**مجله علوم و صنایع غذایی ایران**

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

**مقاله علمی_پژوهشی**

# بررسی اثرآنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و فیلم خوراکی کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه (*Buniumpersicum*) و عصاره گیاه ملیس (*Melissaofficinalis*L.) علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت شتر

**مهدی ابراهیمیان[۱]، محمد محسن زاده[۲*]**

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

۲ - استاد گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

**کلمات کلیدی:**

*لیستریامونوسیتوژنز*،

کیتوزان،

نانوامولسیون،

اسانس زیره سیاه،

عصاره ملیس،

گوشت شتر.

DOI: 10.22034/FSCT.19.133.249

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.21.6

* مسئول مکاتبات:

mohsenzadeh@um.ac.ir

**چکیده**

این مطالعه با هدف بررسی اثرضد میکروبیو آنتی اکسیدانی فیلم کیتوزان حاوی نانوامولیسیون عصاره گیاه ملیس و اسانس زیره سیاه علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت شتر انجام گردید. فیلم‌های مورد مطالعه با استفاده از کیتوزان ۲٪ و غلظت های ۲/۵٪ و ۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره ملیس تهیه شدند. اثرات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی قطعات گوشت شتر پوشش داده شده در طول ۱٦ روز نگهداری در دمای ٤ درجه سانتیگراد با فاصله زمانی ٤ روزه (۰،٤،۸،۱۲،۱٦) مورد ارزیابی قرار گرفت. قطعات پوشش داده شده مورد ارزیابی شیمیایی قرار گرفتند. بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده زیره سیاه شامل کومین آلدهید (۲٤/۳۷ ٪)، گاما ترپینن (۱۹/۹۹ ٪) و پارا سایمن (۹/۷۱ ٪) بود. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره ملیس و زیره سیاه علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* به ترتیب ۱٪ و ۰/۲۵ ٪ تعیین گردید. نتایج ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم ها به روش **DPPH** نشان داد که افزودن اسانس و عصاره باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم ها می گردد. در بررسی اثر ضدمیکروبی فیلم ها به روش انتشار از دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد (۰/۱٦ ± ۱۷/۱۵) مربوط به فیلم کیتوزان حاوی ۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره ملیس بود. میانگین شمارش تعداد باکتری در تیمار کنترل در طول دوره ۱٦ روزه از سایر تیمار های مورد مطالعه بالاتر بود. نتایج **TBARS** بیانگر خواص آنتی اکسیدانی بیشتر در فیلم های حاوی اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس نسبت به نمونه کنترل بود. میزان **pH** در نمونه های پوشش داده شده با فیلم کیتوزان حاوی۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره ملیس نسبت به بقیه نمونه ها پایین تر بود. در مجموع فیلم‌های تهیه شده دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی خوبی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده که با افزودن ترکیبات گیاهی افزایش پیدامی کند.

## ۱-مقدمه

گوشت و فرآورده های گوشتی به عنوان یکی از مهمترین منابع غذایی انسان به شمار می روند[۱]. گوشت شتر نوعی گوشت قرمز بوده که دارایچربی و کلسترول پایینی می باشد[۲]. ترکیب گوشت شتر بستگی به نژاد، سن، جنس و موقعیت جغرافیایی دارد. گوشت شتر نسبت به گوشت سایر دام های اهلی دارای رطوبت بالاتری می باشد[۳]. در میان ترکیبات مواد غذایی گوشت بدلیل میزان بالای پروتیین، رطوبت و ترکیبات مغذی محیط بسیار مناسبی برای رشد مکروارگانیسم های مولد فساد و بیماریزا است [٤و٥]. تمام اقداماتی که از گذشته تا به امروز صورت گرفته است، در جهت حفظ گوشت و فرآورده های آن از هرگونه فساد و آلودگی می باشد.

یکی از روش های حفظ ماده غذایی، استفاده از نگهدارنده های شیمایی می باشد. اما به دلیل اثرات زیان آور این ترکیبات بر سلامتی انسان ها، توجه تولید کنندگان مواد غذایی به استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی از جمله اسانس ها و عصاره های گیاهی معطوف شده است[٦].

یکی دیگر از راه های افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی استفاده از پوشش ها وبسته بندی های مناسب می باشد. مواد پلاستیکی تهیه شده از ترکیبات نفتی سالیان زیادی است که در بسته بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد[۷]. اما امروزه بدلیل مشکلات مختلف بهداشتی، استفاده از پوشش ها و فیلم های خوراکی زیست تخریب پذیر و مفید مورد توجه تولیدکنندگان قرار گرفته است [۸].

فیلم ها و پوشش های خوراکی نه تنها می توانند توسط مصرف کننده خورده شوند بلکه از ماده غذایی در برابر رطوبت، گرد و غبار، اکسیژن و هرترکیب مضر دیگر محافظت کنند. فیلم ها و پوشش های خوراکی می توانند پروتیینی، پلی ساکاریدی، لیپیدی و مشتقاتی از این ترکیبات باشند. فیلم ها و پوشش های خوراکی برحسب فرمولاسیون و مواد بکار رفته در تشکیل آنها می توانند زیست تخریب پذیر و یا خوراکی باشند[۹و۱۰].

کیتوزان پلی ساکاریدی دارای بار مثبت می باشد که توسط دی استیلاسیون قلیایی کیتین تولید می شود. این ترکیب غیر آلرژن و زیست تخریب پذیر بوده و علاوه بر اینکه دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی می باشد از دست دادن رطوبت ماده غذایی را نیز به تاخیر می اندازد[۱۱و۱۲]. کیتوزان بدلیل دارابودن گروه های آمینی با بار مثبت دارای خاصیت ضدمیکروبی می باشد به طوریکه با غشا سلولی میکروارگانیسم ها واکنش داده و موجب اختلال در غشا سلولی می شوند[۱۳].

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله اسانس‌های گیاهی در ترکیب فیلم ها و پوشش‌های خوراکی موجب افزایش خواص نگهدارندگی آنها شده و امروزه نظر محققین زیادی را به خود جلب کرده است. تحقیقات زیادی در رابطه با فیلم کیتوزان و استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی با منشا حیوانی، گیاهی با هدف افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدقارچی صورت گرفته است[١٤].

زیره سیاه (*Buniumpersicum*)، متعلق به خانواده Apiaceae می باشد. گیاهی دارویی است و بصورت بومی در جنوب شرق ایران یافت می شود. از این گیاه در طب سنتی دررفع گرفتگی عضله، افزایش اشتها، خلط آوری، افزایش تولید شیرو در صنعت غذا به عنوان طعم دهنده استفاده می کنند[۱۵].

گیاه ملیس (بادرنجبویه) بانامعلمی*Melissaofficinalis*از راسته Lamiales و از خانواده Labiatae (نعناعیان) است. گیاهی معطر، علفی و چندساله که ارتفاع آن به۱۰۰سانتی متر رسیده و خواستگاه آن جنوب اروپا، مدیترانه و بعضی نقاط آذربایجان و شمال ایران میباشد. این گیاه بوی لیمو دارد به همین دلیل به آن *Lemon balm* نیز گفته می شود. درطب سنتی از این گیاه جهت درمان بدخوابی، بیماری های سیستم عصبی، درد دندان، فشار خون بالا و سردرد استفاده می شود [١٦]. از اسانس و عصاره ملیس بهعنوان یک عامل ضدباکتری، ضدقارچ، داروی مسکن و داروی درمان بیماری آلزایمر استفاده می شود[۱۷].

مطالعات اخیر خصوصیات فیزیکی بهتر نانوامولسیون های حاوی اسانس ها را در مقایسه با امولسیون معمولی آنها نشان داده است[۱۸]. علاوه براین، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری در نانوامولسیون های حاوی اسانس های گیاهی مشاهده شده است[۱۹]. از نانوامولسیون هایبر پایه پلی ساکاریدها مانند آلژینات و اسانس ها بعنوان ماده ضدمیکروبی برای تشکیل فیلمهای خوراکی استفاده میشود که میتواند نسل جدیدی از بسته بندیهای خوراکی محسوب شود[۲۰].

باکتری *لیستریامونوسیتوژنز*، گرم مثبت و کاتالاز مثبت بوده که بیماری لیستریوزیس که از بیماریهای مهم قابل انتقال بین انسان و حیوان می باشد را ایجاد می کند و از طریق خوردن محصولات غذایی آلوده به بدن انسان وارد می شود. به دلیل سرماگرا بودن

در دمای یخچال قابلیت رشد دارد و به آسانی می تواند در مواد غذایی که در یخچال نگهداری می شوند رشد کند[۲۱].
این تحقیق با هدف تولید فیلم خوراکی کیتوزان حاوی نانومولسیوناسانسزیره سیاه و عصاره ملیس و بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی فیلمها روی *لیستریا مونوسیتوژنز* به عنوان باکتری بیماریزای غذازاد انجام گردید.

## ۲-مواد و روش ها

### ۲-۱-آماده سازی باکتری مورد مطالعه

باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز*(ATCC 7644) از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و مطابق مریخی و همکاران (۱۳۹۷) جهت تلقیح آماده گردید[۲۲].بدین منظور با استفاده از آنس استریل از سویه رفرانس برداشته و بر روی پلست های حاوی محیط آگار BHI کشت داده شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری شدند. سپس از باکتری های مورد نظر، سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند (میزان جذب نوری برابر با ۰/۱ – ۰/۰۸ در طول موج ٦۰۰ نانومتر) تهیه گردید. جهت اطمینان، سوسپانسیون تهیه شده رقت سازی و شمارش بر روی محیط BHIآگار انجام شد.

### ۲-۲-تهیه و آنالیز اسانس زیره سیاه

۲۰۰ گرم از بذرگیاه زیره سیاه (*Buniumpersicum*) پس از جمع آوری از استان کرمان، توسط دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب اسانس گیری شد و توسط سولفات سدیم بی آب خشک گردید[۲۳]. آنالیز اسانس توسط دستگاه GC-MS انجام گردید. دستگاه گاز کروماتوگراف ( Agilent HP-6890 Palo Agilenttechnologies, Alto, CA,USA) با ستون موئینه HP-5MS، طول ستون ۳۰ متر ، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر متصل به یک طیف سنج جرمی (Agilent AHP-5973) انجام شد. سرعت جریان هلیوم ۱ میلی لیتر در دقیقه بود. دمای آون در ابتدا ۵۰ درجه سانتی گراد بود سپس در هر دقیقه ۲ درجه سانتی گراد افزایش یافت تا به دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد رسید، بمدت ۳ دقیقه در این دمای نگه داشته شد و در پایان دما تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. طیف سنج جرمی نیز با انژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت انجام شد[٢٤].

### ۲-۳-تهیه عصاره ملیس و خشک کردن عصاره آبی به روش فریز درایر

اندام های هوایی گیاه ملیس (*Melissaofficinalis*) پس از تهیه از عرضه کنندگان گیاه دارویی در شهرستان مشهد تمیز شده و در سایه خشک شدند و توسط آسیاب پودر شده و تا زمان استفاده در شرایط مناسب نگه داری شدند. جهت تهیه عصاره آبی ملیس، به هر گرم از پودر، ۱۰ سی سی آب مقطر جوشیده شده اضافه گردید و ۱۵ دقیقه عمل جوشیدن انجام گرفت. عصاره بدست آمده با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی صاف گردید سپس با دستگاه فریز درایر(Christ, Osterode, Germany) خشک شد. به این ترتیب که عصاره روی صفحات استیل ریخته شده و خشک کردن انجمادیدر دمای ۷۰- درجه ی سانتیگراد به مدت حداقل ٦ ساعت صورت گرفت. هنگامی که انجماد در دمای کمتر از ۷۰- درجه سانتیگراد صورت گیرد بلور های یخ بسیار ریز در محصول ایجاد می گردد که مانع از خسارت بافتی در زمان انجماد و تصعید خواهد شد. پس ازانجماد کامل نمونه ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرمتوزین شدند. در حین خشک شدن امکان مشاهده ی کاهش وزن وجود داشت. تصعید نمونه ها با گرم شدن تدریجی محیط درون اتاقک خلا انجام شد.شرایط خلاء بالا سبب تصعید بلور های درون نمونه شد. بیشتر آب موجود در نمونه در مدت زمان ۳۳ ساعت خارج گردید که سبب سهولت نگه داری محصول بدست آمده در شرایط محیط شد.

### ۲-٤-تهیه نانومولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس

جهت تهیه نانومولسیون اسانس زیره سیاه (BPNE) و نانومولسیون عصاره ملیس(MONE) از روش مقیمی و همکاران (۲۰۱٦) با اندکی تغییرات استفاده شد[۲۵]. به این ترتیب که برای تهیه ی نانومولسیون زیره سیاه (۱۰٪) ، ۱۰٪ وزنی/ وزنی اسانس زیره ی سیاه و ۵ ٪ وزنی/ وزنی توین ۸۰ و ۸۵ ٪ وزنی/ وزنی آب مقطر دیونیزه و جهت تهیه ی نانومولسیون عصاره ی ملیس (٤٪) ٤ ٪ وزنی/ وزنی پودر عصاره، ۲ ٪ وزنی/ وزنی توین ۸۰ و ۹٤ ٪ وزنی/ وزنی آب مقطر دیونیزه مخلوط گردیدند. محلول های اسانس زیره ی سیاه

و عصاره ی ملیس هریک به طور جداگانه تحت اولتراتوراکس (3 min at 3000 rpm) و اولتراسونیک پروب دار (50 °C, pulse; 45s and rest; 15s) به مدت ۱۵ دقیقه قرارگرفتند و اندازه ی ذرات توسط پراکندگی نور (DLS) اندازه گیری شد.

## ۲-۵-تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) نانوانولسیون های اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی نانو امولسیون های اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس از روش میکرودایلوشن براث استفاده شد. سوسپانسیون نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) از باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* تهیه شد، سپس تا رسیدن باکتری ها به میزان $۱۰^{۶}$ CFU/ml رقیق گردید. غلظت های مختلفی از نانوامولسیون اسانس زیره سیاه، از غلظت ۰/۰۳۱٪ تا ۱٪ و غلظت های مختلفی از نانوامولسیون عصاره ملیس، از غلظت ۰/۱۲۵٪ تا ٤ ٪ تهیه شد. جهت تعیین MIC در هر چاهک ۱٦۰ میکرولیتر BHI براث،۲۰ میکرولیتر نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس و ۲۰ میکرولیتر از باکتری ریخته شد. تمام آزمایشات در۳ تکرار انجام شد. برای هر تکرار یک چاهک به عنوان کنترل منفی (بدون افزودن باکتری) و یکی دیگر به عنوان کنترل مثبت(بدون افزودن اسانس و عصاره) در نظر گرفته شد. پلیت ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از طی این مدت چاهک ها از نظر کدورت مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند و حداقل غلظت مهار کننده از رشد (MIC) به روش چشمی و مشاهده کدورت تعیین گردید.

برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) باکتری از چاهک هایی که کدورتی مشاهده نشد بر روی محیط BHI آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه گذاری بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، کمترین غلظتی که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی(MBC) در نظر گرفته شد.

## ۲-٦-تهیه فیلم های مورد مطالعه

جهت تهیه ی فیلم کیتوزان ۲ ٪، ۲ گرم پودر کیتوزان (سیگما آلدریچ) در ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ۱ ٪ اسید استیک(مرک، آلمان) حل شد. گلیسرول (مرک، آلمان) به نسبت ۳۰٪ وزنی/ وزنی کیتوزان به محلول اضافه گردید[۲٦]. فیلم‌های ضد میکروبی، از ترکیب کردن مقادیر متفاوت نانوامولسیون اسانس زیره سیاه(غلظت ۲/۵٪ و۵٪) و نانوامولسیون عصاره ملیس (٤ ٪) در محلول بهینه فیلم کیتوزان ۲ ٪ تهیه شد. از هموژنایزر (۱۲۰۰۰rpm و ۵ دقیقه) به منظور اختلاط اسانس در محلول ها استفاده شد. خشک کردن محلول آماده شده در مدت زمان ٤۸ ساعت در دمای محیط ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵۰٪ با روش پهن کردن(casting) روی قالب‌های تفلونی انجام شد.

## ۲-۷-ارزیابی خواص ضدمیکروبی فیلم های خوراکی تهیه شده به روش انتشار دیسک

جهت ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم های خوراکی تهیه شده بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* از روش انتشار دیسک(Agar diffusion method) استفاده شد. به این منظور سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند با استفاده از روش کدورت سنجی تهیه شد و ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون برروی پلیت حاوی مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس فیلم های تهیه شده به شکل دیسک های ٦ میلی متری بریده شدند و در مرکز پلیت ها قرار داده شدند[۲۷]. بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون و ایجاد هاله ی عدم رشد،قطر هاله عدم رشداندازه گیری شد.

## ۲-۸-ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم ها ی خوراکی تهیه شده

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد در فیلم‌ها با استفاده از ۲و ۲ دی فنیل، ۱ پیکریل هیدرازیل [1](DPPH)، بر اساس رنگ بری محلول DPPH متانولی قرمز یا بنفش رنگ بعنوان واکنش‌گر تعیین شد. در این روش ۲۵ میلی‌گرم از نمونه فیلم در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد و سپس ۰/۱ میلی لیتر از فیلم با ۳/۹ میلی لیتر محلول DPPH متانولی (۰/۱ میلی مولار) ترکیب شد و محلول به دست آمده به مدت یک ساعت در تاریک خانه قرار گرفت. پس از این زمان جذب محلول‌ها در مقابل جذب متانول خالص در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر بر اساس معادله زیر اندازه گیری شد.

= فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (٪)

۱۰۰× (جذب بلانک/ جذب نمونه-جذب بلانک)

1. 2,2 Diphenyl 1—picrylhydrazyl

## ۲-۹-آماده سازی نمونه های گوشت شتر

نمونه های گوشت شتراز بازار خریداری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از جدا کردن چربی ها به قطعات یکسان برای تلقیح باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* تقسیم شدند. ابتدا بوسیله آب بطور کامل شستشو داده شدند تا ضایعات آن برطرف گردد.

## ۲-۱۰-تلقیح باکتری به گوشت شتر

قطعات ۲۵ گرمی گوشت شتر ۱۵ دقیقه در الکل ۷۰ درجه استریل شدند. جهت پاکسازی الکل از سطح گوشت، قطعات گوشت با آب مقطر استریل شستشو داده شد و از روی شعله عبور داده شدند. بعد از خشک شدن آب سطحی، قطعات درون زیپ پک های کوچک استریل قرار داده شدند. به هر قطعه $10^5$CFU/gاز باکتری مورد نظر تلقیح گردید. درمرحله بعد قطعات به مدت ۳۰ دقیقه زیر هود میکروبیولوژی خشک شدند. برای هرتیمار ۳ قطعه گوشت در نظر گرفته شد.

## ۲-۱۱-پوشش دهی قطعات گوشت شتر جهت ارزیابی میکروبی

قطعات گوشت جهت پوشش دهی به ۷ گروه مساوی تقسیم شدند (جدول ۱). گروه اول بعنوان گروه کنترل کهفاقد هرگونه پوشش دهی بود. گروه دوم پوشش داده شده با فیلم کیتوزان ۲ ٪، گروه سوم پوشش داده شده با فیلم کیتوزان ۲ ٪ حاوی ۲/۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه، گروه چهارم پوشش داده شده با فیلم کیتوزان ۲ ٪ حاوی ۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه، گروه پنجم پوشش داده شده با فیلم کیتوزان ۲ ٪ حاوی ٤٪ نانوامولسیون اسانس عصاره ملیس، گروه ششم پوشش داده شده با فیلم کیتوزان ۲ ٪ حاوی ۲/۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ نانوامولسیون عصاره ملیس و گروه هفتم که با فیلم کیتوزان ۲ ٪ حاوی ۵٪ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ نانوامولسیون عصاره ملیس پوشش دهی شد.سپس تیمارها جهت ارزیابی میکروبی در روزهای ۰، ٤، ۸ ، ۱۲ و۱٦ درطول دوره نگهداری در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**Table 1** List of treatments in the present study.

| NO | Treatment | Description |
|---|---|---|
| 1 | Con | Samples without any coating solution |
| 2 | CH | Samples coated with Chitosan solution |
| 3 | CH+BPNE1 | Samples coated with Chitosan solution containing 2.5% BPEO |
| 4 | CH+BPNE2 | Samples coated with Chitosan solution containing 5% BPEO |
| 5 | CH+MONE | Samples coated with Chitosan solution containing 4% MOE |
| 6 | CH+BPNE1+MONE | Samples coated with Chitosan solution containing 2.5% BPEO and 4% MOE |
| 7 | CH+BPNE2+MONE | Samples coated with Chitosan solution containing 5% BPEO and 4% MOE |

## ۲-۱۲-آنالیز میکروبی نمونه ها

برای شمارش *لیستریامونوسیتوژنز* ۲۵ گرم از نمونه گوشت شتر در شرایط استریل با ۲۲۵ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱٪ مخلوط و هموژن شد و متعاقب آن رقت های مورد نظر تهیه شد. ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت بر روی سطح محیط کشت اختصاصی آگار کشت داده شد. جهت شمارش باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* از محیط کشت اختصاصی پالکام آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. بعد از کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت گرم خانه گذاری گردید.

## ۲-۱۳- اندازه گیری تیوباربیتوریک اسید (TBARS)

اندازه گیری TBARSبصورت میلی گرم مالون دی الدئید در کیلوگرم گوشت شتر بیان گردید. ۱۰ گرم از نمونه با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط حاصل به ارلن تقطیر انتقال داده شد. ۲/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ٤ نرمال به همراه مواد ضد کف و ضد جوش به مخلوط، اضافه و ارلن مایر به دستگاه تقطیر وصل شد. مخلوط حرارت داده شد و ۵۰ میلی لیتر از ماده تقطیر شده پس از زمان جوش از مخلوط جمع آوری شد. ۵ میلی لیتر از ماده تقطیر شده و ۵ میلی لیتر معرف TBARS (۱۰ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال ۹۰ ٪ و ۰/۲۸۸۳ گرم پودر TBARS) به لوله های در دار منتقل و پس از تکان دادن کامل به مدت ۳۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. همزمان تمامی مراحل برای شاهد تکرار شد. نمونه ها پس از اینکه ۳۵ دقیقه در حرارت جوش قرار داشتند به مدت ۱۰ دقیقه سرد شده و دانسیته نوری در سل های ۱ سانتی متری در مقابل شاهد در طول

موج ۵۳۸ نانومتر خوانده شد.

TBA ( میلی گرم مالون آلدئید در کیلوگرم) = دانسیته نوری × ۷/۸

## ۲-۱٤-اندازه گیری pH

۱۰ گرم از نمونه به همراه ۹۰ میلی لیتر آب مقطر هموژن گردید و توسط pHمتر دیجیتال میزان pHنمونه اندازه گیری شد.

## ۲-۱۵-تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش جهت آنالیز نتایج از نرم افزارSPSS16 استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام گردید. مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون ANOVA انجام شد.در تمامی ارزیابی ها $p<0/05$به عنوان حد معنی داری در نظر گرفته شد.

# ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱-ترکیبات شیمیایی اسانس زیره سیاه

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی بررسی گردید و ۲۵ ترکیب در اسانس زیره سیاه شناسایی شد که ترکیبات تشکیل دهنده اسانس در جدول ۲ آمده است. در این جدول فراوانی مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و زمان جداسازی این ترکیبات مشخص گردیده است.

**Table 1** Composition of *Buniumpersicum*essential oil.

| RT | Concentration (%) | Constituents | NO |
|---|---|---|---|
| 8.24 | 0.28 | β-Thujene | 1 |
| 8.38 | 0.26 | Cyclohexane, (1-methylethylidene)- | 2 |
| 9.16 | 0.18 | Camphene | 3 |
| 10.07 | 0.49 | β-Phellandrene | 4 |
| 10.28 | 5.28 | β-Pinene | 5 |
| 10.73 | 0.52 | β-Myrcene | 6 |
| 11.46 | 1.32 | α-Phellandrene | 7 |
| 11.91 | 0.14 | α-Terpinene | 8 |
| **12.33** | **9.71** | **p-Cymene** | **9** |
| 12.49 | 6.29 | D-Limonene | 10 |
| 12.62 | 0.48 | Eucalyptol | 11 |
| 12.75 | 0.10 | trans-β-Ocimene | 12 |
| **13.84** | **19.99** | **γ-Terpinene** | **13** |
| 14.98 | 0.50 | Terpinolene | 14 |
| 19.49 | 0.31 | 4-Terpineol | 15 |
| 19.76 | 0.13 | Dill ether | 16 |
| 20.20 | 0.14 | α-Terpineol | 17 |
| 20.37 | 0.24 | Estragole | 18 |
| **22.62** | **24.37** | **Cuminaldehyde** | **19** |
| 24.07 | 0.18 | Phellandral | 20 |
| 24.56 | 8.75 | Carbamodithioic acid, formyl-, methyl ester | 21 |
| **24.82** | **18.96** | **1,4-p-Menthadien-7-al** | **22** |
| 30.07 | 0.16 | Caryophyllene | 23 |
| 34.47 | 0.12 | Myristicine | 24 |
| 59.57 | 0.98 | Heptasiloxane, hexadecamethyl- | 25 |
| | 99.88 | Total | |

ترکیباتاصلیتشکیل دهنده اسانسعبارتنداز: کومین آلدهید (۲٤/۳۷ ٪) ، آلفا ترپینن (۱۹/۹۹ ٪)، ۱-٤- پارامتان دی ان -۷- ال (۱۸/۹٦ ٪)) و پارا سایمن(۹/۷۱ ٪). نتایج مطالعه حاضر با اختلاف اندک با مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر مطابقت دارد. این اختلاف در ترکیبات شیمیایی و میزان ماده موثره آنها می تواند تحت شرایطی از قبیل منطقه جغرافیایی، مکان رشد، سن، قسمت مورد استفاده گیاه و نحوه اسانس گیری تغییر کند.

کیخسروی و همکاران (۲۰۲۰)، کومن آلدهید(۳۸/۳۹٪)، پارا سایمن (۵/۲۳٪) و گاما ترپینن (٤/٤٤٪) را بعنوان بیشترین ترکیبات اسانس زیره سیاه بیان کردند[۲۸]. طالبی و همکاران (۲۰۱۷) بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زیره سیاه را پروپانال ۲-متیل – ۳- فنیل (۳٤/۰۸ ٪)، سایمن (۱۸/۲۳ ٪) و میرتنال (۱۲/۳۷ ٪) گزارش کردند[۲۹]. عروج علیان و همکاران (۲۰۱۰)، گاماترپینن (٤٤/۲ ٪)، کومین آلدهید (۱۹/٦ ٪) و گاما ترپینن-۷-ال (۱۰/۵ ٪) را بعنوان بیشترین ترکیبات اسانس زیره سیاه معرفی کردند[۳۰]. حقیر السادات و همکاران(۱۳۹۳)، بیشترین ترکیبات اسانس زیره سیاه را گاماترپینین (۲۱/۸٦٪)، کومن آلدهید(۱۷/۲۸٪) و پارا سیمن(٦/۲۱٪) بیان کردند[۳۱].

## ۳-۲-MIC و MBCنانوامولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس

نتایج حداقل غظلت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج ارزیابی MIC و MBC نانوامولسیون اسانس زیره سیاه علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* به ترتیب ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ گزارش گردید. کیخسروی و همکاران (۲۰۲۰) حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس زیره سیاه را به روش میکروبراث دایلوشن علیه تعدادی از سویه های *سالمونلاانتریتیدیس* و *لیستریامونوسیتوژنز* بررسی کردند، حداقل غلظت مهارکنندگی نانو امولسیون اسانس زیره سیاه علیه *سالمونلا انتریتیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* به ترتیب ۲mg/ml و ۱ mg/ml حداقل غلظت کشندگی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه علیه *سالمونلاانتریتیدیس* و *لیستریامونوسیتوژنز* به ترتیب ٤mg/ml و ۲mg/ml گزارش گردید [۲۸]. در مطالعه عروج علیان و همکاران (۲۰۱۰)، حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زیره سیاه علیه چندین پاتوژن غذایی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکولی*O157:H7، *سالمونلا انتریتیدیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* در دامنه ۰/۰۳-۰/۰۵ mg/ml گزارش گردید و نتایج بیانگر خاصیت ضد میکروبی اسانس زیره سیاه علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بود که با نتایج حاضر در مطالعه مطابقت دارد [۳۰].

نتایج ارزیابی MIC وMBC نانوامولسیون عصاره ملیس علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* به ترتیب ۱٪ و ۲٪ گزارش گردید. مطالعه ای در رابطه با خاصیت ضدمیکروبی نانوامولسیون عصاره ملیس و بطور کلی عصاره این گیاه تاکنون صورت نگرفته است. اما تعدادی مقالات بر خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی این گیاه دلالت دارد. کمالی و همکاران (۲۰۱۵) اثر ضدمیکروبی عصاره الکلی ملیس را علیه باکتری *باسیلوس سرئوس* به روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه دارای اثرضدمیکروبی خوبی علیه باکتری *باسیلوسسرئوس* می باشد[۳۲].

**Table 3** MIC and MBC of *Buniumpersicum*nanoemulsions(BPN) and *Melissaofficinalis*L. extract (MOE) against *Listeriamonocytogenes* by microdilution broth method.

| Nanoemulsion | MIC (%) | MBC(%) |
|---|---|---|
| *Buniumpersicum* | 0.25 | 0.50 |
| *Melissaofficinalis*L. | 1 | 2 |

## ۳-۳-فعالیت ضدمیکروبی فیلم های تهیه شده به روش انتشار از دیسک

اثر ضد میکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس زیره سیاه و عصاره گیاه ملیس در برابر دو گونه باکتریایی ناشی از مواد غذایی با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد آزمایش قرار گرفت. همانطور که نتایج نشان می دهد فیلم کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه ۵ ٪ و عصاره ملیس ٤ ٪ بیشترین اثر ضد میکروبی را برروی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و کمترین اثر ضد باکتریایی را فیلم کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه ۲/۵٪ داشتند که احتمالا به دلیل مقادیر بالای گاما ترپنین و کومین آلدهید می باشد ( جدول ۲). همچنین از کیتوزان خالی نیز

به عنوان کنترل استفاده شد که کمترین اثر ضدباکتریایی را نسبت به زمانی که حاوی اسانس و عصاره بود نشان داد. اسانس و عصاره در برابر باکتریهای گرم مثبت موثرتر از باکتریهای گرم منفی بودند. که علت این امر تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است؛ اما دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتید وگلیکان حاوی پلی ساکاریدهای مختلف، پروتئینها و لیپیدها میباشد. همچنین دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی دارای غشاء خارجی است که سطح خارجی دیواره را میپوشاند. مجموعه این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتریهای گرم منفی نسبت به باکتریهای گرم مثبت میشود. با افزایش غلظت اسانس اثر بازدارندگی افزایش یافت. در مقالات مختلف غلظتهای متفاوتی از اسانسها به کاربرده شده است که علت آن جنس گیاه، روش تهیه اسانس، غلظت ترکیبات موثر درون اسانس و همچنین نوع ماده تشکیل دهنده فیلم میباشند[۳۳].

**Table 4** Antibacterial activity of chitosan films containing BPNEand MONE against *Listeriamonocytogenes* by the agar well diffiusion assay

| *Listeria monocytogenes* | Treatment |
|---|---|
| $11.30\pm0.17^{g}$ | CH |
| $13.46\pm0.18^{f}$ | CH+BPNE1 |
| $15.66\pm0.18^{e}$ | CH+BPNE2 |
| $14.30\pm0.15^{d}$ | CH+MONE |
| $16.47\pm0.14^{c}$ | CH+BPNE1+MONE |
| $17.15\pm0.16^{b}$ | CH+BPNE+MONE |
| $30.19\pm0.14^{a}$ | GM |

Different letters indicate a statistically significant difference ($p < .05$).

همانگونه که ذکر شد کیتوزان دارای خاصیت ضدمیکروبی است[۳٤]. با وجودیکه در زیر سطح فیلمها هیچ رشدی مشاهده نگردید، اما فیلمهای کنترل (فاقد اسانس) هاله کمی نشان دادند. علت این پدیده آن است که ماهیت ضدمیکروبی کیتوزان یک ویژگی ذاتی است که به علت وجود گروههای آمینی با بار مثبت میباشد لذا اثر ضدمیکروبی بدون مهاجرت ماده فعال رخ داده و تنها از رشد باکتریهایی که در تماس با سطح فیلم بودند، جلوگیری گردید[۱۳].

در مطالعه‌ای که توسط سلیمانی و همکاران (۱۳۸۹) انجام پذیرفت، نتایج نشان داد که بیشترین میزان هاله عدم رشد باکتری‌ها مربوط به *باسیلوسسرئوس* با قطر ٤٥ میلیمتر، *باسیلوس سوبتیلیس* ۲۱ میلیمتر، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۲۰ میلیمتر، *شیگلافلکسنری* ۱۸ میلیمتر، *اشریشیاکلی* ۱٦ میلیمتر و *سالمونلاتیفیموریوم* ۸ میلیمتر، بود. آنها اعلام کردند که دلیل اصلی خواص ضد باکتریایی اسانس زیره، حضور کومین آلدئید در آن است[۳۵].

طی یک بررسی کمالی و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که عصاره الکی ملیس اثر ضدباکتریایی بر روی *باسیلوسسرئوس* دارد و بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد در این مطالعه ۱۲میلیمتر بود[۳۲].

## ۳-٤-ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم ها

افزودن اسانس و عصاره به محلول DPPH باعث کاهش سریع جذب در ۵۱۷ نانومتر شد. درجه تغییر رنگ بیانگر ظرفیت دفع رادیکال اسانس و عصاره است. رادیکالهای آزاد باعث اتوکسیداسیون چربیهای غیر اشباع در مواد غذایی میشوند. بر اساس نتایج آزمون آنتی اکسیدانی که در شکل ۱ نشان داده شده است، با افزایش میزان اسانس زیره سیاه فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم خوراکی افزایش یافت به طوری که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به فیلم کیتوزان حاوی ۵٪ اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره گیاه ملیس بود. کمترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی مربوط به فیلم کیتوزان حاوی ۲/۵٪ اسانس زیره سیاه بود همچنین از کیتوزان خالی نیز به عنوان کنترل استفاده شد که نسبت به کیتوزان حاوی اسانس و عصاره کمترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی را داشت. مطالعات بسیاری در زمینه خواص آنتی اکسیدانی اسانس زیره سیاه انجام شده است که همگی حاکی از اثرات آنتی اکسیدانی بالا و قابلیت دفع رادیکالهای آزاد برای این گیاهان است[۳٦ و۳۷]

در مطالعه‌ی پریرا و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی مهار رادیکال آزاد DPPH درعصاره های آبی و الکیگیاه ملیس دریافتند که عصاره اتانولی قدرت مهار رادیکال آزاد بیشتری دارد. آنها دریافتند که در میان ترکیبات خالص، کورستین بالاترین فعالیت

آنتی اکسیدانی را دارا میباشد نتایج این محققین با نتایج پژوهش حاضرهمخوانی دارد[۳۸].

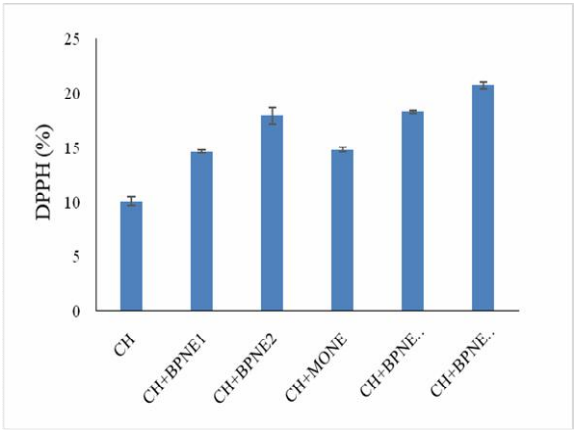


**Fig 1** Antioxidant activity of chitosan films containing BPNE and MONE.

## ۳-۵-ارزیابی خواص ضدمیکروبی نمونه های پوشش داده شده با فیلم های مورد مطالعه علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

اثرات ضد میکروبی فیلم کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه وعصاره ملیس علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در گوشت شتر نگهداری شده در دمای ٤ درجه سانتی گرادبمدت ١٦ روز در شکل ۲ نشان داده شده است. مقایسه دوتایی کاهش لگاریتم تعداد باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در نمونه های مورد مطالعه در جدول ۵ بیان شده است. نتایج نشان داد که تعداد باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در تیمار کنترل، در طول دوره ١٦ روزه روند افزایشی داشت و میانگین شمارش باکتری در تیمار کنترل از بقیه نمونه های پوشش داده شده با فیلم های مورد مطالعه بالاتر بود. در تمامی تیمار ها به جز تیمار کنترل در طول دوره نگهداری میانگین شمارش باکتری تا روز ۱۲ نگهداری روند کاهشی و در روز ١٦ نگهداری روند افزایشی داشتند. تیمار کیتوزان حاوی ٪۵ نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره ملیس خاصیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به سایرتیمارهای مورد مطالعه داشت. تمامی تیمارها دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل بودند($p<0.05$). بین تیمار کیتوزان حاوی ۵٪ نانوامولسیون زیره سیاه و تیمار کیتوزان حاوی ٤٪ عصاره ملیس نیز اختلاف معنی داری دیده نشد($p>0.05$).نتایج ارزیابی میکروبی علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در مطالعه حاضر نشان داد که فیلم های خوراکی کیتوزان حاوی نانوامولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی علیه *لیستریامونوسیتوژنز* تلقیح شده به گوشت شتر دارند و هرچه میزان غلظت ترکیب ضدمیکروبی گیاهی به فیلم های کیتوزان افزایش می یابد این خاصیت افزایش می باید. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات دیگر محققین مطابقت دارد.وانگ و همکاران (۲۰۲۰)، اثرضد میکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس هسته زردالو را علیه باکتری *لیستریامونوسیتوژنز* در گوشت گاو نگهداری شده در یخچال در یک دوره ۱۵ روزه نگهداری با فواصل زمانی سه روزه مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه تعداد باکتری ها در طول دوره پانزده روزه روند افزایشی داشت. شمارش نمونه های حاوی فیلم های کیتوزان بطور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود. نتایج نشان داد شمارش در نمونه های پوشش داده شده با غلظت بالاتر اسانس اثر ضد میکروبی قوی تری برروی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* داشتند[۳۹]. در مطالعه مهدی زاده وهمکاران (۲۰۱۲)، اثر ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس روغنی کاکوتی با غلظتهای ۰ تا ۲٪ وارد شده در فیلم کامپوزیتی خوراکی نشاسته-کیتوزان مورد آنالیز قرار گرفت. اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی به طور معنی داری با افزودن غلظت اسانس افزایش یافت. به طوری که بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* و کمترین مربوط به باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* بود. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن اسانس روغنی کاکوتیبه عنوان یک ضد میکروب طبیعی در قالب فیلم کامپوزیتی نشاسته-کیتوزان میتواند پتانسیل بالاییرا در توسعه فیلمهای خوراکی به منظور استفاده در بسته بندی فعال داشته باشد[٤٠]. خضریان و همکاران (۲۰۱۷)، کاربرد فیلم نانوکامپوزیت کیتوزان و کربوکسی متیل سلولز حاوی اسانس آویشن و عصاره انجیر در گوشت چرخ کرده شتر علیه *لیستریامونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی*O157:H7 مورد بررسی قرار دادند. میزان شمارش باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* در استفاده از هر دو فیلم حاوی ترکیبات گیاهی در گروه کنترل و فیلم کیتوزان و کربوکسی متیل سلولز به تنهایی روند افزایشی داشت اما درصورت استفاده از اسانس اویشن و عصاره انجیر این روند کاهشی بوده و دارای میزان شمارش پایین تری نسبت به گروه کنترل بودند. [٤١].

**Table 5** Average reduction rate of *Listeriamonocytogenes* count (log CFU/g) among treatments when compared together during 16 days of storage.

| Group I | Mean Difference I-J | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Group J | | | | | |
| | CH | CH+BPNE1 | CH+BPNE2 | CH+MONE | CH+BPNE1+ MONE | CH+BPNE2+ MONE |
| Con | 1.06* | 1.33* | 1.69* | 1.59* | 1.91* | 2.12* |
| CH | | 0.26* | 0.63* | 0.52* | 0.84* | 1.05* |
| CH+BPNE1 | | | 0.36* | 0.26* | 0.58* | 0.79* |
| CH+BPNE2 | | | | -0.10 | 0.21* | 0.42* |
| CH+MONE | | | | | 0.32* | 0.53* |
| CH+BPNE1+MONE | | | | | | 0.21* |

*Indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

تیوباربیتوریک اسید در نمونه کنترل در انتهای دوره به mgMDAlkg ۱/۷۷ رسید. اما در تیمار های حاوی اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس سرعت افزایش تیوباربیتوریک کم بود. در بهترین تیمار یعنی تیمار فیلم کیتوزان حاوی ۵٪ اسانس زیره سیاه و ٤٪ عصاره گیاه ملیس، میزان این شاخص در انتهای دوره به ۸۸mgMDA/kg ۰/ رسید. تمامی نمونه ها دارای اختلاف معنی داری با گروه کنترل بودند ($P<0.05$). مهدیزاده و همکاران (۱۳۹۷)، اثر آنتی اکسیدانی فیلم کامپوزیتی خوراکی نشاسته-کیتوزان حاوی ترکیب عصاره پوست انار و اسانس روغن کاکوتی را بر ماندگاری گوشت قرمز در زمان نگهداری ۲۱ روزه بررسی کردند، ارزیابی میزان اکسیداسیون نشان داد استفاده از فیلم به تنهایی و همراه با عصاره و اسانس گیاهی اثر معنی داری بر روی میزان اکسیداسیون گوشت دارد و تیمار حاوی غلظت بیشتری از عصاره و اسانس، تاثیر بیشتری در ممانعت از تشکیل مالون آلدهید داشت[٤٢].

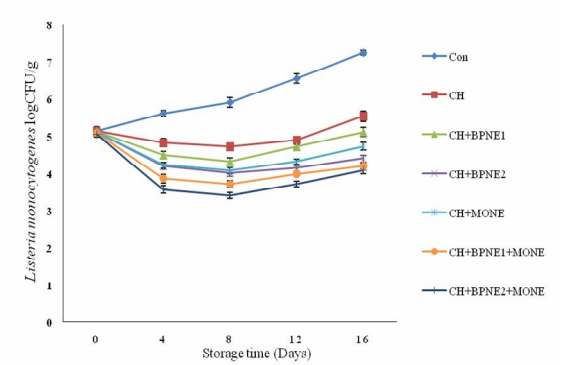


**Fig 2** Changes of *Listeria monocytogenes*count of camel meat samples in different treatments during 16 days of storage at 4 °C.

### ۳-٦-اندازه گیری TBARS

روند تغییرات میزان TBARSدر نمونه های مورد مطالعه در جدول ٦ آمده است. نتایج نشان می دهد میزان شاخص تیوباربیتوریک اسید در ابتدای دوره در تمامی نمونه ها در محدودهmg MDA/kg ۰/۲۲-۰/۲۰ قرار دارد اما در طول دوره این شاخص روند افزایشی داشت بطوریکه در میزان

**Table 6** Average reduction rate of TBARS among treatments when compared together during 16 days of storage.

| Group I | Mean Difference I-J | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Group J | | | | | |
| | CH | CH+BPNE1 | CH+BPNE2 | CH+MONE | CH+BPNE1+ MONE | CH+BPNE2+ MONE |
| Con | 0.27* | 0.36* | 0.43* | 0.34* | 0.43* | 0.47* |
| CH | | 0.09 | 0.15* | 0.06 | 0.15* | 0.20* |
| CH+BPNE1 | | | 0.06 | -0.02 | 0.06 | 0.10 |
| CH+BPNE2 | | | | -0.09 | 0.001 | 0.45 |
| CH+MONE | | | | | 0.09 | 0.13 |
| CH+BPNE1+MONE | | | | | | 0.04 |

*Indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$).

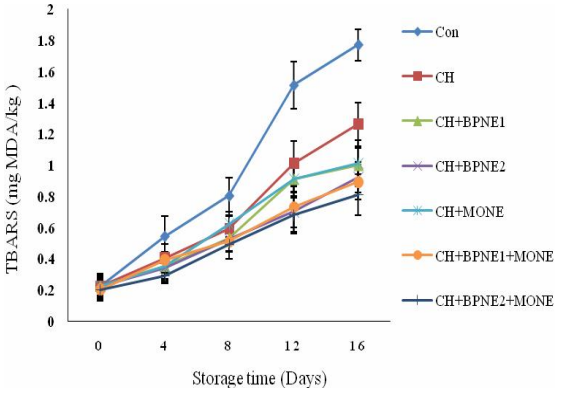


**Fig 3** Changes of TBARS camel meat samples in different treatments during 16 days of storage at 4 °C.

کین و همکاران (۲۰۱۳)،تأثیر فیلم کیتوزان همراه با پلی فنول چای بر کیفیت و ماندگاری گوشت خوک را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد میزان TBARSدر تمامی نمونه ها در طول دوره ۱۲ روزه نگهداری در دمای ٤ درجه سانتیگراد روند افزایشی داشت ولی میزان TBARSدر نمونه های پوشش داده شده با فیلم کیتوزان حاوی پلی فنول چای بطور معنی داری پایین تر از گروه کنترل بود[٤٣].جورجانتلیس و همکاران (۲۰۰۷)، در بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره رزماری ، کیتوزان و α-توکوفرول در سوسیس های گوشت خوک تازه در ٤ درجه سانتیگراد، نشان دادند کهفیلم های حاوی عصاره رزماری در مقایسه با فیلم کیتوزان به تنهایی به دلیل وجود ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری می باشد. میزان مالون دی الدهید در تمامی نمونه ها روند افزایشی را نشان داد. میزان TBARS در نمونه کنترل بطور معنی داری بیشتر از نمونه های حاوی عصاره رزماری و α -توکوفرول در سوسیس گوشت خوکبود[٤٤].

## ۳-۷-اندازه گیری pH

میانگین تغییرات pH در نمونه های مورد مطالعه در طول دوره نگهداری در جدول ۷ بیان شده است.میانگین pH در تیمار کنترل و نمونه های پوشش داده شده با فیلم های مورد مطالعه در طول دوره نگهداری روند افزایشی داشت. افزایش pHدر تیمار کنترل نسبت به نمونه های دیگر با سرعت بیشتری افزایش یافت بطوری که میانگین pH در ابتدای دوره در تیمار کنترل ٥/١٤ و در انتهای دوره به ٦/٦٤ رسید. نتایج نشان داد نمونه های پوشش داده شده با کیتوزان به تنهایی نسبت به نمونه های تیمار شده با فیلم کیتوزان حاوی اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس دارای pHبالاتری می باشد. اختلاف معنی داری بین نمونه های پوشش داده شده با فیلم کیتوزان حاوی ٥ ٪ زیره سیاه و٤ ٪ ملیس با نمونه های پوشش داده شده با فیلم کیتوزان حاوی ٢/٥ ٪ زیره سیاه و ٤ ٪ عصاره ملیس دیده نشد. همچنین اختلاف معنی داری بین تیمارهای فیلم کیتوزان حاوی ٢/٥ ٪ زیره سیاه و ٤ ٪ عصاره ملیس،فیلم کیتوزان حاوی ٤ ٪ عصاره ملیس و همچنین فیلم کیتوزان حاوی ٥ ٪ زیره سیاه دیده نشد($P>0.05$).علت اصلی افزایش pH در گوشت به دلیل تولید ترکیبات قلیایی مثل آمونیاک و تری متیل آمین های ناشی از شکسته شدن پروتیین های گوشت توسط فعالیت پروتئولیتیکی میکروارگانیسم ها و آنزیم های میکروبی می باشد[٤٥].

**Table7**Average reduction rate of pH among treatments when compared together during 16 days of storage.

| Group I | Mean Difference I-J | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Group J | | | | | |
| | CH | CH+BPNE1 | CH+BPNE2 | CH+MONE | CH+BPNE1+ MONE | CH+BPNE2+ MONE |
| Con | 0.14* | 0.23* | 0.33* | 0.32* | 0.41* | 0.48* |
| CH | | 0.08* | 0.18* | 0.18* | 0.26* | 0.34* |
| CH+BPNE1 | | | 0.10* | 0.09* | 0.17* | 0.25* |
| CH+BPNE2 | | | | 0.006 | 0.07 | 0.15* |
| CH+MONE | | | | | 0.08 | 0.15 |
| CH+BPNE1+MONE | | | | | | 0.07 |

*Indicates a statistically significant difference (p <0.05).

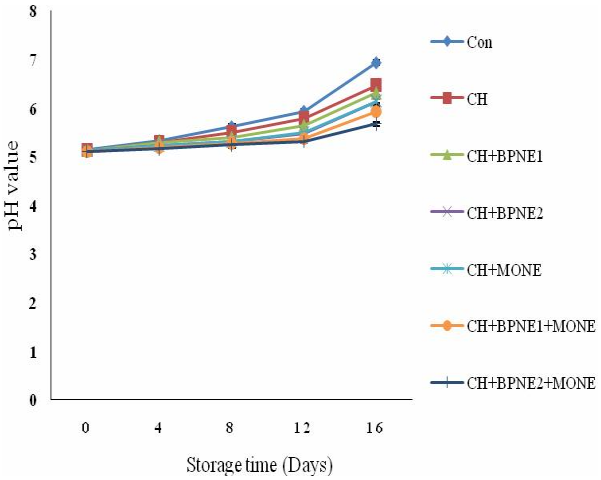


**Fig 4** Changes of pH camel meat samples in different treatments during 16 days of storage at 4 °C.

کریم نژاد و همکاران (۱۳۹۷)، بیان کردند فیلم کیتوزان حاوی ۱٪ و ۲ ٪ اسانس زنیان در گوشت مرغ دارای pH کمتری نسبت به نمونه کنترل و فیلم بدون اسانس بودند که این امر میتواند به دلیل تاثیر ضدمیکروبی اسانس زنیان بر باکتریهای پروتئولیتیک مولد فساد میتواند باشد[٤٦]. در تحقیقکین و همکاران (۲۰۱۳) نیز وجود فیلم کیتوزان حاوی پلی فنولی چای در گوشت خوک باعث کاهش pH در زمان نگهداری نسبت به گروه کنترل شد[٤٣]. خضریان و همکاران (۲۰۱۷)، کاربرد فیلم نانوکامپوزیت کیتوزان و کربوکسی متیل سلولز حاوی نگهدارنده های طبیعی در گوشت چرخ کرده شتر مورد بررسی قرار دادند، میزان pH در تمامی نمونه های گوشت از حدود ۵/۹ به ٦/٦ افزایش پیدا کرد ولی میزان pH در فیلم خوراکی حاوی اسانس و عصاره به نسبت کنترل در طول دوره ١٤ روزه نگهداری بطور معنی داری پایین تر از گروه کنترل بود[٤١].

## ٤- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فیلم خوراکی کیتوزان حاوی نانومولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس دارای اثرات ضد میکروبی خوبی علیه پاتوژن های با منشاء غذایی از جمله *لیستریا مونوسیتوژنزمی* باشد. همچنین از خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار خوبی برخوردار می باشد. لذا می توان از فیلم خوراکی بدست آمده از این ترکیبات جهت افزایش مدت زمان نگهداری گوشت شتر و حفظ کیفیت آن طی نگهداری در یخچال استفاده کرد. استفاده از فیلم خوراکی کیتوزان حاوی نانومولسیون اسانس زیره سیاه و عصاره ملیس بدست آمده در این مطالعه و یا در ترکیب با سایر اسانس های گیاهی جهت افزایش مدت زمان نگهداری سایر محصولات غذایی از جمله گوشت ماهی و مرغ پیشنهاد می‌گردد.

## ٥- منابع

[1] Dawood AA. 1995. Physical and sensory characteristics of Najdi-camel meat. Meat science. 39(1):59-69.
[2] Soltanizadeh N, Kadivar M, Keramat J, Bahrami H, Poorreza F. 2010. Camel cocktail sausage and its physicochemical and sensory quality. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 61(2):226-243.
[3] Kadim IT, Mahgoub O, Al-Marzooqi W. 2008. Meat quality and composition of Longissimus thoracis from Arabian camel (Camelus dromedaries) and Omani beef: A comparative study. Journal of Camelid Sciences. 1:37-47.
[4] Kim SJ, Cho AR, Han J. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. Food control. 29(1):112-120.
[5] Bouhdid S, Abrini J, Amensour M, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. 2010. Functional and ultrastructural changes in Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus cells induced by Cinnamomum verum essential oil. Journal of applied microbiology. 109(4):1139-1149.
[6] Packiyasothy EV, Kyle S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. Food Australia. 54(9):384-387.
[7] Tharanathan RN. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in food science & technology. 14(3):71-78.
[8] Beverlya RL, Janes ME, Prinyawiwatkula W, No HK. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of Listeria monocytogenes. Food microbiology. 25(3):534-537.
[9 Bourlieu C, Guillard V, Vallès-Pàmies B,

Gontard N. 2007. Edible moisture barriers: materials, shaping techniques and promises in food product stabilization. Food Materials Science: Principles and Practice. 547-577.

[10] Tavassoli-Kafrani E, Shekarchizadeh H, Masoudpour-Behabadi M. 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. Carbohydrate polymers. 137:360-374.

[11] Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, Tang ZX. 2011. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 28(3):353-362.

[12] Maghsoudlou A, Maghsoudlou Y, Khomeiri M, Ghorbani M. 2012. Evaluation of anti-fungal activity of chitosan and its effect on the moisture absorption and organoleptic characteristics of pistachio nuts. International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology. 2(4):336-340.

[13] Shahidi F, Arachchi JK, Jeon YJ. 1999. Food applications of chitin and chitosans. Trends in food science & technology. 10(2):37-51.

[14] Moradi M, Tajik H, No HK, Razavi Rohani SM, Oromiehie A, Ghasemi S. 2010. Potential inherent properties of chitosan and its applications in preserving muscle food. Journal of Chitin Chitosan. 15(1):35-45.

[15] Baser KH, Özek T, Abduganiev BE, Abdullaev UA, Aripov KN. 1997. Composition of the essential oil of Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch. from Tajikistan. Journal of essential oil research. 9(5):597-598.

[16] Basar SN, Zaman R. 2013. An overview of badranjboya (Melissa officinalis). International Research Journal of Biological Sciences. 2(12):107-109.

[17] Santos-Neto LL, de Vilhena Toledo MA, Medeiros-Souza P, de Souza GA. 2006. The use of herbal medicine in Alzheimer's disease—a systematic review. Evidence-based complementary and alternative medicine. 3(4):441-445.

[18] Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü MA, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2013. Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions. Food Hydrocolloids. 30(1):401-407.

[19] Severino R, Ferrari G, Vu KD, Donsì F, Salmieri S, Lacroix M. 2015. Antimicrobial effects of modified chitosan based coating containing nanoemulsion of essential oils, modified atmosphere packaging and gamma irradiation against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella Typhimurium on green beans. Food control. 50:215-222.

[20] Otoni CG, de Moura MR, Aouada FA, Camilloto GP, Cruz RS, Lorevice MV, de FF Soares N, Mattoso LH. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. Food Hydrocolloids. 41:188-194.

[21] Uyttendaele M, De Troy P, Debevere J. 1999. Incidence of Listeria monocytogenes in different types of meat products on the Belgian retail market. International journal of food microbiology. 53(1):75-80.

[22] Merrikhi Ardebili E, Mohsenzadeh M. 2018. Evaluation of methyl cellulose edible coating incorporated with Carum copticum L. essential oil and Turmeric (Curcuma longa L.) extract on growth control of Listeria monocytogenes inoculated to chicken meat portions storaged at 4° C. Food Science and Technology, 15(83): 315-328.

[23] Kakaei S, Shahbazi Y. 2016. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and Ziziphora clinopodioides essential oil on survival of Listeria monocytogenes and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. LWT-Food Science and Technology. 72:432-438.

[24] Raeisi M, Tajik H, Aminzare M, Sangin Abadi S, Yarahmadi A, Yarahmadi E, Tepe B. 2016. The role of nisin, monolaurin, and EDTA in antibacterial effect of Rosmarinus officinalis L. and Cinnamomum zeylanicum Blume essential oils on foodborne pathogens. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19(7): 1709-1720.

[25] Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A, McClements DJ. 2016. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of Thymus daenensis essential oil against E. coli. Food chemistry. 194:410-415.

[26] Siripatrawan U, Vitchayakitti W. 2016. Improving functional properties of chitosan

Daneshmandi S Derakhshan S. 2010. Evaluation of drug interactions and antibacterial activity of black cumin essential oil (Bunium persicum) against a number of gram-positive and gram-negative bacteria. Iranian Journal of Medical Microbiology.4(1):26-34. [In Persian[

[36] Samojlik I, Lakic N, Mimica-Dukic N, Đaković-Švajcer K, Bozin B. 2010. Antioxidant and hepatoprotective potential of essential oils of coriander (Coriandrum sativum L.) and caraway (Carum carvi L.)(Apiaceae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(15):8848-8853.

[37] Chizzola R, Saeidnejad AH, Azizi M, Oroojalian F, Mardani H. 2014. Bunium persicum: variability in essential oil and antioxidants activity of fruits from different Iranian wild populations. Genetic resources and crop evolution. 61(8):1621-1631.

[38] Pereira RP, Fachinetto R, de Souza PA, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Burger ME, Morel AF, Morsch VM. 2009. Effets antioxydants de différents extraits de Melissa officinalis, Matricaria recutita et Cymbopogon citratus. Neurochemical Research 34(5):973-983.

[39] Wang D, Dong Y, Chen X, Liu Y, Wang J, Wang X, Wang C, Song H. 2020. Incorporation of apricot (Prunus armeniaca) kernel essential oil into chitosan films displaying antimicrobial effect against Listeria monocytogenes and improving quality indices of spiced beef. International Journal of Biological Macromolecules. 162:838-844.

[40] Mehdizadeh T, Tajik H, Razavi Rohani SM. 2012. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing Thymus kotschyanus essential oil. Studies in Medical Sciences. 23(3):315-323.

[41] Khezrian A, Shahbazi Y. 2018. Application of nanocompostie chitosan and carboxymethyl cellulose films containing natural preservative compounds in minced camel's meat. International journal of biological macromolecules. 106:1146-1158.

[42] Mehdizadeh T, Tajik H, Rohani SM, Oromiehie AR. 2012. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible films as active food packaging by incorporating with propolis. Food Hydrocolloids. 61:695-702.

[27] Seydim AC, Sarikus G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food research international. 39(5):639-464.

[28] Keykhosravy K, Khanzadi S, Hashemi M, Azizzadeh M. 2020. Chitosan-loaded nanoemulsion containing Zataria Multiflora Boiss and Bunium persicum Boiss essential oils as edible coatings: Its impact on microbial quality of turkey meat and fate of inoculated pathogens. International journal of biological macromolecules. 150:904-913.

[29] Talebi F, MIsaghi A, Khanjari A, Kamkar A, Gandomi H, Saeedi M. 2017. Evaluation of antimicrobial activity of Poly Lactic Acid (PLA) films containing cellulose nanoparticle and Bunium persicum and Mentha pepperita essential oils (EOs). Iranian Journal of Veterinary Medicine, 11(4): 289-298.

[30] Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami M. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food chemistry, 120(3):765-770.

[31] Haghir al-Sadat F, François B , Sheikhha M, Hokmollahi F, Azimzadeh M, Houri M. 2010. Evaluation of effective compounds and antioxidant properties of black cumin essential oil. Scientific Research Monthly of Yazd Shahid Sadoughi University of Medical Sciences.18(3):284-291 .

[32] Kamali M, Khosroyar S, Mohammadi A. 2015. Antibacterial activity of various extracts from Dracocephalum kotschyi against food pathogenic microorganisms. International Journal of PharmTech Research. 8(9):163-158.

[33] Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta PK. 2011. Chitosan–silver oxide nanocomposite film: Preparation and antimicrobial activity. Bulletin of Materials Science. 34(1):29-35.

[34] Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of food science. 67(3):1162-1169.

[35] Soleimani N, Sattari M, Sepehri Seresht S,

starch-chitosan composite film containing Thymus kotschyanus essential oil. Veterinary Research Forum. 3(3): 167–173.
[43] Qin YY, Yang JY, Lu HB, Wang SS, Yang J, Yang XC, Chai M, Li L, Cao JX. 2013. Effect of chitosan film incorporated with tea polyphenol on quality and shelf life of pork meat patties. International Journal of Biological Macromolecules. 61:312-316.
[44] Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, Blekas G, Georgakis SA. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. Meat science. 76(1):172-181.
[45] Tsironi T, Dermesonlouoglou E, Giannakourou M, Taoukis P. 2009. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. LWT-Food Science and Technology. 42(2):664-671.
[46] KarimnejadF, Razavilar V, Anvar A, Eskandari S. 2020. The effect of chitosan oral film containing Trachyspermum ammi essential oil on some chemical properties of chicken meat. Journal of Medical Science and Nutrition.16(4): 91-101.[In Persian]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

# Antimicrobial and antioxidant effects of chitosan edible film containing nanoemulsion of *Melissa officinalis L.* extract and *Buniumpersicum* essential oil on *Listeriamonocytogenes* inoculated into camel meat

**Ebrahimian, M. [1], Mohsenzadeh, M. [2*]**

1. Ph.D. student, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factultyof Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Hygiene and Aquaculture, Factulty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antimicrobial and antioxidant effects of chitosan edible film containing nanoemulsion of *Melissa officinalis* L. extract and *Buniumpersicum* essential oil on *Listeriamonocytogenes* inoculated into camel meat. The studied films were prepared using 2% chitosan and 2.5% and 5% of nanoemulsion of *Buniumpersicum* essential oil and 4% of *Melissa officinalis* L.extract. The antimicrobial and antioxidant effects of coated camel meat during 16 days of storage at 4 °C with a 4-day interval (0, 4, 8, 12, 16) were evaluated. The coated portions were chemically evaluated. Most of the essential oil compounds include: cuminaldehyde (24.37%), γ-Terpinene(19.99%), and P-cymene (9.71%). The MIC of *Melissa officinalis* L. extract and *Buniumpersicum* essential oil against *L. monocytogenes* were 1% and 0.25%, respectively. The antioxidant effects of films by DPPH method showed that the addition of essential oils and extracts increases the antioxidant properties of films. The antimicrobial effect of films by disk diffusion method, the largest diameter of growth inhibition zone (17.15 ± 0.16) was related to chitosan film containing 5% *Buniumpersicum* essential oil and 4% *Melissa officinalis* L. extract. The average count of *L.monocytogenes* in the control treatment was higher than the other treatments. The results of TBARS showed that the antioxidant properties of films containing *Buniumpersicum* essential oil and *Melissa officinalis* L. extract was higher than the control sample. The pH level in the samples coated with chitosan film containing 5% *Buniumpersicum* essential oil and 4% *Melissa officinalis* L. extract was lower than the other treatments. In general, the prepared films have good antimicrobial and antioxidant properties against *L. monocytogenes*, which increase with the addition of plant compounds.

## ARTICLE INFO

**Article History:**

Received 2022/ 04/ 22
Accepted 2021/ 12/ 04

**Keywords:**

*Listeria monocytogenes*,
Chitosan,
*Buniumpersicum,*
Nanoemulsion,
*Melissaofficinalis*L. extract,
Camel meat

**DOI: 10.22034/FSCT.19.133.249**
**DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.133.21.6**

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