوسان با اجزای آنیونی دیواره سلولی میکروارگانیسم باعث تغییراتی در نفوذ پذیری دیواره سلولی می شود. در نتیجه آن بخشی از مواد داخل سلول به بیرون تراوش کرده و از ورود مواد غذایی به داخل آن هم جلوگیری می شود. کیتوسان بعد از ورود به داخل سلول و پیوند با DNA از سنتز RNA به پروتئینهای دیگر جلوگیری می کند.

حدود ۳۰ دقیقه اجازه داده شد تا در دمای 25°C خشک شوند. سپس میوه ها را داخل ظروف شیشه ای در بسته قرار داده و در یخچال با دمای 4°C نگهداری گردید. تمام مراحل بعد از شستشو از جمله پوشش، خشک کردن، تلقیح اسپورهای فارچ و همینطور ظروف نگهداری به صورت استریل و در زیر هود بیولوژیکی انجام شدند.

محلول کیتوسان به این شرح تهیه گردید: ۰ و ۳ و ۵ گرم از کیتوسان را در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل می کنیم، به آن ۵۰ میلی لیتر استیک اسید غلیظ اضافه می کنیم، تا محلول های ۰/۵٪، ۰/۳٪، ۰٪ از کیتوسان بدست آید. pH محلول های بدست آمده را با استفاده از سود ۳ مولار تا ۵/۴ تنظیم می کنیم. بعد از تنظیم pH حجم محلول را به یک لیتر می رسانیم. محلول اسیدی با $\text{pH} = 5/4$ و بدون کیتوسان به عنوان کنترل استفاده شد. غلظت وانیلین در پوششهای وانیلین دار ۱ گرم در لیتر است [۶].

۴-۲- روش های تجزیه شیمیایی

برای اندازه گیری آسکوربیک اسید (ویتامین C)، اسیدیته قابل تیتراسیون و مواد جامد محلول میوه ها را پالپ و سانتریفیوژ و سپس فاز مایع آنها جدا می شدند. اصل عمل اندازه گیری آسکوربیک اسید افزایش متا فسفریک اسید به آب میوه است تا آنزیم آسکوربیک اسیداز غیر فعال شده و درصد ویتامین C با احیا شدن ماده رنگی ۲، ۶- دی کلرو فنل اندو فنل بوسیله محلول اسیدی آسکوربیک اسید تعیین گردد [۷]. مقدار مواد جامد محلول هم با استفاده از دستگاه رفراکتومتر مدل (Erma Tokyo) تعیین شد.

۵-۲- شمارش اسپورها

برای شمارش اسپورها از لام نئوبار استفاده شد. وسط این لام به اندازه ۱/۰ میلی متر از بقیه قسمتها عمیقتر است. هر میلی متر مربع از این قسمت به ۴۰۰ مربع کوچک که سطح هر کدام ۰/۰۰۲۵ میلی متر مربع است تقسیم شده است. برای شمارش اسپورهایی که روی میوه ها رشد کرده اند، میوه ها پالپ شده و کاملاً یکنواخت شدند و از این سوسپانسون روی لام قرار داده شد.

۶-۲- روش کار

ابتدا توت فرنگیهای شسته شده در سه گروه به تعداد مساوی تقسیم شدند. هر کدام از میوه ها به مدت یک دقیقه در محلول

(بوتریسیس سینرا)، پوسیدگی نرم رایزوپوس (رایزوپوس استالینوفر)، پوسیدگی کپکی سیاه (آسپرژیلوس نایجر)، پوسیدگی کپکی سبز (گونه های کلادوسپریوم) اشاره کرد [۵].

۳- روش تحقیق

۳-۱- مواد شیمیایی

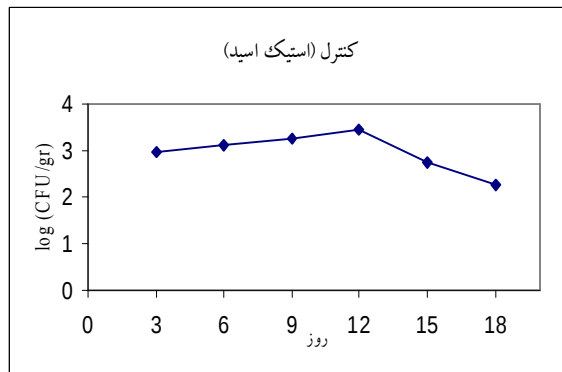
در قسمت روش های تجزیه شیمیایی اشاره شده است. در این پروژه از استیک اسید غلیظ، هیدروکسید سدیم جامد، نمک طعام، ۶، ۲- دی کلرو فنل اندو فنل، اسانس وانیلین و کیتوسان که از شرکت Sigma و محیط کشت IPDA از شرکت Merck آلمان استفاده گردید.

۲-۲- میکروارگانیزم ها

در بیشتر مطالعات انجام گرفته اغلب میکروارگانیزم مشخص و شناخته شده ای را مورد بررسی قرار می دهند، اما در این پروژه از قارچی استفاده شده است که از فساد خود توت فرنگی ها بدست آمده اند. در این پژوهش به ترتیب جداسازی میکروارگانیزم های ناشی از فساد توت فرنگی، تخلیص و جداسازی قارچ عامل فساد میوه، تلقیح قارچهای بدست آمده به توت فرنگیها و در نهایت شمارش اسپورهای قارچ که روی توت فرنگی ها رشد کرده اند انجام گرفته است. برای جداسازی میکروارگانیزم های عامل فساد، میوه های کپک زده را در سرم فیزیولوژیکی ۹ گرم در لیتر قرار می دهیم تا میکروارگانیزم ها وارد سرم شوند. بعد این محیط حاوی میکروارگانیزم ها به محیط کشت جامد PDA منتقل می شوند. از کلنی های تشکیل شده رقت های مختلف تهیه شده و در نهایت میکروارگانیزم ها به صورت خالص جدا می شوند.

۳-۲- آماده سازی میوه و هیه محلول کیتوسان و وانیلین

میوه توت فرنگی بر اساس شکل ظاهری، اندازه و رنگ تا حد ممکن یکسان انتخاب گردید و علاوه بر این نباید صدمه مکانیکی هم دیده باشند. بعد از شستن میوه ها آنها را به سه گروه تقسیم می کنیم. بعد از اینکه میوه ها را به مدت یک دقیقه داخل محلولهای تهیه شده از پوشش ها غوطه ور شدند، در

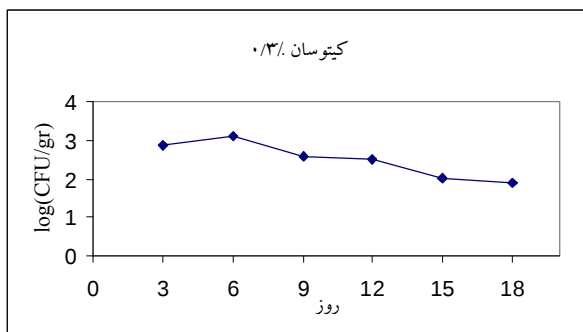


نمودار ۲ روند رشد اسپورها در نمونه‌های کنترل (شسته شده)

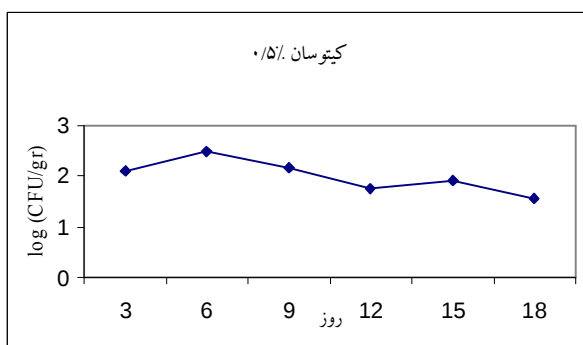
با محلول استیک اسید)

در طول مدت نگهداری، در تمام نمونه‌های کنترل رشد کپکها مشهود بود. در اثر رشد کپکها سطح میوه‌ها با لایه‌ای سفید و ابری شکل پوشیده شدند. همانطور که در دو نمودار شماره ۲ و ۳ مشاهده می‌شوند، تعداد اسپورها در طول ۱۸ روز افزایش یافته است.

در مقایسه با نمونه‌های کنترل در میوه‌های با پوشش کیتوسان تعداد اسپور به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. میوه‌هایی که در آنها کیتوسان به تنهایی استفاده شده رشد قارچ کاملاً متوقف نمی‌شود، ولی همانطور که گفته شد نرخ رشد آن کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد.



نمودار ۳ روند رشد اسپورها در نمونه‌های با پوشش کیتوسان ۰/۳٪



نمودار ۴ روند رشد اسپورها در نمونه‌های با پوشش کیتوسان ۰/۵٪

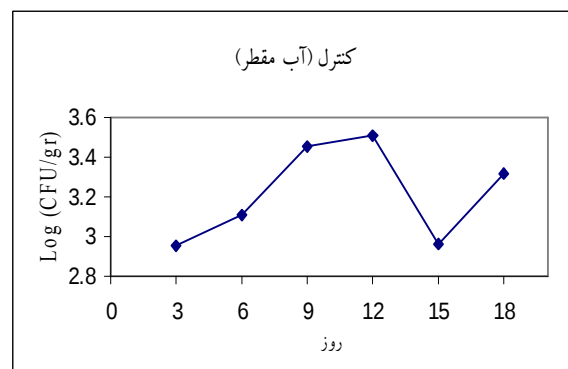
های ۰٪ (کنترل)، ۰/۵٪، ۰/۳٪، کیتوسان، وانیلین+۰/۳٪ کیتوسان، وانیلین+۰/۵٪ کیتوسان قرار داده شد. (جدول ۱). در حدود ۳۰ دقیقه اجازه می‌دهیم که میوه‌ها در دمای ۲۵°C خشک شوند. سپس آنها را داخل ظروف شیشه‌ای در بسته قرار داده و در یخچال با دمای ۴°C نگهداری شدند. علاوه بر محلول اسیدی از میوه‌های شسته شده با آب مقطر هم به عنوان کنترل استفاده شد. هر بار نمونه‌گیری از هر سه گروه انجام شد و میانگین نتایج بدست آمده گزارش شده است.

جدول ۱ ترکیب پوششهای مورد استفاده برای توت فرنگی‌ها

پوشش	درصد کیتوسان	وانیلین (گرم در لیتر)
۱	۰	-
۲	۰/۳	-
۳	۰/۵	-
۴	۰/۳	۱
۵	۰/۵	۱

۳- نتایج و بحث

انواع مختلف محلولهایی که در این پروژه به عنوان پوشش مورد استفاده قرار گرفتند اثر قابل توجهی بر طول عمر نگهداری میوه توت فرنگی داشتند. پوششهایی که استفاده شدند دارای مقادیر مختلفی از کیتوسان بوده و به دو مورد از آنها از اسانس وانیلین به میزان ۱ گرم در لیتر نیز اضافه گردید. در مورد نمونه‌های تلقیح شده بدون هیچ پوششی (کنترل) و نمونه‌هایی که در آنها محلول ۰٪ کیتوسان به عنوان پوشش به کار رفته بود، رشد قارچ روند روبه رشدی داشت. (نتایج بدست آمده میانگین ۳ بار تکرار می‌باشد).



نمودار ۱ روند رشد اسپورها در نمونه‌های کنترل (شسته شده) با آب مقطر)

همانطور که از نمودارها مشهود است، پوشش کیتوسان بر روی توت فرنگی ها رشد قارچ را به شکل قابل توجهی کاهش می دهد. از آنجایی که وانیلین خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی دارد، افزودن وانیلین به محلول این پوشش رشد قارچها را کاملاً متوقف می کند.

علاوه بر شمارش اسپورها مقدار جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون و آسکوربیک اسید [8] ۸ هم بعد از ۷ روز اندازه گیری شد. مقادیر اندازه گرفته شده در جدول ۲ نشان داده شده اند. (روش کار با رفرنس مشخص شده است)

جدول ۲ میزان جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون و آسکوربیک اسید قبل و بعد از استفاده از پوشش های مختلف آسکوربیک اسیدیته قابل جامد محلول نوع پوشش اسید (میلی تیتراسیون (درجه بریکس) گرم در لیتر) (درصد)

	۴/۱	۰/۴۷	۱۵/۰۲
قبل از آزمایش			
بعد از پوشش			
۱	۳/۲	۰/۳۱	۱۱/۵
۲	۳/۳۵	۰/۳۳	۱۳/۲
۳	۳/۶۵	۰/۳۹	۱۳/۹
۴	۳/۸۵	۰/۴۲	۱۴/۶
۵	۳/۹	۰/۴۱	۱۴/۶

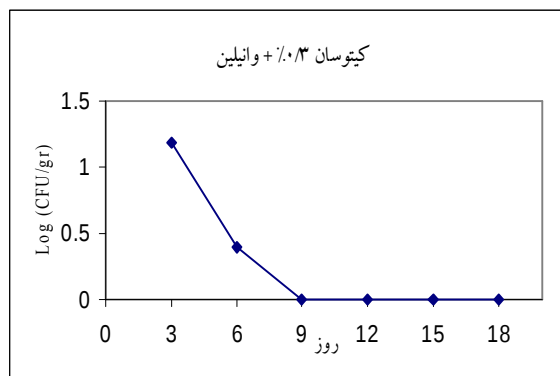
همانطور که در جدول مشاهده می شود، توت فرنگی هایی که پوشش کیتوسان و وانیلین را با هم دارند ماده جامد محلول، اسیدیته قابل تیتراسیون و آسکوربیک اسید بیشتری نسبت به نمونه های دیگر و بخصوص نمونه کنترل دارند. اما میزان مواد جامد محلول در نمونه هایی که پوشش دارند با نمونه کنترل تفاوت چندانی ندارند و تغییرات آن بسیار کند است. اسیدیته قابل تیتراسیون و آسکوربیک اسید نسبت به روز اول و قبل از پوشش کمتر شده، ولی تغییرات آنها بعد از پوشش و گذشت ۷ روز از نگهداری در یخچال چندان قابل ملاحظه نیست.

۴- نتیجه گیری

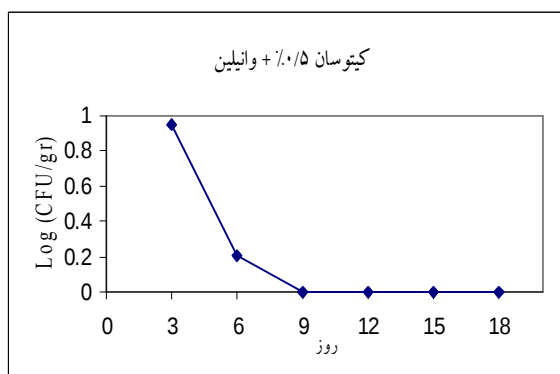
در این پژوهش، اثر ضد میکروبی پوشش کیتوسان بر روی میوه توت فرنگی بررسی شد. ترکیبی از کیتوسان با اسانس وانیلین

همانطور که نمودارها نشان می دهند با افزایش غلظت کیتوسان از ۰/۳٪ به ۰/۵٪ میزان رشد قارچ کاهش می یابد، ولی هنوز کاملاً متوقف نشده است. برای مثال در نمونه های با پوشش کیتوسان ۰/۵٪، در روز ۱۲ تعداد اسپورها (log CFU/gr)، ۱/۷۵ است. اما در نمونه های با پوشش ۰/۳٪ کیتوسان این مقدار ۲/۵۱ است.

در نمونه هایی که در محلول پوشش، علاوه بر کیتوسان از اسانس وانیلین هم استفاده شده نتایج بسیار خوبی بدست آمد. سه روز بعد از تلقیح اسپورهای قارچ برای پوشش ۰/۳٪ کیتوسان، $\log \text{CFU/gr} = 1/19$ و در روز ششم این مقدار به ۰/۳۹ کاهش یافته و در روز نهم صفر است. برای نمونه های با پوشش کیتوسان ۰/۵٪ این مقدار در روز سوم ۰/۹۵ و در روز ششم به ۰/۲۱ کاهش یافته و در نهایت شبیه نمونه های ۰/۳٪ این مقدار به صفر می رسد. نکته مهم در این نمونه ها این است که خصوصیات دیگر نمونه ها مثل رنگ ظاهری آنها برای مدت طولانی تری حفظ می شود.



نمودار ۵ روند رشد اسپورها با پوشش کیتوسان ۰/۳٪ + وانیلین (۱ گرم در لیتر)

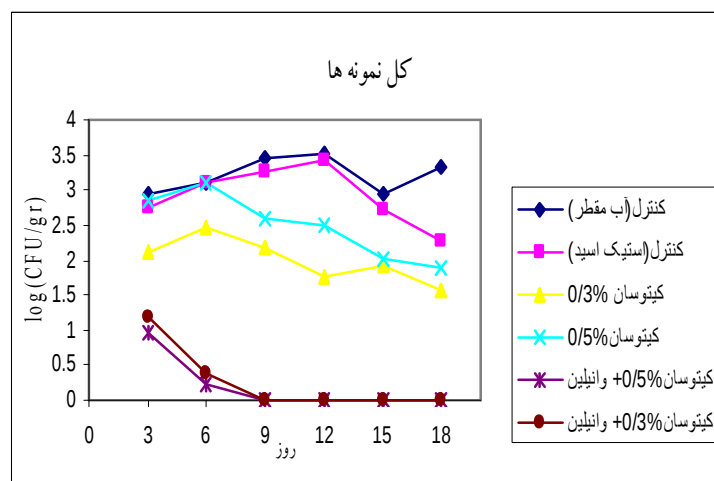


نمودار ۶ روند رشد اسپورها در نمونه های با پوشش کیتوسان ۰/۵٪ + وانیلین (۱ گرم در لیتر)

۵- منابع

- [1] Zivanovic S., J.R., Draughon F.A., "Extention of Fresh Produce Shelf Life With Novel Chitosan coatings", Department of Food Science and Technology, University of Tennessee (2005).
- [2] Rabea Entsar I., Badawy Mohamed E.T., Christian V., Guy Smagghe, Steurbaut Walter. "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action", J Biomacromolecules, 4,1457-1465, (2003).
- [3] Maghsoodi V., "Effect of Vanillin on Germination Time and Radial Growth of Moulds in Apple Pure", 22,153-164, (2003).
- [4] shahidi F., Archchi J.K.Vidana, Jeon You-Jin, "Food Applications of Chitin and Chitosan", Food Science and Technology, 10, 37-71, (1999).
- [5] Chien Po-Jung, Sheu Fuu, Yang Feng-Hsu, "Effects of Edible Chitosan Coating on Quality and Shelf Life of Sliced Mango Fruit", Journal of Food Engineering, 78, 225-229, (2007).
- [6] Chien Po-Jung, Sheu Fuu, Lin Hung-Ren, "Quality Assessment of Low Molecular Weight Chitosan Coating on Sliced Red Pitayas", Journal of Food Engineering, 36, 1-5, (2006).
- [7] Dong Huaqiang, Cheng Liangying, Tan Jiahu, "Effects of Chitosan Coating on Shelf Life of Peeled Litichi Fruit, Journal of Food Engineering", 64, 355-358, (2004).
- [8] Durango A.M. Soares, N.F.F, N.J.Andrade, "Microbial Evaluation of an Edible Antimicrobial Coating on Minimally Processed Carrots", Food Control, 17,336-341,(2006).
- [9] C.Frazier, William, C.Westhoff, Dennis, 1967. Food Microbiology. New York: 208-211

اثر ضد میکروبی کیتوسان را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد و از آنجایی که کیتوسان و وانیلین هردو از ترکیبات خوراکی هستند می توانند جایگزین مناسبی برای پوششهای متداول باشند که از منابع نفتی بدست می آیند. در نمودار ۷ مقایسه این چند نوع پوشش نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود نمونه هایی که در آنها از اسانس وانیلین استفاده شده است نسبت به بقیه نمونه ها مناسب تر بوده و نتیجه دلخواه بست آمده است.



نمودار ۷ مقایسه کلی روند رشد اسپورها در نمونه ها

بر طبق تحقیقات مشابهی که انجام شده توسط Chien et al و Po-Jung and Dong Huaqiang and etal استفاده از کیتوسان رشد انواع میکروارگانیسم ها را کاهش می دهد، اما مشابه با نتایجی که در این پژوهش بدست آمده افزایش درصد کیتوسان از ۰/۳ تا ۰/۵ و یا حتی ۲ تأثیر چندانی در روند رشد میکروارگانیسم ها نداشته است [۹]. اما با افزودن وانیلین به ترکیب محلول کیتوسان رشد و فعالیت آنها کاملاً متوقف می شود.

Chitosan and Vanillin as Preservatives to Prolong the Shelf Life of Strawberry

Maghsoodi V.^{1*}, Razavi, J.², Rajabi, N.³

1- Biochemical and Bioenvironmental Research Centre, Sharif university of technology

2- Chemical Engineering and Petroleum Dep., Sharif university of technology

3- Chemical Engineering and Petroleum Dep., Sharif university of technology

(Received:88/2/12 Accepted:88/8/23)

Strawberry fruit is popular for fresh eating but it has a short shelf and rapidly infected. The consumer demanded to prolong its shelf life. Chitosan is a natural biopolymer which has an antimicrobial effect on fresh fruits and vegetables. Some essential oils also have the antimicrobial activity. The combination of these two agents can be applied in order to prolong the shelf life of fresh fruits and vegetables. In this study 0%, 0.3% and 0.5% of chitosan solutions, 1 mg/l of vanillin + 0.3% of chitosan and 1 mg/l of vanillin + 0.5% of chitosan solutions were used to coat strawberry. Fungi isolated from an infected strawberry fruit, after screening was incubated to the fresh fruit coated with the prepared solutions and kept in refrigerator at 4 °C. The solid soluble materials, ascorbic acid and the titrable acidity were measured before and after the coating. The results showed chitosan plus vanillin can prolong the shelf life of the strawberry up to 18 days at 4 °C.

Key words: Chitosan, Vanillin, Strawberry, Fungus, Shelf life.

* Corresponding Author E-Mail address: maghsoodi@sharif.edu