بررسی ویژگی ضدمیکروبی فیلم خوراکی دولایه ژلاتین - صمغ کُندر دارای اسیدآسکوربیک و اسانس زوفا (*Hyssopus officinalis*) بر زمان ماندگاری فیله شترمرغ در دمای یخچال

مطهره پیرنیا [1]، فریده طباطبایی یزدی [2*]، سید علی مرتضوی [3]، محبت محبی [4]

1- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
2- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
4- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: 98/07/23 تاریخ پذیرش: 98/09/20)

چکیده

گوشت شترمرغ از ارزش خوراکی بالایی برخوردار است و یکی از کم‌چرب‌ترین و سالم‌ترین نمونه‌های گوشت قرمز در دسترس است. به دلیل آلودگی لاشه در طول زنجیره کشتار، طی زمان نگهداری در اثر رشد میکروارگانیسم‌های گوشت فاسد می‌شود. زیست‌تجزیه‌پذیر بودن، خوراکی بودن و کارآمد بودن فیلم‌های خوراکی باعث شده است که این فیلم‌ها به عنوان جایگزین فیلم‌های سنتزی به طور وسیع مورد بررسی قرار گیرند. در این مطالعه فیلم دولایه ژلاتین / کُندر به روش قالب‌ریزی و طی دو مرحله تولید شد. در این پژوهش اثر ضدمیکروبی غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک (صفر، 1و 2 درصد) و اسانس زوفا (صفر، 0/75و 1/5 درصد) در فیلم خوراکی دولایه ژلاتین/ صمغ کُندر (G/F) در شرایط آزمایشگاهی بر 4 میکروراگانیسم و همچنین بر ویژگی‌های میکروبی و شیمیایی گوشت شترمرغ در دمای یخچال (4 درجه سانتی‌گراد) طی 12 روز مورد بررسی قرار گرفت. با تعیین قطر هاله بازداری در روش انتشار دیسک در آگار مشخص شد *Staphylococcus aureus* حساس‌ترین و *Pseudomonas aeroginosa* مقاوم‌ترین باکتری‌ها بودند ($p<0/05$). فیلم‌های خوراکی (G/F+2%AA+1.5%HO و G/F+2%AA+1.5%HO) در مقایسه با نمونه کنترل تعداد بار کل باکتریایی، باکتری‌های سرمادوست و باکتری‌های اسیدلاکتیک را به طور معنی‌داری کاهش دادند. از سویی دیگر با افزودن اسانس و اسید، مقدار پراکسید و pH در مقایسه با فیلم خالص به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/05$). طبق نتایج به دست آمده فیلم G/F حاوی اسانس و اسیدآسکوربیک با کاهش بار میکروبی گوشت شترمرغ، تخریب بافت و افزایش pH را به تعویق انداخت. بنابراین به لحاظ زیست‌محیطی و اقتصادی به عنوان بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر و خوراکی مناسب جهت افزایش زمان ماندگاری گوشت شترمرغ در دمای 4 درجه سانتی‌گراد توصیه می‌شود.

کلید واژگان: فیلم خوراکی دولایه، صمغ گیاه کُندر، اسانس زوفا، فعالیت ضدمیکروبی، فیله شترمرغ

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

1- مقدمه

گوشت شترمرغ نسبت به گوشت دام‌های دیگر دارای مزیت‌های بسیاری می‌باشد، به طوری که به عنوان گوشت قرمز برتر و گوشت قرن بیست‌ویکم معرفی شده است. ویژگی‌های حسی گوشت شترمرغ مانند بافت، آبداری و طعم بسیار شبیه به گوشت گاو و مورد علاقه مصرف‌کنندگان می‌باشد. مصرف گوشت شترمرغ در جهان در حال افزایش است، در نتیجه بهداشت و افزایش ماندگاری گوشت شترمرغ مهم می‌باشد [1]. مدت زمان نگهداری گوشت شترمرغ در دمای یخچال (4 درجه سانتی‌گراد) و بسته‌بندی معمولی 3 روز می‌باشد [2]. اصولا مواد غذایی با منشا حیوانی به عنوان یک منبع تغذیه‌ای بسیار مهم به علت دارا بودن پروتئین بالا و اسیدهای‌آمینه ضروری در رژیم غذایی انسان محسوب می‌شوند. با این حال این منابع به دلیل حساسیت بالا در دوره نگهداری و از جهت استعداد فراوان به فساد میکروبی برای سلامت مصرف کننده می‌توانند مشکل‌ساز باشند [3].

سرد کردن، انجماد، بسته‌بندی اتمسفر اصلاح‌شده و تیمارهای فیزیکی غیرحرارتی از جمله روش‌های قدیمی نگهداری مورد استفاده برای کنترل زمان ماندگاری و ایمنی گوشت تازه هستند [4]. راه حل جایگزین به منظور کاهش رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب در گوشت تازه، کاربرد فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی ضدمیکروبی و بیوپلیمری است [5] بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی نوعی از بسته‌بندی‌های فعال هستند که حاوی مواد با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند [6]. ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی که به طور فراوان در بسته‌بندی‌های فعال استفاده می‌شوند شامل آنزیم‌های ضدمیکروب، اسیدهای آلی، اسانس‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشند. استفاده از اسانس‌ها به عنوان ترکیبات ضدمیکروب طبیعی در برابر مقاومت طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های غذایی توجه زیادی را در صنایع غذایی به خود معطوف نموده است [7]. مهم‌ترین مواد مورد استفاده در تهیه فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی، پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و چربی‌ها می‌باشند که می‌توانند به صورت تک‌لایه از یک یا چند ماده و نیز به صورت چندلایه تهیه شوند [8]. به طور کلی فیلم‌های خوراکی در مقایسه با فیلم‌های مصنوعی از ویژگی‌های مکانیکی و فیزیکی مناسبی برخوردار نیستند و به تنهایی برای بسته‌بندی مواد غذایی مطلوب نمی‌باشند [9]. روش‌های مختلفی از جمله استفاده از فناوری نانو (10)، تولید فیلم کامپوزیتی و دولایه [11] و اسانس‌های روغنی [12] برای بهبود این ضعف‌ها مورد توجه قرار گرفته است. از جمله ترکیبات با منشا گیاهی که قابلیت تشکیل فیلم و پوشش خوراکی را دارد، کُندر یا کندور، یک نوع اولئوگم رزینی معطر است که به نام‌های فرانکینسنس[1] و اولیبانوم[2] نیز شناخته می‌شود که متعلق به جنس بوسولیا[3] از راسته افراها[4] است [13]. این جنس دارای 24 گونه است و عمده‌ترین گونه‌های آن که منبع تولید کُندر هستند شامل *B.carteri* و *B.serrata* است. بخش عمده صمغ کندر از گونه *B.carteri* و بومی چین و شرق آفریقا است. این صمغ به طور گسترده به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی چین، هند و شمال شرق آفریقا جهت درمان بیماری‌های مزمن و حاد و هم‌چنین در درمان بیماری‌های التهابی مانند التهاب روده بزرگ، روماتیسم مفصلی، دیابت استفاده می‌شده است. علاوه بر موارد پزشکی، به صمغ کُندر در متون مذهبی و فرهنگی نیز اشاره شده است و در صنایع آرایشی، عطرسازی، نوشیدنی‌ها و مواد غذایی کاربرد دارد [14]. از مشخصات این گیاهان وجود مجاری ترشحی در آنها است. با شکافی که در تنه درختچه مولد کندر ایجاد می‌کنند شیرابه سفید رنگی که همان صمغ رزینی کندر است خارج می‌شود. این شیرابه در مجاورت هوا به تدریج سفت شده و به صورت قطعات کوچک بدون شکل یا کروی به رنگ سفید، زرد روشن، زرد مایل به قهوه‌ای درمی‌آید [15]. برخی از پژوهش‌هایی که در رابطه با فیلم‌ها و پوشش‌ها صورت گرفته عبارتند از : فیلم خوراکی نشاسته – کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس رزماری [16]، فیلم موسیلاژ به‌دانه حاوی اسانس پونه‌کوهی [17]، فیلم خوراکی بر پایه آلژینات حاوی اسانس برگ‌لیمو [18]، فیلم کیتوزان حاوی اسانس میخک، دارچین و آویشن [19]. همچنین تحقیقات ثابت کرده است که آنتی‌اکسیدان‌های زیادی از جمله اسیدآسکوربیک می‌توانند ویژگی‌های ضدباکتریایی داشته باشند [20]. Zambuchini و همکاران (2008)، خضری احمدآباد و همکاران (1391) اثرات ضدباکتریایی اسیدآسکوربیک را به

1. Frankincense
2. Gum olibanum
3. Boswellia
4. Sapindales

تنهایی و در ترکیب با برخی اسیدهای آلی بررسی کرده‌اند [21 و 22]. اصولا تولید فیلم خوراکی تنها با استفاده از یک نوع پلیمر، ویژگی‌های مطلوبی را در برخی زمینه‌ها از خود نشان می‌دهد ولی در بعضی زمینه‌ها نیز ضعیف خواهد بود. یکی از راه‌های بهبود ویژگی‌های فیلم خوراکی، ترکیب بیوپلیمرها و تولید بیوفیلم‌های مرکب است. هدف از این پژوهش تولید و توسعه فیلم خوراکی فعال دولایه ژلاتین/ کُندر دارای اسانس زوفا و اسیدآسکوربیک (ترکیبات ضدمیکروب و آنتی‌اکسیدان) و بررسی فعالیت ضدمیکروبی آن بر روی سویه‌های عامل فساد گوشت شترمرغ و همچنین ارزیابی این فیلم‌ها جهت افزایش زمان ماندگاری گوشت شترمرغ نگهداری شده در دمای یخچال (4 درجه سانتی‌گراد) می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

گوشت تازه شترمرغ (Struthiocamelus) از کشتارگاه مشهد تهیه شد، صمغ کندر (*Boswellia carteri*) تهیه شده از مناطق جنوبی استان کرمان که در مرکز هرباریوم و گیاه شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تعیین جنس و گونه گردید، اسانس گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis L,*) (شرکت باریج اسانس، کاشان، ایران)، اسیدآسکوربیک، امولسیفایر توئین 80 و گلیسرول و ژلاتین (شرکت مرک، آلمان)، محیط‌کشت‌های میکروبی مختلف (شرکت مرک، آلمان) و میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش که در جدول 1 آورده شده‌اند و از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه گردیدند.

2-2- روش‌ها

2-2-1- آماده‌سازی نمونه گوشت شترمرغ

نمونه‌های فیله شترمرغ به تاریخ کشتار روز (شهریورماه 1397) از کشتارگاه مشهد تهیه و در کیسه‌های پلاستیکی استریل بسته‌بندی شد و فورا به آزمایشگاه میکروب صنعتی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط یخچال‌گذاری منتقل گردید. فیله‌ها به صورت تکه‌هایی با وزن تقریبی 40 گرم تقسیم و پس از شست-وشو با آب فراوان، جهت آبکشی بر روی صافی‌های پلاستیکی قرار داده شدند[23].

2-2-2- تعیین ترکیبات شیمیایی گوشت شترمرغ

ترکیب شیمیایی فیله تازه شترمرغ شامل رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر کل به روش (AOAC Int., Arlington, VA. AOAC) اندازه‌گیری شد [24].

2-2-3- آماده سازی محلول فیلم‌ها

تولید فیلم دولایه ژلاتین/صمغ کندر (G/F) با اندکی تغییر به روش Pereda و همکاران (2011) ، Brink و همکاران (2019)، وجدان و همکاران (1394) تهیه شد. فیلم دولایه (ژلاتین/کُندر) با یک روش پوششی دو مرحله‌ای تهیه شد. این روش شامل تشکیل یک فیلم و پس از خشک شدن آن، محلول پلیمر لایه دوم مستقیما روی لایه از قبل خشک‌شده ریخته می‌شود. در این مورد، فیلم ژلاتین به عنوان جز پایه فیلم دولایه استفاده گردید و محلول فیلم کُندر روی آن ریخته شد. ابتدا 3 گرم پودر ژلاتین در 100 میلی‌لیتر آب مقطر به مدت 30 دقیقه در دمای محیط حل گردید به منظور انحلال بیشتر از دستگاه همزن مغناطیسی به مدت 30 دقیقه در دمای 60-50Ċ استفاده شد. پس از حرارت‌دهی، محلول ژلاتین تا دمای 21±1Ċ سرد و با مقادیر مختلف (صفر،1و2 درصد) اسیدآسکوربیک (AA) مخلوط گردید. همزمان با اضافه‌کردن اسیدآسکوربیک از محلول سود 2 نرمال برای تنظیم pH در حد 8 استفاده شد. در مرحله بعد مقدار 6 گرم صمغ کُندر در 100 میلی‌لیتر آب مقطر تحت دمای 60-55Ċ قرار گرفت و سپس با دور 3000 g به مدت 4-3 دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باقی‌مانده دور انداخته شد. پس از به دست آمدن محلول کاملا شفاف کندر، اسانس زوفا (HO) با مقادیر (صفر، 0/75 و 1/5 درصد) به‌همراه 0/2 درصد حجمی/حجمی توئین 80 به عنوان امولسیفایر به منظور جلوگیری از عدم انحلال اسانس زوفا (HO) اضافه شد. لازم به ذکر است که از گلیسرول به عنوان نرم‌کننده به مقدار 35 درصد وزن خشک پایه تشکیل‌دهنده فیلم در هر دو محلول استفاده گردید [11 ، 25 و 26].

2-2-4- ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی فیلم

فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های خوراکی با اندکی تغییر به روش

انتشار دیسک در آگار[1] بررسی شد [27]. سویه‌های باکتریایی و محیط‌های کشت مورد استفاده در جدول 1 آورده شده است. برای فعال‌سازی باکتری‌ها، ابتدا سوسپانسیون میکروبی به صورت تازه از هر سوش میکروبی تهیه گردید و یک شبانه روز قبل از انجام آزمایش به کمک آنس استریل از کشت مادر به محیط‌کشت شیب‌دار Muller Hinton Agar برای باکتری تلقیح انجام شد. سپس سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر (پس از رشد میکروارگانیسم بر سطح شیب‌دار آگار آن) تهیه گردید. سپس مقداری از سوسپانسیون میکروبی درون لوله استریل درب‌دار حاوی محلول رینگر ریخته و کدورت آن با اسپکتروفوتومتر (طول موج 625 نانومتر) اندازه‌گیری شد. رقت‌سازی محلول سوسپانسیون تا زمان برابرشدن کدورت محلول 0/5 مک‌فارلند و سوسپانسیون میکروبی ادامه یافت [28]. در روش انتشار در آگار، فیلم‌ها به صورت صفحه‌هایی دایره‌ای با قطر 7 میلی‌متر بریده و به محیط‌کشت آگار که از قبل با 10^5-10^6 CFU/ml میکروارگانیسم‌های آزمایش (جدول 1) تلقیح شده بود منتقل شدند، پس از آن پلیت‌های حاوی محیط‌کشت آلوده همراه با فیلم‌های ضدمیکروبی به مدت 24 ساعت در دمای 37Ċ گرمخانه‌گذاری شدند. جهت تعیین میزان ممانعت‌کنندگی فیلم خوراکی از رشد باکتری‌ها، قطر هاله‌های تشکیل‌شده با استفاده از کولیس با دقت 0/01 میلی‌متر اندازه‌گیری شد [27].

Table 1 microorganisms and culture medium of test

Microorganisms	Strains	Culture medium
Psudomonas aeroginosa	ATCC 27853	MHA[2]/BHA[3]
Staphylococus aureus	ATCC 6538	MHA/BHA
Escherichia coli	E.coli O157:H7	MHA/BHA
Bacillus cereus	ATCC11778	MHA/BHA

2-2-5- آزمون‌های میکروبی فیلم دولایه بر فلور میکروبی گوشت شترمرغ

ابتدا گوشت تازه شترمرغ در شرایط استریل به نمونه‌های با وزن 40±0/02 گرم تقسیم و با فیلم‌های آماده شده از قبل کاملا پوشیده شدند. نمونه‌ها در پلیت‌های استریل و به مدت 12 روز در دمای 5+Ċ نگهداری شدند. نمونه کنترل فاقد فیلم بود. شمارش باکتریایی در روزهای 0، 2، 4، 6، 8، 10 و 12 ام انجام گردید. برای آزمایش‌های میکروبی 5 گرم از نمونه گوشت شترمرغ در شرایط استریل با 90 ml محلول نمک طعام 0/85 درصد مخلوط و هموژن شد. سپس رقت‌های موردنیاز تهیه گردید. 1ml از هر رقت برای کشت باکتری‌ها به روش پورپلیت مورد استفاده قرار گرفت. شمارش تعداد باکتری‌های کل و باکتری‌های سرمادوست در محیط PCA[4] به ترتیب در دماهای 37Ċ به مدت 2 روز و 7Ċ به مدت 10 روز با شمارش کلنی‌های موجود انجام گرفت. شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط بی‌هوازی در محیط‌کشت MRS-agar در دمای 30Ċ به مدت 2 تا 3 روز و به روش پورپلیت انجام شد [22 ، 29 و 30].

2-2-6- تاثیر فیلم خوراکی براندیس پراکسید نمونه‌های گوشت

تعیین میزان پراکسید نمونه‌های گوشت شترمرغ مطابق با روش Jouki و همکاران (2014) انجام شد [31].

2-2-7- تاثیر فیلم خوراکی برمیزان pH نمونه‌های گوشت

اندازه‌گیری pH نمونه‌های گوشت شترمرغ طیق روش Sallam و Samehima (2004) انجام شد [32].

2-2-8- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز واریانس نتایج نیز با استفاده از نرم افزار version 24 SPSS صورت گرفت. بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل و در سه تکرار انجام شدند. مقایسه میانگین توسط آزمون دانکن و در سطح اطمینان 95 درصد انجام شد. تمامی آزمایشات در 3 تکرار و به صورت مقدار میانگین با انحراف استاندارد گزارش شدند.

1. Agar Diffusion Method
2. Muller Hinton Agar
3. Brain Heart Infusion Agar
4. Plate Count Agar

3- نتایج و بحث

3-1- نتایج درصد رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی گوشت شترمرغ

ترکیبات تشکیل‌دهنده گوشت شترمرغ توسط روش استاندارد AOAC اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که میزان خاکستر 1، پروتئین 19/8 ، رطوبت 65/30 و چربی 11/33 درصد بود. در سال 2006، Sharaf ترکیب شیمیایی گوشت شترمرغ را با گوشت گاو و مرغ مقایسه کرد (جدول 2). نتایج آنالیزهای او میزان رطوبت را 76/12، پروتئین 21/15، خاکستر 1/08 و چربی درون عضله‌ای را 1/65 گزارش کرد. در حالی که محتوای رطوبت و پروتئین گوشت گاو و گوشت مرغ کمتر از گوشت شترمرغ بود. همچنین به طور قابل‌توجهی میزان چربی درون عضله‌ای گوشت شترمرغ از دو گوشت دیگر کمتر بود. میزان چربی، کلسترول و سدیم کم و اسیدهای چرب چندغیراشباعی زیاد گوشت شترمرغ آن را به عنوان یک محصول ایمن و سالم در کشورهای توسعه یافته که بیماری‌های قلبی عروقی شایع‌اند، تبدیل کرده است [33].

Table 2 Chemical parameters of ostrich meat compared with beef and poultry (Sharaf, 2006)

Components	Ostrich	Beef	Poultry
Humidity	76.12	72.90	74.03
Protein	21.15	21	20.29
Intramuscular Fat	1.65	5.07	4.70
Ash	1.08	1.03	0.98

3-2- فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های ژلاتین-صمغ کُندر روی میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش

اثر بازدارنده 9 فیلم خوراکی ژلاتین- صمغ کُندر حاوی غلظت‌های مختلف اسیدآسکوربیک (صفر، 1 % و 2 %) و اسانس زوفا (صفر، 0/75 % و 1/5 %) به عنوان عوامل ضدمیکروبی بر روی رشد باکتری‌های گرم‌مثبت (*باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) و گرم‌منفی (*سودوموناس ائروژینوزا* و *اشرشیاکلی*) بررسی شد. نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های حاوی اسانس و اسید در جدول 3 ارائه شده است. بیان اثر ضدمیکروبی بر اساس محاسبه قطر هاله تشکیل شده در اطراف فیلم بر حسب میلی‌متر می‌باشد. اگر هیچ ناحیه شفافی در اطراف دیسک‌ها وجود نداشته باشد به این معنی است که هیچ اثر ضدمیکروبی وجود ندارد. در مورد دیسک‌های حاصل از فیلم شاهد (G/F) فعالیت مهارکنندگی در تمامی M.Oها و به طور خاص در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* رویت گردید. که این امر می‌تواند ناشی از فعالیت ضدمیکروبی صمغ کُندر باشد. با افزایش غلظت اسانس زوفا و اسیدآسکوربیک تاثیر مهارکنندگی فیلم به طور شاخصی بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* زیاد شد. که این امر به خصوص در مورد نمونه فیلم حاوی 1/5 % اسانس و 2% اسید بسیار چشمگیر است. نکته دیگر آنست که تاثیر این ترکیبات ضدمیکروبی بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی به مراتب بیشتر است. در یک پژوهش، استفاده از اسانس سیر در فیلم خوراکی در غلظت‌های 0، 0/1، 0/2، 0/3و 0/4 درصد هیچ‌گونه هاله‌ای علیه *اشرشیاکلی* در محیط‌کشت به وجود نیاورد. اما در غلظت‌های 0/2، 0/3 و 0/4 درصد به ترتیب هاله‌ای به قطر برابر 20/13، 40/67 و 46/38 میلی‌مترمربع علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* ایجاد نمود [34]. در آزمون خواص ضدمیکروبی اثر پارامتر اسانس زوفا و اسیدآسکوربیک روی قطر هاله بازداری در سطح $p<0/05$ معنی‌دار شد. به طوری که در فیلم‌ها با افزایش درصد اسانس و اسید به صورت خطی رشد M.Oها مهار شد.

به عنوان مثال در تیمار دارای 2 % اسید و 1/5 % اسانس، قطر هاله بازداری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس ائروژینوزا* برابر با 17/3 میلی‌متر و 13/4 میلی‌متر شد که به ترتیب به عنوان حساس‌ترین و مقاوم‌ترین میکروارگانیسم‌ها در این پژوهش بودند. در ارتباط با موارد فوق، علی‌زاده و همکاران (1396) دریافتند که *استافیلوکوکوس اورئوس* با ناحیه بازداری 49/67 میلی‌مترمربع حساس‌ترین و *سالمونلا تیفی موریوم* با ناحیه بازداری 12/48 میلی‌مترمربع مقاوم‌ترین میکروارگانیسم در برابر فیلم کیتوزان حاوی 2 % اسانس بنه بودند [35].

Table 3 Diameter of inhibition zone created by G/F bilayer film containing different concentrations HO and AA using Disk Diffusion Test

Diameter of inhibition zone (mm)					
Concentration AA (%v/v)	Concentration HO (%v/v)	*B.cereus*	*S.aureus*	*E.coli*	*P.aeroginosa*
0	0	10.2 ± 0.2^{a}	11.3 ± 0.3^{a}	9.8 ± 0.51^{a}	8.4 ± 0.35^{a}
	0.75	11.5 ± 0.1^{b}	13.8 ± 0.3^{b}	10.7 ± 0.2^{b}	10.1 ± 0.4^{b}
	1.5	13 ± 0.71^{c}	15.2 ± 0.5^{c}	11.5 ± 0.8^{c}	11.1 ± 0.2^{c}
1	0	12.1 ± 0.4^{b}	13.2 ± 0.3^{b}	10.2 ± 0.8^{b}	10 ± 0.25^{b}
	0.75	13.8 ± 0.2^{c}	14.6 ± 0.2^{d}	11.5 ± 0.3^{c}	11.2 ± 0.7^{c}
	1.5	15.5 ± 0.3^{d}	16.3 ± 0.5^{e}	13.1 ± 0.7^{d}	12.6 ± 0.2^{d}
2	0	13.5 ± 0.2^{c}	14 ± 0.25^{d}	11.3 ± 0.3^{c}	10.8 ± 0.5^{bc}
	0.75	14.4 ± 0.2^{e}	15.8 ± 0.6^{c}	12.8 ± 0.1^{d}	12 ± 0.6^{dc}
	1.5	16.7 ± 0.3^{f}	17.3 ± 0.1^{f}	14.3 ± 0.5^{e}	13.4 ± 0.1^{e}

Reported values correspond to the mean ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).
AA: Acid Ascorbic, HO: *Hyssopus officinalis* essential Oil

ذکر این نکته ضروریست که با بیشتر شدن غلظت مواد نگهدارنده حسینی و همکاران (1387) فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن و میخک را علیه باکتری‌های گرم‌مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم‌منفی موثرتر دانستند [36]. در مطالعه‌ای دیگر Ahmad و همکاران (2012) تاثیر ضدمیکروبی فیلم ژلاتین ماهی دارای اسانس برگ‌لیمو را بر باکتری‌های گرم‌منفی (*شرشیاکلی* و *سالمونلا تیفی موریوم*) کمتر از باکتری‌های گرم‌مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) گزارش کردند. دلیل این امر حضور غشای خارجی اضافی در باکتری‌های گرم‌منفی اعلام شده است [37]. خاصیت ضدمیکروبی فیلم‌های خوراکی حاوی مواد فعال بیان‌گر اینست که ترکیبات ضدمیکروبی از فیلم به محیط‌کشت مهاجرت و از رشد میکروارگانیسم جلوگیری می‌کنند. در پژوهشی محمدی و همکاران (1385) اثر ضدقارچی اسانس کندر را بررسی و دریافتند که اسانس علیه تمامی ایزوله‌های مقاوم و حساس *کاندیدا آلبیکنس* به فلوکونازول موثر بود[38]. اثر اسانس سه گونه ***Boswellia*** علیه طیفی از باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی توسط Mothana و همکاران (2011) بررسی و آنها برای تمامی اسانس‌ها اثر ضدمیکروبی خصوصا علیه باکتری‌های گرم‌مثبت گزارش کردند [39].

3-3- فعالیت ضدمیکروبی فیلم خوراکی دولایه بر کیفیت میکروبی گوشت شترمرغ

تغییرات میزان بار باکتریایی کل (Total Viable Count) در شکل A-1 نشان داده شده است. میزان اولیه TVC برای نمونه‌های گوشت شترمرغ در روز صفر نگهداری 3/2 log CFU/g بود که طی زمان نگهداری (12 روز) برای همه تیمارها افزایش یافت. به طوری که کمترین میزان بار باکتری کل در روز صفر نگهداری و بیشترین این میزان در روز 12 نگهداری رویت شد. با در نظر گرفتن میزان شمارش کلی باکتری‌ها در محدوده قابل پذیرش گوشت شترمرغ (7 log CFU/g) می‌توان نتیجه گرفت که این میزان در روز 8 نگهداری به همه تیمارها (جز نمونه کنترل و فیلم خالص) تعلق داشت. مطابق با نمودار شکل A-1 ، شمارش کلی میکروب‌ها در نمونه‌های پوشش دهی شده با فیلم‌های دارای غلظت‌های مختلف اسانس و اسیدآسکوربیک به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های دارای فیلم خالص (فاقد مواد فعال) و نمونه کنترل (شاهد) کمتر بود ($p<0.05$). نتایج نشان می‌دهند زمان نگهداری گوشت در یخچال در شمارش کلی میکروبی گوشت تاثیر معنی‌داری دارد به طوری که با گذشت زمان شمارش کلی میکروبی در گوشت فاقد فیلم خوراکی با سرعت زیادی افزایش یافت، اما این روند افزایشی در نمونه‌های پوشش دهی شده با فیلم و به ویژه فیلم‌های حاوی اسانس به طور معنی‌داری کمتر بود (شکلA -1).

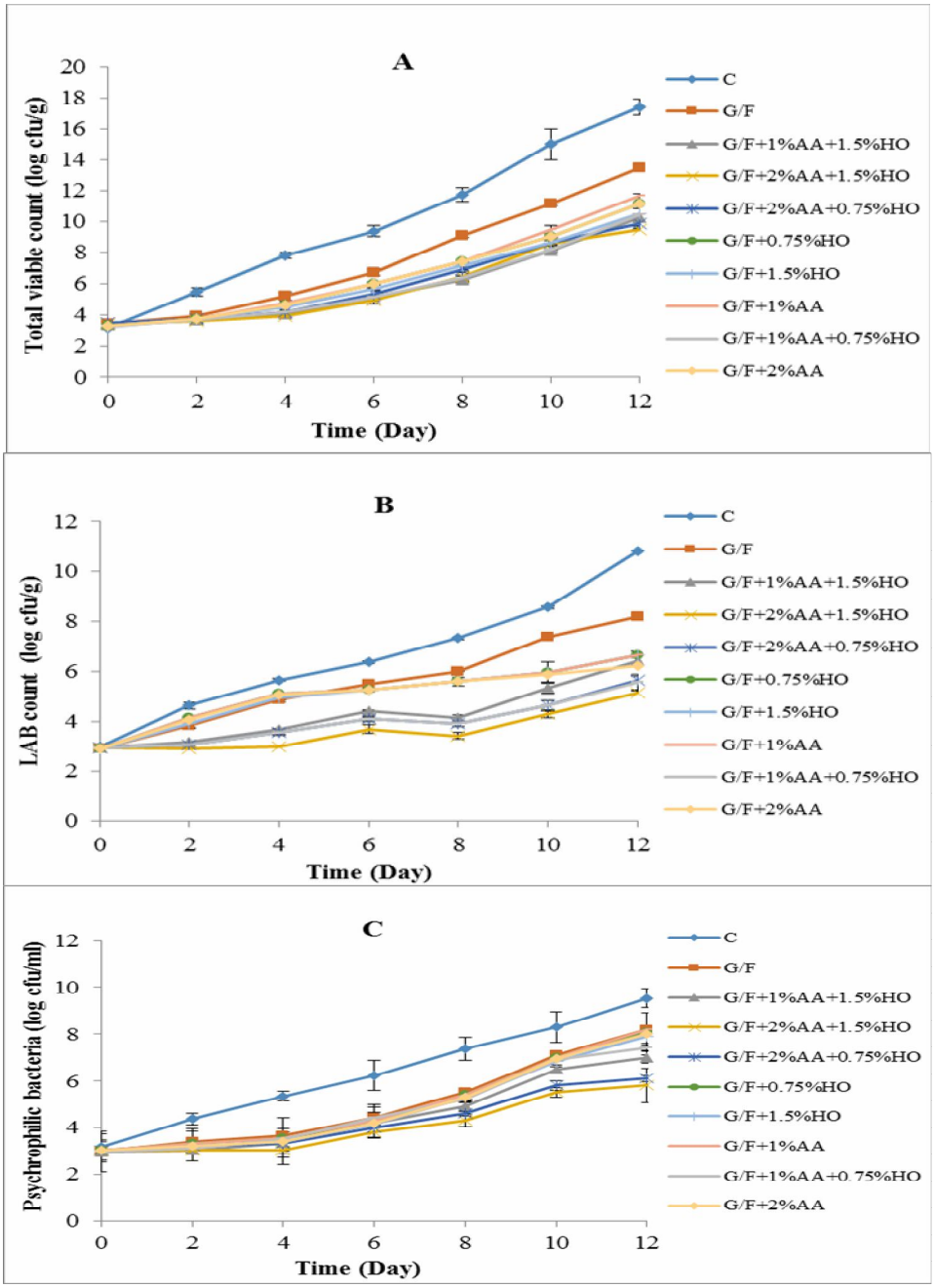

Fig 1 Microbial changes of ostrich fillets with various treatments during the storage at refrigerator
C: control sample (without film) , G/F: pure film

مقادیر مربوط به تغییر جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک گوشت شترمرغ در شکل 1-B نشان داده شده است. تعداد اولیه باکتری‌های اسیدلاکتیک 2/95 log CFU/g بود. این تعداد در تیمار حاوی 1/5 درصد اسانس و 2 درصد اسیدآسکوربیک در پایان دوره نگهداری به 5/17 در حالی که در تیمار شاهد (بدون فیلم) به 10/80 رسید ($p<0/05$). با توجه به قابلیت رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در pH های نسبتا پایین و مقاوم‌تر بودن آنها نسبت به اسیدهای آلی، لذا استفاده همزمان از اسانس زوفا به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی می‌تواند تا حد زیادی مانع از رشد افزایشی این باکتری‌ها گردد.

تغییرات در تعداد باکتری‌های سرمادوست گوشت شترمرغ طی نگهداری در 4 درجه سانتی‌گراد در شکل 1-C آورده شده است.

مقدار شمارش کلی سرمادوست‌ها در طول زمان تغییر کرده است ($p<0/05$). تعداد اولیه باکتری‌های سرمادوست در روز صفر نگهداری تقریبا معادل 3 log CFU/g بود. در نمودار این باکتری‌ها نیز همانند نمودار شمارش کلی و باکتری‌های اسیدلاکتیک شاهد روند افزایشی در همه تیمارها از روز شروع تا پایان نگهداری هستیم. با این تفاوت که روند افزایشی تعداد باکتری‌ها در نمونه کنترل و نمونه دارای فیلم خالص در مقایسه با نمونه‌های پوشش دهی شده با فیلم‌های دارای غلظت‌های مختلف اسانس و اسید با سرعت انجام شد. به طوری که این تعداد در پایان دوره نگهداری (روز 12)9/53 log CFU/g و8/20 log CFU/g به ترتیب برای تیمارهای کنترل و فیلم فاقد اسانس و اسید رسید. در حالی که تعداد باکتری‌های سرمادوست برای تیمار حاوی بالاترین درصد اسید و اسانس در پایان دوره نگهداری5/80 log CFU/g بود. با در نظر گرفتن حد استاندارد (7 log CFU/g) تعداد باکتری‌های سرمادوست تا پایان روز دهم برای همه تیمارها (جز نمونه کنترل) قابل‌قبول بود. به طوری که تعداد باکتری‌های سرمادوست در نمونه کنترل در این روز برابر با 8/3 log CFU/g بود. رشیدی‌مهر و همکاران (1398) نشان دادند با تعداد اولیه (4/4 log CFU/g) باکتری سرمادوست، در پایان نگهداری این تعداد برای نمونه کنترل، نمونه حاوی اسانس زیره و نمونه حاوی اسانس آویشن به ترتیب برابر با 8/79، 8/18 و 8/33 log CFU/g رسید [40].

در پژوهشی Hayouni و همکاران (2008) مشخص شد ترکیبات ترپنی حاوی گروه‌های فنلی اسانس مریم گلی در شرایط آزمایشگاهی، اثرات ضدمیکروبی معنی‌داری علیه گونه‌های *سودوموناس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند. آنها اعلام کردند در بروز ویژگی‌های ضدمیکروبی اسانس‌ها در گوشت و سایر محصولات عواملی همچون دمای نگهداری، نوع بسته‌بندی، میزان اکسیژن، میزان و نوع میکروارگانیسم‌های سطحی و نیز عواملی همچون میزان چربی، پروتئین و شرایط فیزیکوشیمیایی محصول دخالت دارند[41]. آزادسازی تدریجی اسانس و اسیدآسکوربیک از فیلم طی زمان نگهداری گوشت شترمرغ در یخچال عامل اثربخشی ضدمیکروبی فیلم حاوی مواد فعال در مقایسه با فیلم بدون ترکیبات بازدارنده است. با توجه به این که باکتری‌های اسیدلاکتیک قابلیت رشد در pH های نسبتا پایین را دارند و نسبت به اسیدهای آلی مقاوم‌تر هستند می‌توان نتیجه گرفت که کنترل رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در نمودار شمارش LABها تا حدود زیادی مربوط به خاصیت مهارکنندگی اسانس زوفا و صمغ کُندر باشد. عنوان شده است که دلیل مقاوم بودن این باکتری‌ها، وجود مقادیر بالای پتاسیم درون‌سلولی در باکتری‌های گرم‌مثبت است که در مقابل آنیون‌های اسیدها فعالیت تقابلی دارند. شاید بتوان ویژگی ضدباکتریایی اسیدآسکوربیک را به کاهش pH مربوط دانست. این کاهش pH ممکن است سبب افزایش نسبت مولکول‌های بدون بار شده و در نتیجه امکان تماس اسید با دیواره سلولی باکتری را فراهم می‌کند [42].

3-4- تاثیر فیلم خوراکی بر تغییرات pH گوشت

تغییرات مقدار pH نمونه‌های گوشت شترمرغ نگهداری‌شده در 5Ċ در شکل 2 نشان‌داده شده است. در مورد تیمارهای حاوی غلظت‌های بالای اسید و اسانس (G/F+2%AA+1.5%HO و G/F+2%AA+0.75%HO) در روزهای اولیه نگهداری، pH ابتدا کمی کاهش پیدا کرد و با گذشت زمان ثابت ماند. اما مقدار pH در کلیه تیمارها با گذشت زمان نگهداری افزایش یافت که این افزایش در مورد نمونه کنترل با سرعت بیشتری صورت گرفت. در گوشت با گذشت زمان، بافت توسط فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌های گوشت تخریب می‌شود. که در نتیجه آن با تجزیه ترکیبات پروتئینی و تولید ترکیبات ازته همراه است که این ترکیبات باعث افزایش pH گوشت می‌شوند. عدم افزایش pH در روزهای ابتدایی نگهداری را می‌توان به حلالیت CO_2 در فاز آبی عضلات گوشت و در نتیجه تشکیل اسیدکربنیک نسبت داد. هم‌چنین افزایش CO_2 اتمسفر نیز می‌تواند علت کاهش pH در شروع دوره نگهداری باشد [43]. همانطور که قبلا بیان شد افزایش pH بعد از این دوره را در هر کدام از تیمارها را می‌توان به فعالیت آنزیمی باکتری‌ها و آنزیم‌های درونی ارتباط داد. در طول دوره نگهداری، تیمار کنترل همواره دارای مقادیر pH بالاتر نسبت به سایر تیمارها بود ($p<0/05$). به طوری که در پایان روز 12 این مقدار برای تیمار شاهد 6/85 و برای تیمار با بالاترین غلظت اسانس و اسید 5/85 بود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج سایر محققان مشابهت داشت، به این ترتیب که در مطالعه‌ی خضری احمدآباد و همکاران (1391) و Lu و همکاران (2009) نیز ابتدا یک کاهش اولیه در pH و سپس افزایش آن در طول دوره نگهداری مشاهده گردید [22 و 44].

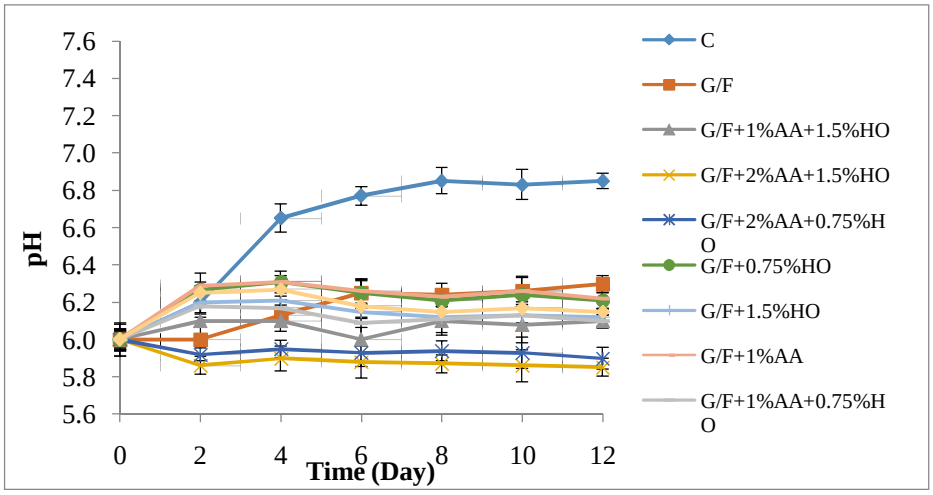

Fig 2 pH changes of ostrich fillets during storage at refrigerator

3-5- تاثیر فیلم خوراکی بر تغییرات عدد پراکسید گوشت شترمرغ

اکسیداسیون اولیه چربی‌ها با اندازه‌گیری عدد پراکسید[9] قابل اندازه‌گیری است. تغییرات عدد پراکسید گوشت شترمرغ در گروه‌های بدون فیلم و پوشش‌دهی شده با فیلم فاقد و حاوی اسیدآسکوربیک و اسانس زوفا در شکل 3 آورده شده است. میزان اولیه عدد پراکسید گوشت شترمرغ 0/05± 1/05 میلی‌اکی‌والان پراکسید در کیلوگرم نمونه گوشت شترمرغ بود. میزان عدد پراکسید در روز اول نگهداری در تمامی نمونه‌های آزمایش تقریبا ثابت بود ($p>0.05$). در پایان دوره نگهداری (روز 12)، میزان عدد پراکسید در نمونه گوشت پوشش‌دهی شده با فیلم خالص معادل با 5/20 میلی‌اکی‌والان پراکسید بود که دارای اختلاف معنی‌دار با نمونه کنترل بود ($p<0.05$). که نشان دهنده عملکرد مناسب فیلم در ممانعت از انتقال اکسیژن به بافت گوشت و همچنین وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان در لایه صمغ کُندر است که از اکسیداسیون جلوگیری می‌نمایند. نتایج همچنین نشان داد اختلاف معنی‌داری در مقدار عدد پراکسید گوشت‌های پوشش‌دهی شده با فیلم‌های حاوی غلظت‌های بالاتر اسانس و اسیدآسکوربیک در مقایسه با گوشت‌های پوشش‌دهی شده با فیلم‌های دارای غلظت‌های پایین‌تر وجود دارد ($p<0.05$). نتایج نشان داد عدد پراکسید در نمونه شاهد در فاصله زمانی 8 تا 10 روز مقدار اندکی کاهش یافت. شاید علت این موضوع را بتوان شکسته‌شدن هیدروپراکسیدها یا واکنش آن‌ها با پروتئین‌های موجود در سطح گوشت نسبت داد که با یافته‌های علیزاده بهبهانی و همکاران (2017) مطابقت داشت [45].

داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک و وجود ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی موثر در اسانس زوفا و صمغ کندر عوامل موثری در جلوگیری از افزایش عدد پراکسید به شمار می‌روند. به طوری که با بیشتر شدن درصد اسانس و اسید در فیلم‌های خوراکی، درصد تغییر عدد پراکسید نمونه‌های گوشت شترمرغ کمتر می‌گردد. نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده از پژوهش Jouki و همکاران (2014) که گزارش کردند فیلم موسیلاژ به‌دانه دارای اسانس پونه‌کوهی بیشترین اثر را در کاهش سرعت اکسیداسیون در مراحل اولیه نگهداری فیله‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد، همسو بود [17]. Ojagh و همکاران (2010) نیز نشان دادند که فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس دارچین در جلوگیری از پیشرفت اکسیداسیون چربی ماهی در مراحل اول موثر بودند [46].

لازم به ذکر است خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک به واسطه حذف رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش فعالیت اکسیداسیون چربی‌ها در مطالعات متعددی بررسی شده است [22].

[9] Peroxide value

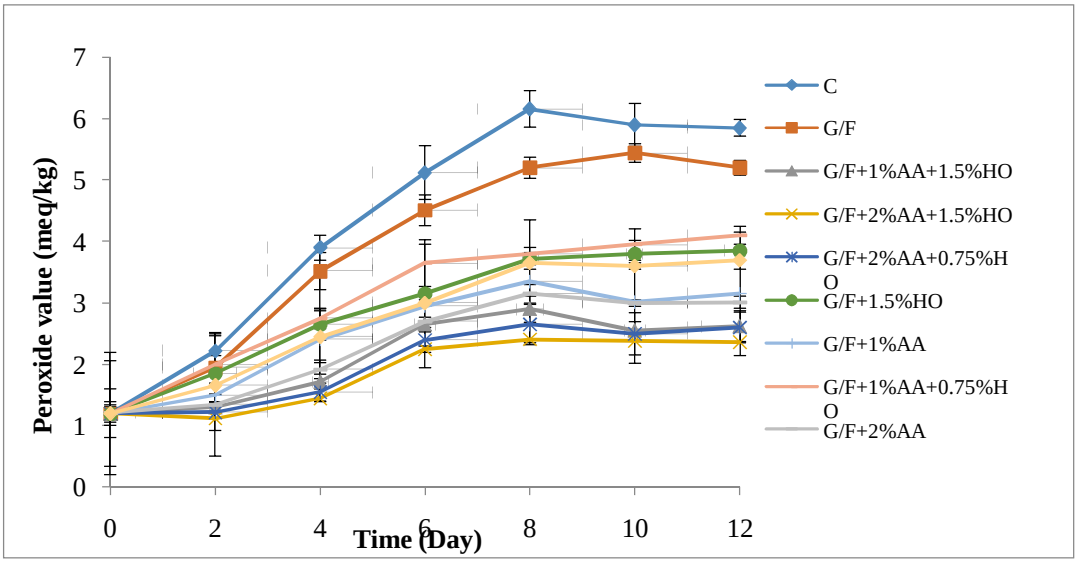

Fig 3 Peroxide value changes of ostrich fillets during storage at refrigerator

4- نتیجه گیری کلی

به طور کلی نتایج اندازه‌گیری بار میکروبی کل، سرمادوست و باکتری‌های اسیدلاکتیک گوشت شترمرغ نشان داد بین تیمار شاهد با تیمار فیلم خالص تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). این موضوع با نتایج به دست آمده در جدول 3 که نشان داد فیلم خالص ژلاتین/کُندر بدون اسید و اسانس دارای فعالیت ضدمیکروبی روی تمامی میکروارگانیسم‌ها است، مطابقت دارد. تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از فیلم دولایه ضدمیکروبی زیست‌تخریب‌پذیر ژلاتین/ صمغ کُندر حاوی اسیدآسکوربیک و اسانس زوفا قادر است رشد باکتری‌های موجود در گوشت شترمرغ را طی نگهداری در 4 درجه سانتی‌گراد به تعویق بیندازد و زمان ماندگاری گوشت را با در نظر گرفتن پارامترهای میکروبی و شیمیایی مورد نظر، 6-8 روز افزایش دهد. در مجموع می‌توان گفت فیلم ضدمیکروبی حاوی اسانس زوفا و اسیدآسکوربیک، پتانسیل خوبی در کاهش بار میکروبی گوشت داشت و با کنترل افزایش مقدار پراکسید و pH قادر است تخریب بافت گوشت شترمرغ را طی نگهداری در یخچال به تعویق بیندازد.

5-سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم مهندس شهناز افشاریان و سرکار خانم مهندس فرشته فلاح که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود. مقاله علمی – پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه مقطع دکتری با عنوان فیلم ضدمیکروبی- خوراکی دولایه بر پایه ژلاتین- صمغ کندر (*Boswellia carteri*) در ترکیب با اسیدآسکوربیک و اسانس زوفا (*Hyssopus officinalis L*) جهت افزایش زمان ماندگاری فیله شترمرغ در دمای یخچال با کد 47102 در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

6- منابع

[1] Seydim, A. C., Acton, J. C., Hall, M. A., and Dawson, P. L. (2006). Effects of packaging atmospheres on shelf lifequality of ground ostrich meat. Meat Science, 73(3),503-510

[2] Iran IoSaIRo. Fresh red meat-Specifications 2008. 1: [Available from: http:// www.isiri.org/portal /files/std/9717.pdf

[3] Bazargani-gilani B, Aliakbarlu J, Tajik H.

osteoarthritis with a herbomineral formulation: a double- blind ,placebo-controlled, crossover study. *J .Ethnopharmacol*. 33: 91 – 9.

[14] Hosain, N.A., Ghosh, R., Bryant, D.L., Arivett, B.A., Farone, A.L. and Kline, P.C., 2019. Isolation, structure elucidation, and immunostimulatory activity of polysaccharide fractions from Boswellia carterii frankincense resin. International journal of biological macromolecules, 133, pp.76-85.

[15] Ghasemidehkordi N. 2002. Iranian herbal pharmacopoeia. First edition. Ministry of health and medical education Tehran. Pp: 647-54

[16] Mohsenabadi, N., Rajaei, A., Tabatabaei, M. and Mohsenifar, A., 2018. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. International journal of biological macromolecules, 112, pp.148-155.

[17] Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A. and Koocheki, A., 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids, 36, pp.9-19.

[18] Natalia, R., Herrera, M.L., Matiacevich, S. 2017. Active films based on alginate containing lemongrass essential oil encapsulated: effect of process and storage conditions. Journal of food and Bioproducts Processing, Accepted Manuscript.

[19] 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.

[20] Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 21(9): 1199-218.

[21] Zambuchini, B, Fiorini D, Verdenelli MC, Orpianesi C, Ballini R. 2008. Inhibition of microbiological activity during sole (Solea solea L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. LWT – Food Science and 2015. Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with Zataria multiflora Boiss essential oil on the shelf life of chicken meat during refrigerated storage. Innov Food Sci Emerg Technol . 29:280-7

[4] Davidson, P. M. Chemical preservatives and naturally antimicrobial compounds, in: L.R. Beuchat, T.J. Montville, M.P Doyle (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington DC, 2001, pp. 593-628

[5] Lacroix, M., Cooksey, M. Edible films and coatings from animal origin proteins, in: J.H. Han (Eds.), Innovations in Food Packaging, Academic Press, London, 2005, pp. 301-317.

[6] Appendini, P. and Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. Innov. Food Sci. Emerg. 3, 113-126.

[7] Burt, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review, International Journal of food microbiology, 94(3), 223-253.

[8] Rivero, S., Garcia, M.A., Pinotti, A. 2009. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. Food engineering, 90(4):531-539

[9] Gómez-Guillen, M. C., M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez, and P. Montero. 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. Trends in Food Science and Technology, 20: 3-16.

[10]. Azeredo, H. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. Food Research International, 42(9), 1240-1253.

[11] Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A. and Martucci, J. F. 2011. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. Food Hydrocolloids, 25(5): 1372-1381.

[12] Gómez-Estaca, J., López de Lacey., A, Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M. and Montero, P. 2009. Antimicrobial activity of composite edible films based on fish gelatin and chitosan incorporated with clove essential oil. Journal of Aquatic Food Product Technology, 18(1-2): 46-52.

[13] Kulkarni RR, Patki PS, Jog VP, Gandage SG and Patwardhan B. 1991. Treatment of

Maté, J.I., 2014. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. Food Control, 36(1), pp.69-75.

[31] Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extention of refrigerated rainbow trout fillets. International Journal of Food Microbiology, 174:88-97

[32] Sallam, K.I., Samejima, K. 2004. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. LWT-Food Science and technology, 37(8):865-871

[33] Sharaf, A.M. 2006. Chemical characteristics of ostrich meat in comparison with beef and chicken meats. Egypt Journal of Appl. Science.Vol 1,pp:569-580

[34] Pranoto, Y., V .M. Salokhe and S .K., Rakshit .2005 .Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil .Food Research International, 38: 267-272.

[35] Alizadeh, V., Barzegar, H., Nasehi, B. and Samavati, V., 2017. Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing Pistacia atlantica gum essence. Journal of Iranian food science and technology, 13(4): 584-593, [Persian]

[36] Hosseini, S. M. H., Razavi, S.H., Mousavi, S.M.A (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. Journal of Food Processing and Preservation. 33. 727 - 743. [Persian[

[37] Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, Agustini TW. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food Hydrocoll , 28:189-99

[38] Mohammadi, R., Yadgari, M., Moatar, F. And Shams, M., 2006. Antifungal activity of boswellia serrata essential oil against fluconazole-resistant and susceptible isolates of candida albicans. Journal of isfahan university medical science, 24(82): 30-36,

Technology, 41: 1733-8.

[22] Ahmadabad, M.K., Rezaei, M. and Ojagh, M., 2012. The effect of ascorbic acid combined with whey protein coating on the shelf-life of rainbow trout stored at refrigerator temperature: microbial and chemical analyzes. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 7(3), pp.69-78.[Persian]

[23] Behbahani, B.A. and Fooladi, A.A.I., 2018. Shirazi balangu (Lallemantia royleana) seed mucilage: chemical composition, molecular weight, biological activity and its evaluation as edible coating on beefs. *International journal of biological macromolecules*, *114*, pp.882-889.

[24] AOAC (1995): Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed., P. cunniff, Arlington, Virginia. USA.

[25] Brink, I., Šipailienė, A. and Leskauskaitė, D., 2019. Antimicrobial properties of chitosan and whey protein films applied on fresh cut turkey pieces. International journal of biological macromolecules, 130, pp.810-817.

[26] Vejdan, A., Ojagh, S. M., Adeli, A., Abdollahi, M. 2015. Preparation and characterization of the physical and mechanical properties of agar/fish gelatin bilayer films for food packaging. Journal of Fisheries Science and Technology. 4(3):133-147. [Persian]

[27] 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.

[28] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi1 F, Shahidi, F., Mortazavi, S.A., Mohebbi, M. 2017. Investigation of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Tarragon (Artemisia dracunculus) Essential Oil on Some Pathogenic Bacteria In Vitro. Qom University Medical Science Journal, 11(9):42-51, [Persian]

[29] Lillard HS. 1988. Comparison of sampling methods and implications for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. J Food Prot, 51: 405-408.

[30] Fernández-Pan, I., Carrión-Granda, X. and

characteristics of beef patties during refrigerated storage. J Agric Food Chem . 49: 919-25.

[43] Kostaki M, Giatrakou V, Savvaidis IN, Kontominas MG. 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets. Food Microbiol 26: 475-482

[44] Lu F, Liu D, Ye X, Wei Y, 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 Sci Food Agric; 89: 848-54.

[45] Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Mohebbi, M. 2017. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International journal of biological macromolecules*, *94*, pp.515-526.

[46] Ojagh, S.M., Rezaei, M, Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H., 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry; 120:193-198.

[persian]

[39] Mothana, R.A., Hasson, S.S., Schultze, W., Mowitz, A. and Lindequist, U., 2011. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. Food chemistry, 126(3), pp.1149-1154.

[40] Rashidimehr, A., Fazlara, A., Zarei, M., Pourmehdi, M., Noshad, M. 2019. Evaluation of thyme (*Zataria Multiflora* Boiss) and cumin (*Cuminum cyminum)* essential oils effects on the shelf life of optimized burgers with surimi. Journal of food science and technology, 90(16): 187-200

[41] Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H and et al. 2008. Tunisian Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella inoculated in minced beef meat. International Journal of Food Microbiology, 125: 242–251.

[42] Giroux M, Ouattara B, Yefsah R, Smoragiewicz W, Saucier L, Lacroix M. 2001. Combined effect of ascorbic acid and gamma irradiation on microbial and sensorial

Survey of antimicrobial gelatin-frankincense (*Boswellia carteri*) bilayer edible film incorporated with ascorbic acid and *Hyssopus officinalis* essential oil on ostrich fillets shelf life at refrigerator temperature

Pirnia, M. [1], Tabatabaee Yazdi, F. [2*] , Mortazavi , S. A. [3], Mohebbi, M. [4]

1. Phd Student of Food Microbiology, Department Of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad-Iran
2. Professor in Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran
3. Professor in Food Science and technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran
4. Professor in Food Science and technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran

(Received: 2019/10/15 Accepted:2019/12/11)

Ostrich fillets is highly edible and one of most healthy and the least fat red meat samples. Due to carcass contamination along the slaughter chain, it becomes corrupted by the growth of meat microorganisms during storage. Being biodegradable, edible and efficient have caused edible films to be widely investigated and used as a good replacement for synthetic materials in packaging of food products. In this study a gelatin/frankincense (G/F) bilayer film was produced from gelatin and frankincense monolayers using the casting method in two phases. This research investigated antimicrobial activity of various concentrations of acid ascorbic (0, 1% and 2%) and *Hyssopus officinalis* oil (0, 0.75% and 1.5%) in edible bilayer gelatin/frankincense against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeroginosa*. on the other hand, effect of edible film was evaluated on microbial and chemical properties of ostrich meat for 12 day at refrigerator temperature. Diameter of inhibition zone showed that *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeroginosa* were most sensitive and resistant bacteria respectively. Compared with control sample, two treatments (G/F+2%AA+0.75%HO and G/F+2%AA+1.5%HO) decreased total viable count, psychrophilic and lactic acid bacteria significantly ($p<0.05$). The result also showed with addition *Hyssop* oil and ascorbic acid, pH and peroxide values notably reduced compared with pure edible film (without oil and acid)(($p<0.05$). The gelatin/frankincense films enriched with essential oil and vitamin C delayed tissue breakdown, and increases the pH by reducing the bacterial growth. Therefore, antimicrobial edible film containing *Hyssop* oil and vitamin C as an economical and biodegradable coating has a good potential for increasing the shelf-life of ostrich meat at the refrigerator (4Ċ) temperature.

Keywords: Bi-layer edible film, Frankincense (*Boswellia carteri*), *Hyssopus officinalis* essential oil, Antimicrobial activity, Ostrich fillets

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir