Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of the antimicrobial effect of chitosan and whey proteins isolate films containing free and nanoliposomal garlic essential oils against *Listeria monocytegenes, E.coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*

Maysa Yeganmohammadi Davaji, Ali Khanjari, Afshin Akhondzadeh Basti, Saied Bokaie, Narjes Cheraghi, Samira Fayazfar, Sonia Shoja Gharebagh, Fereshteh Ghadami

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/10/11
Accepted: 2016/09/10
Available online: 2016/10/16

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 2016; 10(5): 45-51

Corresponding author at:

Dr. Ali Khanjari

Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Tel: : 0982161117023

Email:

khanjari@ut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Active antimicrobial packaging is an innovative technique that can enhance safety and shelf life of foods. In this study antimicrobial activity of chitosan and whey protein isolate (WPI) films incorporated with free and nano-liposomal garlic essential oil was investigated against *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus.*

Materials and Methods: This study was done in 2015 and disk diffusion method was applied to determine antimicrobial effect of films. Films were cut into circular disks with 9 mm diameter and put on the inoculated BHI agar plates with tested microorganisms. Then plates incubated for 24 h at 37°C. The diameter of inhibition zone was measured by digital caliper. The statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

Results: The results of this study revealed pure chitosan and WPI films alone or incorporated with nano-liposomal garlic essential oil did not show any inhibitory effects on tested microorganisms. Incorporation of 2% or higher concentrations of garlic essential oil to the chitosan solution showed the antibacterial activity of films against all tested microorganisms, whereas when the WPI solution incorporated with 3% or higher concentrations of garlic essential oil the antibacterial activity films was seen against all tested microorganisms. Also the results revealed that *S. aureus* and *L. monocytogenes* were more sensitive to chitosan and WPI films incorporated with garlic essential oil.

Conclusions: Our results declared that the films incorporated with garlic essential oil have the potential to be used as an active antimicrobial packaging.

KeyWords: Chitosan, Whey protein isolate, Essential oil, Garlic, Nano

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Yegan mohammadi M, Khanjari A, Akhondzadeh Basti A, Bokaie S, Cheraghi N, Fayazfar S, et al . Evaluation of the antimicrobial effect of chitosan and whey proteins isolate films containing free and nanoliposomal garlic essential oils against Listeria monocytegenes, E.coli O157:H7 and Staphylococcus aureus. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (5) :45-51

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی اثر ضد میکروبی فیلم‌های بر پایه کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی اسانس سیر و اسانس نانو لیپوزومی سیر برعلیه *لیستریا منوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی* O157:H7 و *استافیلوکوکوس اورئوس*

مایسا یگان محمدی دوجی، علی خنجری، افشین آخوندزاده بستی، سعید بکایی، نرجس چراغی، سمیرا فیاض فر، سونیا شجاع قره باغ، فرشته قدمی

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۹

پذیرش:۱۳۹۵/۰۶/۲۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۵

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1395; 10(5): 45-51

نویسنده مسئول:

دکتر علی خنجری

گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۱۱۱۷۰۲۳

پست الکترونیک:

khanjari@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: بسته‌بندی‌های ضد میکروبی فعال روش نوینی برای افزایش ایمنی و زمان نگهداری مواد غذایی می‌باشد. در این مطالعه اثر ضد میکروبی فیلم‌های کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی اسانس سیر و اسانس نانولیپوزومی سیر بر *لیستریا منوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی* O157:H7 و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: این مطالعه در سال ۱۳۹۳ صورت گرفت و به‌منظور تعیین اثر ضد میکروبی فیلم‌ها از روش انتشار دیسک استفاده شد. فیلم‌ها به‌صورت دیسک‌های مدور با قطر ۹ میلی‌متر بریده شدند و بر روی پلیت های آگار آبگوشت قلب و مغز تلقیح شده با میکرورگانیسم های مورد آزمایش قرار گرفتند. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردید و پس از آن قطر هاله عدم رشد با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید. آنالیز آماری نیز با آزمون واریانس یک‌طرفه به همراه تست تکمیلی توکی صورت پذیرفت.

یافته‌ها: : این مطالعه آشکار ساخت که فیلم‌های کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر به‌صورت خالص یا حاوی اسانس نانولیپوزومی سیر هیچ‌گونه اثر مهاری بر میکروارگانیسم‌های موردمطالعه نداشتند. افزودن اسانس سیر با غلظت ۲ درصد و بالاتر به محلول کیتوزان منجر به ایجاد اثر ضد میکروبی فیلم کیتوزان برعلیه تمام میکروارگانیسم‌ها گردید درحالی‌که افزودن میزان ۳ درصد و بالاتر از اسانس سیر به محلول جدایه پروتئینی آب‌پنیر منجر به اثر ضد میکروبی مذکور شد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که به ترتیب *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* حساسیت بالاتری نسبت به اثر ضد میکروبی فیلم‌های کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی اسانس سیر داشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فیلم‌های حاوی اسانس سیر پتانسیل استفاده به‌عنوان یک بسته‌بندی ضد میکروبی فعال را دارد.

کلمات کلیدی: کیتوزان، جدایه پروتئینی، اسانس، سیر، نانو

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

به‌طور تقریبی هرساله یک‌سوم جمعیت کشورهای پیشرفته به بیماری‌های غذازاد درگیر می‌شوند. در سال ۲۰۱۲ نیز مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها تخمین زده که هرساله در حدود ۱۲۸۰۰۰ نفر به علت بیماری‌های غذازاد در بیمارستان بستری‌شده و ۳۰۰۰ نفر نیز جان خود را ازدست‌داده‌اند (۲-۱). جهت کاهش خطرات حاصل از عوامل بیماری‌زای غذازاد و همچنین افزایش زمان نگهداری مواد غذایی از روش‌های مختلفی مانند اشعه دهی، فشار بالا، پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می‌گردد. ازآنجایی‌که در رابطه با برخی از مواد غذایی استفاده از این روش‌ها مطلوب نمی‌باشد، لذا استفاده از بسته‌بندی‌های فعال می‌تواند بسیار کاربردی باشد (۳). بسته‌بندی فعال نوعی بسته‌بندی می‌باشد که با ایجاد تغییرات شیمیایی یا بیولوژیک در محتویات یا فضای داخل بسته‌بندی ایمنی و مدت‌زمان نگهداری ماده غذایی را افزایش می‌دهد

(۳-۴). به‌منظور تولید بسته‌بندی‌های فعال بر پایه فیلم زیست‌تخریب‌پذیر می‌توان از پلی ساکاریدهایی نظیر کیتوزان و پروتئین‌هایی مانند جدایه های پروتئینی آب‌پنیر به‌عنوان پایه فیلم بسته‌بندی و ترکیبات ضد میکروبی ازجمله اسانس‌ها استفاده نمود. کیتوزان یک پلیمرکربوهیدرات تغییریافته است که از داستیلاسیون کیتین به دست می‌آید و امکان استفاده از آن در مواد غذایی مختلف وجود دارد (۵-۷). جدایه پروتئینی آب‌پنیر به دلیل داشتن ویژگی‌های کاربردی نظیر حلالیت، خاصیت امولسیفایری، توانایی ایجاد کف، توانایی ایجاد چسبندگی یا ویسکوزیته موردتوجه صنایع غذایی قرارگرفته و می تواند در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی استفاده شود (۸-۹). تاکنون مطالعات مختلفی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی را تأیید نموده‌اند. ازجمله گیاهانی که می‌توان جهت استخراج اسانس از آن بهره برد گیاه سیر می‌باشد. سیر با نام علمی *Allium sativum*، گیاهی است از راسته مارچوبه‌سانان که دارای خواص ضد میکروبی، ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، کاهنده قند خون و محافظت‌کنندگی از سیستم قلب و عروق می‌باشد (۸، ۱۰، ۱۱). فن‌آوری نانو جزو فناوری‌های نوینی است که در صنایع مختلف ازجمله صنعت بسته‌بندی مواد غذایی از آن می‌توان بهره برد. ازجمله مزایای نانوکپسوله کردن ترکیبات مختلف می‌توان به ارتقای ثبات و پایداری مواد کپسوله‌شده با محافظت از آن‌ها در برابر تغییرات شیمیایی، آنزیمی، محیطی و تغییرات قدرت یونی و همین‌طور پوشاندن طعم و بوی ناخواسته اشاره کرد (۱۲-۱۵).

تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با اثرات ضد میکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر خوراکی حاوی اسانس‌های مختلف صورت گرفته ازجمله مطالعه Moradi و همکاران (۲۰۱۱) بر روی اثر ضد میکروبی فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی و مطالعه Seydim و Sarikus (۲۰۰۶) بر روی اثر ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب‌پنیر حاوی اسانس سیر، لیکن تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثر ضد میکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی اسانس نانولیپوزومی سیر و همچنین مقایسه اثر ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس نانولیپوزومی سیر و اسانس آزاد سیر صورت نگرفته است (۶، ۸، ۱۲).

هدف کلی از این مطالعه ارزیابی و مقایسه اثر فیلم‌های کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی اسانس سیر و اسانس سیر نانولیپوزومی بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس و آنالیز آن

اسانس سیر به روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر با استفاده از حبه‌های سیر فشرده و له‌شده به دست آمد. آنالیز ترکیبات اسانس نیز طبق روش استاندارد توسط دستگاه گازکروماتوگراف مجهز به طیف سنجی جرمی (GC; Thermoquest 2000, Finnigan MassLab Group, Manchester, U.K.) انجام شد (۱۰).

تولید و آماده‌سازی نانولیپوزوم ها

روش تولید نانولیپوزوم

برای تولید نانولیپوزوم ابتدا ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فسفولیپید، ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کلسترول و مقادیر موردنظر از غلظت‌های اسانس سیر در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل گردید و توسط همزن مغناطیسی هم زده شد سپس با استفاده از یک پمپ متصل به سرنگ به داخل ۲۰ میلی‌لیتر فاز آبی که بر روی‌همزن مغناطیسی با دور ۴۰۰ rpm قرار داشت، تزریق گردید. پس از تشکیل لیپوزوم ها، محلول به مدت ۱۵ دقیقه دیگر بر روی هم زن هم زده شد و درنهایت با استفاده از روتاری فاز آبی و اتانول جدا گردید. سوسپانسیون حاوی اسانس نانولیپوزومی در دمای یخچالی نگهداری گردید (۱۳، ۱۵، ۱۶).

ارگانیسم‌های مورداستفاده

در این مطالعه از سه میکروارگانیسم *لیستریا منوسیتوژنز* (ATCC ۱۹۱۱۸)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۶۵۱۳۸) و *اشریشیاکلی* O157:H7 (ATCC ۳۵۲۱۸) که از گروه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی تهیه‌شده بود، استفاده گردید.

آماده‌سازی کشت‌های باکتریایی

برای تهیه میزان تلقیح باکتری‌های موردمطالعه، طبق روش استاندارد میکروارگانیسم‌های ذخیره‌شده در ۲۰- درجه سلسیوس داخل میکرواپندورف را به محیط آبگوشت قلب و مغز منتقل کرده و دو بار متوالی به مدت ۲±۱۸ ساعت در ۲±۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری نمودیم. سپس لوله‌های کووت حاوی ۴ میلی‌لیتر آبگوشت قلب و مغز استریل تهیه شد. مقادیر مختلفی

از کشت آبگوشت ۱۸ ساعته دوم به لوله‌های کووت مذکور اضافه شد. آنگاه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Milton Ray Company, USA) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری لوله‌های مذکور قرائت گردید. همزمان با عمل فوق از محتویات لوله‌های کووت رقت‌های مختلف تهیه‌شد و کشت در پلیت جهت شمارش باکتری‌ها صورت گرفت (۱۰).

آماده‌سازی فیلم

فیلم‌های بر پایه جدایه های آب‌پنیر

جهت تولید این فیلم‌ها، پودر جدایه پروتئینی آب‌پنیر (Davisco) در آب مقطر حل گردید تا محلول با غلظت ۵٪ به دست آید، سپس گلیسرول (۵-۴٪) را به‌عنوان پلاستی سایزر به محلول حاصل اضافه نموده و pH با سود ۲ نرمال به ۸ رسانده شد و محلول بصورت مداوم هم زده و حرارت داده شد تا به دمای ۲±۹۰ درجه سلسیوس برسد. طی ۵ دقیقه آخر حرارت دادن میزان ۰/۸-۰/۶ درصد موم کاندلیلا به محلول حاصله اضافه گردید. سپس محلول را از کاغذ صافی عبور داده و پس از خنک شدن دردمای اتاق، ۰/۲۵ درصد توین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر و همچنین غلظت‌های موردنظر اسانس سیر و اسانس سیر نانولیپوزومی (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ v/v ٪) افزوده گردید و به‌خوبی با هموژنایزر با دور ۱۳۶۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس با استفاده از پمپ خلأ به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه هوای داخل محلول را خارج کرده و محلول در داخل ظروف تفلون ریخته شد و در نهایت در آون ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۶ ساعت خشک گردید (۹-۸).

فیلم‌های بر پایه کیتوزان

برای تولید این فیلم‌ها، پودرکیتوزان ساخت شرکت سیگما آلدریچ با وزن مولکولی بالا در اسیداستیک ۱٪ حل گردید تا محلول ۲٪ به‌دست آید، این محلول به مدت یک شب دردمای اتاق هم زده شد و سپس با استفاده از کاغذ صافی شماره ۳ صاف گردید و پس از افزودن گلیسرول (۰/۵ میلی‌لیتر به ازای گرم کیتوزان) به‌عنوان پلاستی سایزر و ۰/۲۵ درصد توین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر مجددا به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس pH محلول با استفاده از سود روی ۵/۸ تنظیم گردید. پس از آن با افزودن غلظت‌های موردنظر اسانس سیر و اسانس سیر نانولیپوزومی (۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ v/v ٪) و هموژن کردن آن با هموژنایزر در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه، فیلم‌ها در ظروف تفلون قالب‌گیری شده و به مدت ۳۶ ساعت در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند (۱۷، ۶، ۵).

تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها به روش سنجش انتشار دیسک تعیین گردید، بدین‌صورت که محیط آگار آبگوشت قلب و مغز با ۱۰۰ میکرولیتر کشت باکتری که حاوی ۱×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر بود تلقیح گردید، سپس دیسک‌هایی از فیلم‌های مذکور حاوی غلظت‌های موردنظر از اسانس سیر که به قطر ۹ میلی‌متر پانچ شده بودند در مرکز پلیت قرار داده شد و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند و ناحیه ممانعت از رشد به‌صورت هاله شفاف اطراف فیلم‌ها با کولیس دیجیتال برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (۹).

تجزیه‌وتحلیل آماری

نرم‌افزار (SPSS for Windows, Version 16.0. Chicago, SPSS Inc, USA) SPSS جهت انجام آزمون های آماری به کار گرفته شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه، به همراه تست تکمیلی توکی استفاده گردید.

نتایج

بازده اسانس گیری در این مطالعه ۰/۳۳ درصد به دست آمد. نتایج آنالیز اسانس نشان داد که ترکیبات اسانس سیر مورداستفاده، به ترتیب میزان، شامل دی آلیل تری سولفید (۲۳/۱۲)، دی آلیل دی سولفید (۲۲/۵۴) و متیل آلیل تری سولفید (۲۰/۰۵)، پروپنیل دی تیوپروپانات (۱۱/۲۹)، دی متیل تری سولفیت (۳/۲۰)، ۳-وینیل -۱-۲-دیتین (۲/۱۹)، ۲-وینیل- ۱-۳- دیتین (۲/۱۱) و دی آلیل تترا سولفید (۱/۸۴) بود.

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزودن ۲ درصد اسانس سیر به فیلم‌های کیتوزان اثر ضد میکروبی بر علیه تمامی میکروارگانیسم های مورد مطالعه مشاهده می‌شود. همچنین بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد در اطراف فیلم های کیتوزان حاوی غلظت ۴ درصد اسانس مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین قطر هاله عدم رشد در این غلظت مربوط به *اشریشیاکلی* بود.

جدول ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد و انحراف معیار باکتری‌های مختلف در تماس با فیلم کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس سیر

نام باکتری	غلظت ۰ درصد	غلظت ۱ درصد	غلظت ۲ درصد	غلظت ۳ درصد	غلظت ۴ درصد
اشریشیاکلی O157:H7	۰ ^{aA}	۰^{aA}	۱۰/۸±۰/۸ ^{bA}	۱۱/۰±۱/۰ ^{bA}	۱۱/۵±۰/۵ ^{bA}
لیستریا منوسیتوژنز	۰ ^{aA}	۱۲/۰±۱/۰ ^{bB}	۱۵/۳±۱/۵ ^{bB}	۱۷/۷±۱/۲^{bB}	۲۳/۳±۲/۱^{dB}
استافیلوکوکوس اورئوس	۰ ^{aA}	۱۲/۳±۱/۵ ^{bcB}	۱۵/۰±۳/ ۵ ^{cdB}	۱۶/۳±۳/۱ ^{bdB}	۲۷/۳±۴/۰^{eB}

تفاوت معنی‌دار داده‌های حاصله برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها در غلظت های مختلف اسانس با حروف کوچک متفاوت نشان داده‌شده است. همچنین تفاوت معنی‌دار داده‌های حاصله بین میکروارگانیسم‌ها درهرغلظت اسانس با حروف بزرگ مختلف نشان داده‌شده است.

در رابطه با فیلم‌های جدایه پروتئینی آب‌پنیر نیز همانند فیلم‌های کیتوزان هرچند که روند ایجاد قطر هاله عدم رشد منظم نیست، ولی به‌طورکلی می‌توان گفت با افزایش غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). درمجموع نیز بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد در رابطه با *لیستریا منوسیتوژنز* دیده شد. همچنین تا غلظت ۳ درصد اسانس سیر هیچ‌گونه هاله عدم رشدی اطراف دیسک‌ها در رابطه با *اشریشیاکلی* دیده نشد.

جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد و انحراف معیار باکتری‌های مختلف در تماس با فیلم جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی غلظت‌های مختلف اسانس سیر

نام باکتری	غلظت ۰ درصد	غلظت ۱ درصد	غلظت ۲ درصد	غلظت ۳ درصد	غلظت ۴ درصد
اشریشیا کلی O157:H7	۰ ^{aA}	۰ ^{Aa}	۰ ^{Aa}	۱۰/۷±/۰/ ۶ ^{bA}	۱۵/۳±۰/۶ ^{cA}
لیستریا منوسیتوژنز	۰ ^{aA}	۰ ^{aA}	۱۱/۰ ±۱/۰ ^{bB}	۱۵/۳±۱/۵^{cB}	۱۷/۳±۱/۲^{cA}
استافیلوکوکوس اورئوس	۰ ^{aA}	۰ ^{aA}	۱۰/۳±۰/ ۶ ^{bB}	۱۴/۷±۱/۲^{bB}	۱۵/۷±۲/۱^{bA}

تفاوت معنی‌دار داده‌های حاصله برای هر یک از میکروارگانیسم‌ها و میزان غلظت اسانس با حروف کوچک متفاوت نشان داده‌شده است. همچنین تفاوت معنی‌دار داده‌های حاصله بین میکروارگانیسم‌ها درهرغلظت اسانس با حروف بزرگ مختلف نشان داده‌شده است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که فیلم‌های تهیه‌شده از کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر حاوی اسانس نانولیپوزومی سیر در بالاترین غلظت (۴ درصد) نیز توانایی ایجاد هاله عدم رشد در مورد هیچ‌کدام از باکتری‌ها نداشتند.

بحث

در رابطه با نتایج حاصل از آنالیز اسانس نکته حائز اهمیت وجود ترکیبات گوگرددار می‌باشد که دارای اثرات ضد میکروبی بوده و بالاترین میزان آن‌ها مربوط به دی آلیل تری سولفید می‌باشد که این ترکیب از هیدرولیز آلیسین مشتق شده و دارای اثرات ضد میکروبی قوی می‌باشد. از دلایل متفاوت بودن ترکیبات اسانس سیر مورداستفاده با سایر اسانس‌های به‌دست‌آمده توسط برخی محققین ازجمله اسانس سیر استحصالی توسط Ghanbarzadeh و همکاران (۲۰۱۱)، که بیشترین ترکیب در اسانس آن‌ها دی آلیل دی سولفید بود، می‌توان به تغییرات محیطی فصل‌ها و هم‌چنین زمانی از سال که گیاه کاشته شده، تفاوت در مواد مغذی در دسترس برای رشد گیاه، میزان در معرض نور بودن، منطقه جغرافیایی کشت گیاه و میزان آب اشاره نمود (۱۸–۱۹).

یافته‌های این مطالعه نشان داد که فیلم کیتوزان و جدایه پروتئینی آب‌پنیر به‌صورت خالص هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی بر روی میکروارگانیسم‌های موردمطالعه نداشتند که با نتایج Shakeri و همکاران (۲۰۱۱) و Pranoto و همکاران (۲۰۰۵) مشابهت داشت. (۱۷، ۹) ازجمله دلایل تفاوت در نتایج مطالعه حاضر که حاکی از عدم تأثیر ضد میکروبی فیلم کیتوزان می‌باشد و برخی از مطالعات دیگر که تأثیر ضد میکروبی فیلم کیتوزان را نشان داده‌اند می‌توان به تفاوت در وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون کیتوزان های مورداستفاده در مطالعات مختلف اشاره نمود. در رابطه با اثر ضد میکروبی فیلم‌های جدایه پروتئینی آب‌پنیر نیز اکثر محققین تأکید بر عدم تأثیر آن بر روی میکروارگانیسم‌ها دارند.

در مورد اثر ضد میکروبی فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس سیر مشخص گردید که قطر هاله عدم رشد اطراف فیلم های حاوی اسانس سیر در رابطه با باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری گرم منفی بیشتر است که با نتایج Du و همکاران (۲۰۱۱)، Soleymani و همکاران (۲۰۱۰) و Mehdizadeh و همکاران (۲۰۱۲) و Tavakoli و همکاران (۲۰۱۵) همخوانی داشت. (۲۲، ۲۱، ۲۰، ۵) احتمالاً حساسیت کمتر باکتری‌های گرم منفی به اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های حاوی اسانس سیر می‌تواند به علت وجود غشا خارجی اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد که ورود ترکیبات آب‌گریز اسانس را به لایه لیپو پلی ساکاریدی محدود می‌کند یا به علت وجود فضای پری پلاسم حاوی آنزیم‌های محافظت‌کننده باشد.

مطالعه Gortzi و همکاران (۲۰۰۷) بر روی فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره پونه کوهی، پیش و بعد از نانوانکپسوله شدن، نشان داد که فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره پس از نانو انکپسوله شدن در لیپوزوم، افزایش یافت (۱۲). همچنین تحقیق Liolios و همکاران بر روی ترکیبات تیمول و کارواکرول نانوانکپسوله جداشده از اسانس روغنی پونه کوهی، نشان داد که فعالیت ضد میکروبی هر دو ترکیب نانوانکپسوله شده، افزایش یافت (۱۳). لیکن مطالعه Makwana و همکاران (۲۰۱۴) در رابطه با اثر ضد میکروبی سینامالدهید نانوانکپسوله در ساختار فیلم پلی لاکتیک اسید نشان داد که درصورتی‌که سینامالدهید بر روی فیلم پوشش داده شود اثر ضد میکروبی نخواهد داشت (۱). از دلایل تفاوت در نتایج مطالعات مذکور با این مطالعه می‌توان به نوع ترکیب انکپسوله‌شده، نحوه تولید ترکیب نانوانکپسوله و استفاده از ترکیب نانولیپوزوم در ساختار فیلم اشاره نمود. همچنین سایر دلایل عدم ایجاد هاله عدم رشد در فیلم‌های حاوی اسانس سیر نانولیپوزومی می‌توان به داشتن پوشش لیپوزوم در اطراف اسانس، دیرتر آزاد شدن اسانس نانوانکپسوله نسبت به فرم آزاد، روش تهیه اسانس نانولیپوزومی، کمتر بودن درصد مؤثر اسانس موجود در نسبت به حالت معمولی آن است. بنابراین با توجه به نتیجه این مطالعه پیشنهاد می‌شود به‌منظور تولید اسانس نانولیپوزومی سیر از روش لایه‌نازک (بنگام) استفاده شود و فعالیت ضد میکروبی اسانس مذکور مورد مطالعه قرار گیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فیلم‌های حاوی اسانس سیر پتانسیل استفاده به‌عنوان یک بسته‌بندی ضد میکروبی فعال را دارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از آقایان دکتر علی ذبیحی محمودآبادی و دکتر امین خطیبی دانش‌آموخته دکترای بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بابت همکاری در تولید اسانس سیر نانولیپوزومی کمال تشکر و قدردانی رادارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Makwana S, Choudhary R, Dogra N, Kohli P, Haddock J. Nanoencapsulation and immobilization of cinnamaldehyde for developing antimicrobial food packaging material. LWT-Food Sci Technol 2014;57 (2):470-6.
2. CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States. (2012). Centers for disease control and prevention. Retrieved April 14, 2012, from http://www.cdc.gov/ foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html
3. Günlü A, Koyun E. Effects of vacuum packaging and wrapping with chitosan based edible film on the extension of the shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets in cold storage (4°C). Food Bioprocess Tech 2013;6 (7):1713-9.
4. Salmieri S, Islam F, Khan RA, Hossain FM, Ibrahim HM, Miao C, Hamad WY, Lacroix M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly (lactic acid)–cellulose nanocrystals (PLA–CNC) in food applications—part B: effect of oregano essential oil release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in mixed vegetables. Cellulose 2014;21 (6):4271-75.
5. Mehdizadeh T, Tajik H, RazaviRohani SM, Oromiehie, AR. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. Vet Res Forum 2012; 3(3): 167 – 73. [in persion]
6. Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, Oromiehie AR. Effectiveness of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract impregnated chitosan film on ready-to-eat mortadella-type sausages during refrigerated storage. J Sci Food Agric 2011;91 (15):2850-7. [in persion]

7. Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. Food Control 2013;30 (2):386-392.
8. 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.
9. Shakeri MS, Shahidi F, Beiraghi-Toosi S, Bahrami A. Antimicrobial activity of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil incorporated with whey protein based films on pathogenic and probiotic bacteria. Int J Food Sci Tech 2011;46 (3):549-54. [in persion]
10. Basti AA, Mashak Z, Khanjari A, Rezaei A, Mohammadkhan F, Taheri MA, Faghih Fard P, Tayar N. The study on the effects of garlic Essential oil on growth curve and TDH toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*. JMP 2014;2 (50):156-62. [in persion]
11. Chand B. Antibacterial effect of garlic (*AlliumSativum*) and Ginger (*ZingiberOfficinale*) against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia Coli* and *Bacillus Cereus*. J Microb Biotech Food Sci 2013;2 (4):2481-91.
12. Gortzi O,Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Evaluation of th**e** Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Origanum dictamnus* Extracts before and after Encapsulation in Liposomes, Molecule. 2007**;**12 (5): 932-45
13. Liolios SS, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. Food Chem 2009;112 (1):77–83
14. Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A, Yurdugul S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology, Int J Food Prop 2008;11 (4):833-44.
15. Sebaaly C, Jraij A, Fessi H, Charcosset C, Greige-Gerges H. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food chem 2015;178:52-62.
16. Jaafar-Maalej C, Roudayna D, Veronique A, Abdelhamid E, Hatem F. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. J Liposome Res 2010; 20 (3):228–43
17. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT - Food Sci Technol 2005;38 (8): 859-65.
18. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol 2004;94 (3):223-53.
19. Ghanbarzadeh B, Almasi H. Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. Int J Biol Macromol 2011;48 (1): 44-49. [in persion]
20. Soleymani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S, Derakhshan. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of *Bunium persicum* essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria. Iran J Med Microbiol 2010;4 (1):26-34. [in persion]
21. Du WX, Avena-Bustillos RJ, Hua SST, McHugh TH. Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances", A. Mendez-Vilas (ed.) 2011; 1124-34.
22. Tavakoli HR, Mashak Z, Moradi B, Sodagari HR. Antimicrobial activities of the combined use of *Cuminum cyminum* L. essential oil, nisin and storage temperature against *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in vitro. JJM 2015;8 (4) e24838. [in persion]