

## اثر سینرژیک لیزوزیم در پوشش کیتوزان حاوی اسانس زیره سبز

مژگان حیدری<sup>۱</sup>، پیمان مهستی شتربانی<sup>۲\*</sup>، افشین آخوندزاده بستی<sup>۳</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات گروه صنایع غذایی

۲- گروه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه بهداشت و ایمنی مواد غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۱۵)

### چکیده

در این تحقیق پوشش کیتوزان به همراه لیزوزیم و روغن زیره سبز برای افزایش ویژگی انتی باکتریال پوشش کیتوزان به کار برده شد. پس از تهیه پوشش کیتوزان ۲ درصد حاوی غلظت‌های مختلف لیزوزیم و غلظت یک درصد اسانس زیره سبز، ویژگی‌های ضد میکروبی این پوشش‌ها در فیله مرغ نگهداری شده در دمای یخچالی مدت ۱۲ روز از لحاظ ویژگی‌های میکروبی (شمارش کلی باکتری‌های هوازی، شمارش باکتری‌های سرمادوست، شمارش باکتری سودوموناس و شمارش کلی فرم‌ها) مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که روز ۱۲ تعداد باکتری‌های مزوفیل ۳ لگاریتم در هر گرم و تعداد باکتری‌های سرما دوست ۳ و کلی فرم ۱٫۱ و سودوموناس ۳ لگاریتم در هر گرم کاهش نشان دادند. نتایج نشان می‌دهند لیزوزیم ۱۰ درصد به کاررفته در پوشش کیتوزان حاوی اسانس زیره سبز اثر هم افزایی داشته و می‌تواند نقش مهمی را در افزایش کیفیت محصولات بسته بندی شده داشته باشد و میزان ماندگاری را در محصولات گوشتی افزایش دهد.

کلید واژگان: پوشش، لیزوزیم، زیره سبز، ضد میکروبی، هم افزایی

\* مسئول مکاتبات: pmahasti@yahoo.com

## ۱- مقدمه

آنزیم لیزوزیم از جمله ترکیبات ضد میکروبی است که به طور فراوان در طبیعت یافت می‌شود [۱] و به وسیله گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها، پرندگان و پستانداران تولید می‌گردد. لیزوزیم به فرم مونومر در سفیده تخم مرغ یافت می‌شود. لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ یک منبع غنی از پپتیدهای فعال زیستی نظیر پپتیدهای ضد میکروبی، ضد سرطانی، تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی است. لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ در صنعت به عنوان نگه‌دارنده‌ی طبیعی برای جلوگیری از رشد باکتری در محصولات گوشتی نظیر سوسیس، گوشت گاو و گوشت گوسفند استفاده می‌شود. بعلاوه مشخص شده است که لیزوزیم دناتوره شده به وسیله گرما فعالیت ضد میکروبی خوبی را از خود نشان می‌دهد. تهیه‌ی پپتید از هیدرولیز آنزیمی لیزوزیم با استفاده از آنزیم پیپسین در صنعت برای تولید افزودنی‌های طبیعی در فرآوری غذایی استفاده می‌شود. به طور کلی از آنجایی که لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ فعالیت‌های زیستی متعدد از خود نشان می‌دهد، می‌تواند به عنوان افزودنی یا نگه‌دارنده در فرآوری محصولات غذایی و نیز در فرمولاسیون داروهای ضد سرطانی، ضد میکروبی و نیز داروهای تنظیم‌کننده‌ی سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گیرد.

استفاده از عوامل ضد میکروبی طبیعی همراه با مواد پلیمری جهت گسترش مواد پوشش‌دهنده و بسته‌بندی ضد میکروبی غذایی، یک موضوع جدیدی است [۲]

کیتوزان پلی ساکاریدی است که به صورت صنعتی از دی استیل‌سیون<sup>۱</sup> کیتین سخت پوستان مانند حشرات، خرچنگ‌ها، میگوها، لابسترها و دیواره سلولی نوع خاصی از جلبک‌ها و قارچ‌ها تهیه می‌شود

اسانس‌ها، روغن‌های معطر مایع هستند که از بخش‌های مختلف گیاهی به دست می‌آید. اسانس زیره سبز *Cuminum cyminum L.* به لحاظ داشتن ساختار فنلی، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بوی مخصوص اسانس و میوه زیره سبز

مربوط به کومینول است. در اسانس زیره مواد دیگری نظیر سیمن، فلاندرین، کارون و مواد دیگری به نسبت کم گزارش شده است [۳].

امیری و همکاران (۱۳۸۷)، در خصوص بهبود خواص ضد میکروبی آنزیم لیزوزیم و افزایش طیف عملکرد این آنزیم مطالعه کردند. گلیکوزیله کردن لیزوزیم با دکستران با نسبت وزنی ۱ به ۵ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان یک هفته تحت رطوبت نسبی ۷۹٪ صورت گرفت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری گروه‌های آمینی آزاد نشان داد که ۳/۷ مول دکستران به یک مول لیزوزیم متصل شده است، در حالی که فعالیت آنزیم کنژوگه طی گلیکوزیله شدن به ۶۲٪ کاهش یافت. کنژوگه لیزوزیم - دکستران برخلاف آنزیم اصلاح‌نشده کاملاً بر باکتری گرم منفی اشرشیا کلی مؤثر بود. بنا بر نتایج به دست آمده، لیزوزیم اصلاح‌شده با دکستران می‌تواند برخلاف لیزوزیم به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی باکتری‌های گرم منفی در سیستم‌های غذایی استفاده گردد. [۱]

Ojagh و همکاران (۲۰۱۰)، فیلم خوراکی کیتوزان را با اسانس دارچین بررسی کردند. با افزایش غلظت اسانس خاصیت ضد میکروبی افزایش یافت [۴].

یکی از چالش‌های مهم صنایع بسته‌بندی فرآورده‌ای پروتئینی به ویژه فیله مرغ، افزایش زمان ماندگاری محصول می‌باشد لذا بران شدیم که با اثر هم افزایی تاثیر آنتی باکتریال آنزیم لیزوزیم بر پوشش‌هایی کیتوزان همراه با اسانس زیره سبز برویژگی‌های میکروبی فیله مرغ و مدت زمان ماندگاری آن را بررسی نماییم.

## ۲- روش پژوهش

به منظور بررسی اثر پوشش کیتوزان حاوی اسانس زیره سبز و بر روی ویژگی‌های میکروبی فیله مرغ نگهداری شده در دمای یخچالی دانه گیاه زیره سبز *Cuminum cyminum*، خرداد سال ۱۳۹۴ از منطقه سبزوار استان خراسان رضوی تهیه گردید.

1. De-acetylation

**۲-۵- شمارش باکتری‌های سرما دوست**

شمارش تعداد باکتری‌های سرما دوست به روش کریم ۱۳۸۲ انجام شد [۶].

**۲-۶- شمارش سودوموناس**

شمارش تعداد باکتری‌های سودوموناس به روش استاندارد ملی شماره ۴۷۹۱ انجام شد [۷].

**۲-۷- شمارش کلی فرم‌ها**

شمارش تعداد کلی فرم‌ها به روش استاندارد ملی شماره 11166 انجام شد [۸].

**۳- تجزیه تحلیل داده‌ها**

تجزیه و تحلیل داده براساس تعیین میانگین و آنالیز واریانس یک طرفه توسط نرم افزار SPSS انجام شد.

**۴- نتیجه گیری**

در این تحقیق، تلاش شد تأثیر غلظت‌های مختلف لیزوزیم و اسانس زیره سبز به کاررفته در ساختار پوشی کیتوزان، جهت افزایش ماندگاری میکروبی فیله مرغ، بررسی گردید.

نتایج ارزیابی شمارش تعداد کلی باکتری‌های هوازی در تیمارهای مختلف نشان داد که در نمونه‌های فیله مرغ بسته‌بندی شده با غلظت‌های لیزوزیم و پوشش کیتوزان حاوی غلظت اسانس زیره سبز یک درصد و نگهداری شده در دمای یخچالی در طی ۱۲ روز، در تمامی روزهای آزمون، در تمامی تیمارها، شمارش تعداد کلی باکتری‌های هوازی به صورت معنی داری ( $P < 0.05$ ) افزایش نشان داده است. نتایج شمارش تعداد باکتری‌های هوازی در جدول ۱ در مدت ۱۲ روز برحسب میانگین  $\text{Log cfu/g}$  ذکر شده است.

جهت تهیه اسانس از زیره سبز، مقدار ۱۵۰ گرم از این گیاه به روش تقطیر با بخار داغ (Steam distillation) توسط دستگاه کلونجر استفاده شد.

**۲-۱- تهیه پوشش بر پایه کیتوزان**

۲ گرم از کیتوزان در ۱۰۰ سی سی محلول اسید استیک ۱ درصد حل شد، برای دستیابی به پخش شدن کیتوزان به صورت مناسب، کیتوزان به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی به مخلوط شده و سپس گلیسرول به میزان ۰/۷۵ میلی لیتر به ازای هر گرم کیتوزان اضافه گردید. به مدت ۱۰ دقیقه محلول مخلوط شد. محلول کیتوزان با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۳ صاف شده تا مواد نامحلول جدا شوند سپس اسانس‌های زیره سبز با غلظت‌های صفر به عنوان شاهد و غلظت ۱ درصد و لیزوزیم با غلظت‌های ۰، ۵ و ۱۰ درصد (مرک) و توین ۸۰ (۲۵/۰ درصد کیتوزان) به محلول اضافه شده و در نهایت محلول نهایی به مدت یک دقیقه با هم‌زنایزر با دور ۲۱۶۰۰ rpm هم‌زن گردید.

**۲-۲- تهیه گوشت فیله مرغ**

پس از تهیه لاشه ذبح شده مرغ از کشتارگاه، فیله از قسمت سینه لاشه ذبح شده مرغ جدا شده و به قطعات ۲۵ گرمی تقسیم شد.

**۲-۳- تهیه تیمارها و بسته بندی**

گروه‌های تیمار شامل گروه شاهد، گروه پوشش کیتوزان، و کیتوزان به همراه اسانس زیره سبز با دو غلظت ۰،۵ و ۱ درصد تهیه شد. پس تهیه پوشش فیله‌ها از داخل محلول خارج شده و بعد از آب‌چکانی، در کیسه‌های استریل، بسته‌بندی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تیمارهای تولیدی در کیسه‌های استریل مخصوص بسته‌بندی و طی ۱۲ روز در دمای یخچالی نگهداری شدند و در روزهای صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ارزیابی میکروبی با سه تکرار انجام گرفت.

**۲-۴- شمارش باکتری‌های مزوفیل هوازی**

به منظور شمارش تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی به روش استاندارد ملی شماره 5272 انجام شد [۵].

**Table1** Counting the total number of Aerobic bacteria in packaged fillet with concentrations of lysozyme and chitosan of coating with essential oil cumin during storage at refrigerating temperatures for 12 days. (in terms of Log cfu/g). (Mean  $\pm$  SD)

Day 12	Day 9	Day 6	Day 3	Day 0	Chicken Fillet
7.16 $\pm$ 0.18 <sup>s</sup>	6.79 $\pm$ 0.2 <sup>r</sup>	4.66 $\pm$ 0.21 <sup>p</sup>	4.13 $\pm$ 0.11 <sup>no</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	Control sample
6.84 $\pm$ 0.16 <sup>r</sup>	6.56 $\pm$ 0.26 <sup>r</sup>	4.44 $\pm$ 0.24 <sup>op</sup>	3.85 $\pm$ 0.23 <sup>mn</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	Coated with chitosan
4.39 $\pm$ 0.23 <sup>op</sup>	3.16 $\pm$ 0.16 <sup>hijk</sup>	2.95 $\pm$ 0.14 <sup>efgh</sup>	2.75 $\pm$ 0.13 <sup>bcdefg</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	With coating chitosan containing 1% oil
4.16 $\pm$ 0.15 <sup>no</sup>	2.99 $\pm$ 0.13 <sup>efghi</sup>	2.73 $\pm$ 0.19 <sup>bcdefg</sup>	2.58 $\pm$ 0.22 <sup>abcd</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	With coating chitosan containing 5% lysozyme and 0.5% essential oil
3.99 $\pm$ 0.1 <sup>n</sup>	2.91 $\pm$ 0.18 <sup>defgh</sup>	2.64 $\pm$ 0.22 <sup>abcde</sup>	2.49 $\pm$ 0.15 <sup>abc</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 0.5% essential oil
3.82 $\pm$ 0.22 <sup>mn</sup>	2.74 $\pm$ 0.14 <sup>bcdefg</sup>	2.52 $\pm$ 0.14 <sup>abc</sup>	2.67 $\pm$ 0.46 <sup>abcde</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	Coating with 5% Lysozyme and chitosan containing 1% oil
3.35 $\pm$ 0.44 <sup>ijkl</sup>	2.69 $\pm$ 0.18 <sup>abcdef</sup>	2.44 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	2.36 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	2.35 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 1% essential oil

\* Common lowercase letters in the table indicate no significant difference ( $P \geq 0.05$ ).

مرغ بسته‌بندی شده با پوشش کیتوزان حاوی غلظت‌های متفاوت لیزوزیم و اسانس زیره سبز نگهداری شده در دمای یخچالی در طی ۱۲ روز، در جدول ۲ نشان داده شده است. این نتایج در تمامی روزهای آزمون، در تمامی تیمارها، افزایش تعداد باکتری‌های سرمادوست به صورت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نشان داده است. نتایج شمارش تعداد باکتری‌های سرمادوست در تیمارهای فیله مرغ شاهد و بسته‌بندی شده با پوشش کیتوزان به تنهایی و همچنین بسته‌بندی شده با پوشش غلظت‌های لیزوزیم و کیتوزان یک درصد اسانس زیره سبز نشان داد، استفاده از پوشش کیتوزان به تنهایی جهت بسته‌بندی فیله مرغ در طی روزهای آزمون باعث کاهش تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در تعداد باکتری‌های سرمادوست نسبت به تیمار شاهد گردید.

نتایج نشان داد که استفاده از پوشش کیتوزان به تنهایی باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری ( $P \geq 0.05$ ) در شمارش کلی باکتری‌های هوازی نسبت به تیمار شاهد نشده است، ولی تعداد باکتری‌های مزوفیل در روز نهایی یا روز دوازدهم آزمون دارای تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) نشان داد.

همچنین این روند برای تیمارهای پوشش داده شده با کیتوزان همراه با لیزوزیم و یک درصد اسانس زیره سبز نیز مشاهده گردید و مشاهده شد استفاده از غلظت‌های لیزوزیم و اسانس زیره سبز، باعث کاهش معنی‌داری ( $P \geq 0.05$ ) در شمارش کلی باکتری‌های هوازی نسبت به تیمار شاهد و تیمار فیله مرغ بسته‌بندی شده با پوشش کیتوزان به تنهایی گردید. نتایج شمارش تعداد باکتری‌های سرمادوست نشان داد که در تیمارهای فیله

**Table2.** Counting the total number of psychrophile in packaged fillet with concentrations of lysozyme and chitosan of coating with essential oil cumin during storage at refrigerating temperatures for 12 days. (in terms of Log cfu/g). (Mean  $\pm$  SD)

Day 12	Day 9	Day 6	Day 3	Day 0	Chicken Fillet
7.06 $\pm$ 0.07 <sup>t</sup>	6.46 $\pm$ 0.14 <sup>s</sup>	4.61 $\pm$ 0.13 <sup>q</sup>	3.57 $\pm$ 0.27 <sup>o</sup>	2.12 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	Control sample
5.86 $\pm$ 0.12 <sup>r</sup>	5.66 $\pm$ 0.18 <sup>r</sup>	4.05 $\pm$ 0.1 <sup>p</sup>	3.28 $\pm$ 0.18 <sup>mn</sup>	2.12 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>	Coated with chitosan
3.3 $\pm$ 0.06 <sup>mn</sup>	2.73 $\pm$ 0.2 <sup>ghi</sup>	2.5 $\pm$ 0.16 <sup>defg</sup>	2.32 $\pm$ 0.13 <sup>bcd</sup>	2.12 $\pm$ 0.20 <sup>ab</sup>	With coating chitosan containing 1% oil
3.47 $\pm$ 0.15 <sup>no</sup>	2.73 $\pm$ 0.14 <sup>ghi</sup>	2.63 $\pm$ 0.11 <sup>efgh</sup>	2.47 $\pm$ 0.13 <sup>bcdefg</sup>	2.12 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	With coating chitosan containing 5% lysozyme and 0.5% essential oil
3.29 $\pm$ 0.17 <sup>mn</sup>	2.71 $\pm$ 0.13 <sup>fghi</sup>	2.45 $\pm$ 0.1 <sup>defg</sup>	2.29 $\pm$ 0.09 <sup>abc</sup>	2.12 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 0.5% essential oil
3.01 $\pm$ 0.1 <sup>ijkl</sup>	2.59 $\pm$ 0.1 <sup>defgh</sup>	2.42 $\pm$ 0.12 <sup>cdef</sup>	2.24 $\pm$ 0.12 <sup>abc</sup>	2.12 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	Coating 5% Lysozyme and chitosan containing 1% oil
2.93 $\pm$ 0.14 <sup>ijk</sup>	2.47 $\pm$ 0.12 <sup>cdefg</sup>	2.32 $\pm$ 0.08 <sup>bcd</sup>	2.02 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	2.12 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 1% essential oil

\* Common lowercase letters in the table indicate no significant difference ( $P \geq 0.05$ ).

غلظت های لیزوزیم و یک درصد اسانس زیره سبز و به ترتیب، کاهش یافته است، مشاهده گردید استفاده از پوشش کیتوزان به تنهایی، باعث ایجاد تفاوت معنی داری ( $P \geq 0.05$ ) در شمارش کلی باکتری سودوموناس نسبت به تیمار شاهد نگردید. ولی استفاده از پوشش لیزوزیم کیتوزان یک درصد اسانس زیره سبز، تفاوت معنی داری ( $P \geq 0.05$ ) در تعداد باکتری سودوموناس در تیمارهای فیله مرغ مشاهده شد.

نتایج شمارش تعداد باکتری های سودوموناس در تیمار های فیله مرغ بسته بندی شده با پوشش کیتوزان حاوی غلظت های متفاوت لیزوزیم و اسانس زیره سبز ۱ درصد نگهداری شده در دمای یخچالی در طی ۱۲ روز، در جدول ۳ نشانت های لیز داده شده. نتایج در تمامی روزهای آزمون، در تمامی تیمارها، تعداد باکتری سودوموناس به صورت معنی داری ( $P < 0.05$ ) در تیمارهای فیله مرغ شاهد و بسته بندی شده با پوشش کیتوزان به تنهایی و همچنین

Table3. Counting the total number of pseudomonas in packaged fillet with concentrations of lysozyme and chitosan of coating with essential oil cumin during storage at refrigerating temperatures for 12 days. (in terms of **Log cfu/g**).( Mean  $\pm$  SD)

Day 12	Day 9	Day 6	Day 3	Day 0	Chicken Fillet
7.81 $\pm$ 0.2 <sup>q</sup>	6.8 $\pm$ 0.15 <sup>p</sup>	4.67 $\pm$ 0.17 <sup>m</sup>	3.63 $\pm$ 0.38 <sup>k</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	Chicken Fillet
7.58 $\pm$ 0.11 <sup>q</sup>	6.72 $\pm$ 0.18 <sup>p</sup>	4.18 $\pm$ 0.17 <sup>l</sup>	3.3 $\pm$ 0.14 <sup>j</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	Control sample
4.03 $\pm$ 0.11 <sup>l</sup>	2.74 $\pm$ 0.05 <sup>hi</sup>	2.51 $\pm$ 0.12 <sup>efgh</sup>	2.28 $\pm$ 0.15 <sup>cde</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	Coated with chitosan
5.44 $\pm$ 0.16 <sup>n</sup>	2.64 $\pm$ 0.22 <sup>ghi</sup>	2.33 $\pm$ 0.11 <sup>cdefg</sup>	2.12 $\pm$ 0.12 <sup>bcd</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	With coating chitosan c containing 1% oil
4.88 $\pm$ 0.35 <sup>m</sup>	2.45 $\pm$ 0.1 <sup>efgh</sup>	2.32 $\pm$ 0.12 <sup>cdefg</sup>	2 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	With coating chitosan containing 5% lysozyme and 0.5% essential oil
4.07 $\pm$ 0.08 <sup>l</sup>	2.3 $\pm$ 0.06 <sup>cdef</sup>	1.94 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	1.81 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan contain 0.5% essential oil
3.66 $\pm$ 0.1 <sup>k</sup>	2.07 $\pm$ 0.25 <sup>bc</sup>	1.82 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	1.61 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	Coating 5% Lysozyme and chitosan containing 1% oil

\* Common lowercase letters in the table indicate no significant difference ( $P \geq 0.05$ ).

کلیفرم به صورت معنی داری ( $P < 0.05$ )، افزایش یافته و در بسته بندی شده با پوشش کیتوزان به تنهایی و همچنین بسته بندی شده با پوشش لیزوزیم و اسانس زیره سبز و به ترتیب، کاهش معنی داری مشاهده شد.

نتایج شمارش تعداد باکتری های کلیفرم در تیمارهای فیله مرغ بسته بندی شده با پوشش کیتوزان حاوی غلظت های متفاوت لیزوزیم و اسانس زیره سبز یک درصد نگهداری شده در دمای یخچالی در طی ۱۲ روز در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج در تمامی روزهای آزمون، در تمامی تیمارها، تعداد باکتری های

Table 4 Counting the total number of Coliform bacteria in packaged fillet with concentrations of lysozyme and chitosan of coating with essential oil cumin during storage at refrigerating temperatures for 12 days. (in terms of **Log cfu/g**).( Mean  $\pm$  SD)

Day 12	Day 9	Day 6	Day 3	Day 0	Chicken Fillet
3.56 $\pm$ 0.16 <sup>s</sup>	3.17 $\pm$ 0.15 <sup>f</sup>	2.63 $\pm$ 0.17 <sup>mnp</sup>	2.17 $\pm$ 0.08 <sup>ijk</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	Control sample
3.42 $\pm$ 0.18 <sup>s</sup>	2.89 $\pm$ 0.22 <sup>pq</sup>	2.43 $\pm$ 0.12 <sup>klm</sup>	2.09 $\pm$ 0.1 <sup>hij</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	Coated with chitosan
2.64 $\pm$ 0.12 <sup>mnp</sup>	1.66 $\pm$ 0.2 <sup>bcdef</sup>	1.36 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	1.63 $\pm$ 0.2 <sup>bcde</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	With coating chitosan containing 1% oil
2.81 $\pm$ 0.15 <sup>opq</sup>	1.94 $\pm$ 0.18 <sup>fghi</sup>	1.65 $\pm$ 0.18 <sup>bcde</sup>	1.59 $\pm$ 0.15 <sup>bcde</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	With coating chitosan containing 5% lysozyme and 0.5% essential oil
2.59 $\pm$ 0.22 <sup>mno</sup>	1.63 $\pm$ 0.08 <sup>bcde</sup>	1.48 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	1.56 $\pm$ 0.12 <sup>abcde</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 0.5% essential oil
2.41 $\pm$ 0.07 <sup>klm</sup>	1.65 $\pm$ 0.19 <sup>bcde</sup>	1.66 $\pm$ 0.16 <sup>bcdef</sup>	1.57 $\pm$ 0.09 <sup>abcde</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	Coating 5% Lysozyme and chitosan containing 1% oil
1.83 $\pm$ 0.05 <sup>efgh</sup>	1.36 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	1.67 $\pm$ 0.15 <sup>bcdef</sup>	1.53 $\pm$ 0.07 <sup>abcd</sup>	1.52 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	Coating 10% Lysozyme and chitosan containing 1% essential oil

\* Common lowercase letters in the table indicate no significant difference ( $P \geq 0.05$ ).

## ۱-۴- اثرات تداخلی متغیرهای مورد آزمایش بر

### روی شمارش باکتری‌های مورد مطالعه

پس از بررسی اثر تداخلی فاکتورهای مورد آزمایش بر متغیر وابسته (لگاریتم تعداد باکتری) برحسب  $\text{Log cfu/g}$  به وسیله روش آنالیز واریانس دوطرفه (Two way) مشخص شد، در مورد اثرات تداخلی دوگانه متغیرهای مورد آزمایش بر متغیر وابسته، شمارش کلی باکتری‌ها هوازی، شمارش باکتری‌های سرما دوست، شمارش باکتری‌های سودوموناس و شمارش کلیفرم‌ها در حالت زیر، تأثیر معنی‌دار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

از فرمول (میزان غلظت‌های لیزوزیم مورد استفاده در پوشش کیتوزان) میزان غلظت‌های اسانس زیره سبز مورد استفاده در پوشش کیتوزان استفاده شد.

## ۵- بحث

نگهداری مواد غذایی با استفاده از مواد طبیعی و با کمک روش‌های نوین بسته‌بندی، به یکی از مهم‌ترین اهداف صنعت غذا تبدیل شده است.

در این تحقیق، تلاش شد تأثیرات غلظت‌های مختلف لیزوزیم به کاررفته در ساختار پوشش کیتوزان به همراه کیتوزان، بررسی شود.

این تحقیق نشان داد روند رشد میکروبی در تمامی فاکتورهای مورد ارزیابی (تعداد کلی باکتری‌های هوازی، تعداد باکتری‌های سرما دوست، تعداد باکتری سودوموناس و تعداد کلیفرم‌ها)، در تمامی روزهای آزمون (صفر، ۳، ۶، ۹ و ۱۲) در تمامی تیمارهای مورد مطالعه، به صورت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) افزایش یافت. در این تحقیق مشاهده گردید استفاده از تیمار پوشش داده شده با کیتوزان حاوی اسانس زیره سبز و لیزوزیم به صورت توأم در بهترین حالت آزمون (۱۰ درصد لیزوزیم و ۱ درصد اسانس زیره سبز) باعث کاهش  $\text{Log cfu/g}$  ۳٫۸۱،  $\text{Log cfu/g}$  ۴٫۱۳،  $\text{Log cfu/g}$  ۴٫۱۵ و  $\text{Log cfu/g}$  ۱٫۷۳ در میزان شمارش کلی باکتری‌های هوازی، شمارش باکتری‌های سرما دوست، شمارش باکتری سودوموناس و شمارش کلیفرم‌ها، به ترتیب، نسبت به تیمار شاهد، در روز نهمی آزمون (روز ۱۲ آزمون)، گردیده است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان دهنده تأثیرات هم افزایی<sup>۲</sup>، استفاده توأم اسانس زیره سبز و لیزوزیم، در غلظت‌های مختلف، در ساختار پوشش کیتوزان به منظور کاهش شمارش فاکتورهای میکروبی مورد مطالعه (شمارش کلی باکتری‌های هوازی، شمارش باکتری‌های سرما دوست، شمارش باکتری سودوموناس و شمارش کلیفرم‌ها) در تیمارهای فیله مرغ بود و باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) شمارش فاکتورهای مذکور گردید.

این نتایج با نتایج به دست آمده در تحقیقات امیری و همکاران (۱۳۸۷)، Park و همکاران (۲۰۰۴) [۹] و Nanasombat و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت داشت. [۱۰]

بیشتر تحقیقات مشابه نشان داده بودند که لیزوزیم ۱۰ درصد سبب کاهش تعداد باکتری‌ها می‌شد. در حالی که تحقیقات ما با استفاده از اثرات هم افزایی اسانس زیره سبز در یک درصد تغییرات معنی‌داری را نشان داد و نتایج نشان می‌دهد که مدت زمان ماندگاری محصول فیه مرغ می‌تواند تا بیش از سه روز افزایش داد.

## ۶- منابع

- [1] Amiri.S.Iari.M and Ramezani.R (1387) Antimicrobial activity of lysozyme glycosylated with dextran against gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Eighteenth National Congress of Food Science and Technology.
- [2] Özge Erdohan, Z., Çam, B., Turhan, K. N. (2013). Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*, 119 (2), 308-315.
- [3] Ahmadi, L. (1999). Study on chemical composition of the essential oil from seeds of *Cuminum Cyminum L*. *Iranian J Med Aromatic plants Res*; 6: 97-113.
- [4] Ojagh, S. Rezaei, M. Razavi, H. and Hosseini, M. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food chemistry*.
- [5] National standard of 5272-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part

2. synergistic

- [9] Park, S., Daeschel, M. and Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of food science* 69.8.
- [10] Nanasombat, S. and Lohasupthawee, P. (2005). Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other Enterobacteria. *Journal of science technology*. 5 . 527 – 538.
- 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique
- [6] Karim, G. *Microbiological tests of food*. Tehran university publications
- [7] National standard 4791. *meat and meat products-enumeration of pseudomonas spp.*
- [8] National standard 11166-*microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of coliforms- most probable number technique.*

## Synergistic effect of lysozyme on chitosan-based films including *Cumin* essential oil on the antimicrobial activity

Heydary, M. <sup>1</sup>, Mahasty Shotorbany, P. <sup>2\*</sup>, Akhoundzadeh Basti, P. <sup>3</sup>

1. Islamic Azad University Science and Research Branch, Department of Food Science and Technology
2. Department of food quality control and hygiene, science and research branch, Islamic Azad University, Tehran
3. Department of Food Safty and Hygiene , Science and ResearchBranch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received: 2016/09/03 Accepted: 2016/11/05)

Lysozyme- chitosan-cumin oil films were develop for enhancing the antimicrobial properties of chitosan films. A different concentration lysozyme solution was incorporated in to chitosan 2% film forming solution and 1% oil cumin .The film used for microbial properties of chicken fillets stored at refrigerator. Lysozme and cumin oil releases from the matrix of chitosan film and effect on antibacterial properties such as total mesophilic bacteria, microbial Total bacterial count, Psychrophiles, Coliforms and Pseudomonas . Results showed that 10% lysozyme and 1% cumin oil enhance the efficiency of chitosan film against bacteria in chicken fillet. Statistical results showed that  $3 \log$  cfu/g reduced in mesophilic bacteria in 12 days and  $3 \log$  cfu/g ,  $1.1 \log$  cfu/g ,  $3 \log$  cfu/g in Psychrophiles, Coliforms and Pseudomonas bacteria respectively .So the results showed the synergistic effect of oil cumin and lysozyme in to chitosan –based films . Thus brooding their application enhancing food quality and saftely .

**Key words:** *Cuminum cyminum*, Essential oil, Lysozyme, Synergistic, Antimicrobial properties.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: pmahasti@yahoo.com