

به کارگیری پوشش خوراکی (Edible Coating) حاوی عصاره الکلی آویشن شیرازی به جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی مغز پسته (Zataria multiflora)

مجید جوانمرد^۱، یوسف رمضان^۲

۱- استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع شیمیایی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، میدان فردوسی، خیابان شهید موسوی (فرصت) پلاک ۷۱، گروه صنایع غذایی، پژوهشکده صنایع شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، صندوق پستی: ۳۵۳۸ - ۱۵۸۱۵

تلفن و نامبر: ۰۲۱ ۸۸۸۳۸۳۲۴

پست الکترونیک: javanmard@irost.ir

تاریخ تصویب: ۸/۲/۲۰۲۴

تاریخ دریافت: ۷/۷/۲۰۲۴

چکیده

مقدمه: بسته‌بندی ضدمیکروبی نوعی بسته‌بندی فعال محسوب شده که توانایی بهبود و افزایش ماندگاری غذا را داشته و موجب سلامت میکروبی این مواد جهت مصرف کنندگان می‌شود. به منظور کنترل میکروارگانیسم‌های ناخواسته بر روی سطوح غذایها، می‌توان عوامل ضدمیکروبی فرار و غیر فرار را در ساختار پلیمرها وارد نمود. افزودن عصاره‌های گیاهی و سایر عوامل ضدقارچی در ترکیب پوشش‌ها و فیلم‌های خوراکی به عنوان بسته‌بندی ضدمیکروبی، توانایی مهار رشد قارچی بر روی پسته و عدم تولید آفلاتوکسین را دارا می‌باشند.

هدف: هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره آویشن شیرازی^۱ بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس و امکان استفاده از آن در پوشش خوراکی بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیر در مغز پسته بوده است.

روش بررسی: اثر ضدقارچی عصاره آویشن شیرازی با بررسی مهار رشد قارچ در سطح محیط کشت انجام شد. از طریق تاثیر عصاره به طور مستقیم (روش چاهک) و هم‌چنین استفاده از دیسک‌هایی که از فیلم‌های پروتئین آب پنیر و حاوی رقت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۱، ۱/۰۵ و ۲ (میکرولیتر در ۱۰۰ میلی لیتر محلول پوشش دهنی) از عصاره تهیه شده بودند، اثرات ضدقارچی عصاره بررسی شد. جهت بررسی اثر عصاره بر روی آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته از مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm عصاره در ترکیب پوشش خوراکی مغز پسته استفاده شده و میزان مهار گسترش رشد دیسک تلقیح شده حاوی کشت ۹ روزه قارچ بر روی پسته‌های پوشش دیده اندازه گیری شد.

نتایج: در شرایط آزمایشگاهی حداقل غلظت مهاری رشد عصاره آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس ۹۰ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره الکلی تعیین شد. عصاره الکلی آویشن شیرازی به مقدار ۲۵۰۰ ppm (غلظت ۴۸ درصد) در ترکیب پوشش پروتئین آب پنیر در مغز پسته‌های سترون به طور کامل از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی این مغزها جلوگیری نمود.

نتیجه گیری: با توجه به جنبه‌های اقتصادی اهمیت کنترل آلودگی به قارچ‌های مولد توکسین در مغز پسته، به کارگیری عصاره آویشن شیرازی در ترکیب پوشش‌های خوراکی برای کنترل رشد قارچ‌ها و در نهایت جلوگیری از تولید توکسین در غذاها توصیه می‌شود.

گل واژگان: پسته، پوشش‌های خوراکی ضدمیکروبی، آویشن شیرازی، پروتئین آب پنیر، آسپرژیلوس فلاووس

^۱ Zataria multiflora



مقدمه

از روش‌های بیولوژیکی جهت کنترل تولید این سموم، به کارگیری عصاره‌های گیاهی ضدقارچی می‌باشد [۲].

در سالیان اخیر، تحقیقات بر روی بسته‌بندی مواد غذایی بیشتر بر روی فیلم‌های زیست سازگار^۱ از جمله فیلم‌های تهیه شده از پروتئین‌های خوراکی با منشای گیاهی و حیوانی (زئین، گلوتن گندم، سویا و بادام زمینی، آلبومین، ژلاتین، کلازن، کازئین و پروتئین‌های آب پنیر) استوار بوده است [۱۰]. به کارگیری پوشش‌های خوراکی یک رهیافت جایگرین برای بسته‌بندی، افزایش ماندگاری و بازارپسندی بیشتر و هم‌چنین رفع معلول زیست محیطی ناشی از پسمانده‌های مواد بسته‌بندی محسوب می‌شود. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر^۲ دارای نفوذپذیری پایین نسبت به گاز اکسیژن می‌باشند [۱۱].

بسته‌بندی ضدمیکروبی^۳ نوعی بسته‌بندی فعلی^۴ محسوب شده که می‌تواند ماندگاری فرآورده‌های غذایی را افزایش داده و سلامت آن‌ها را از نظر میکروبی تأمین نماید [۱۲]. این نوع بسته‌بندی باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکرووارگانیسم‌ها در بسته‌بندی و مواد غذایی می‌شود. به منظور کنترل میکرووارگانیسم‌های نامطلوب در سطوح مواد غذایی مواد ضدمیکروبی فرار و غیرفرار می‌توانند در داخل پلیمرهای بسته‌بندی به کار گرفته شوند.

اویشن شیرازی^۵ متعلق به خانواده Laminaceae بوده و گیاه بومی ایران می‌باشد. این گیاه به طور سنتی به عنوان طعم‌دهنده در غذا به ویژه ماست به کار گرفته می‌شود [۱۳]. ترکیب اصلی اسانس روغنی این گیاه شامل ترکیبات فنلی همانند کارواکرول^۶ و تیمول^۷ می‌باشد [۱۴]. در سالیان اخیر علاقه فزاینده‌ای جهت به کارگیری از عصاره‌های گیاهی برای بهبود ماندگاری مواد غذایی، تاخیر رشد قارچ‌ها و جلوگیری از تولید سموم قارچی به وجود آمده است. مطالعات متعددی بر روی کارایی ضدقارچی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است

پسته یکی از شناخته شده‌ترین مغزهای درختی محسوب می‌شود [۱]. گیاه پسته درختی است که به گفته‌ای بومی آسیای مرکزی و به گفته دیگر بومی آسیای غربی و آسیای صغیر شناخته شده است. در میان گونه‌های مختلف درختان پسته، تنها میوه‌ی درخت پسته معمولی خوراکی، مطبوع و خوشمزه است. سرزمین ایران قرن‌ها بدون رقیب بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته جهان بوده است ولی در حال حاضر کشورهای دیگری نیز در زمینه تولید و تجارت پسته با ایران به رقابت برخاسته‌اند. ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان پسته محسوب می‌شود [۲]. ایران در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۴۵ هزار تن از پسته را به کشورهای مختلف صادر کرده و در سال ۲۰۰۶ بیش از ۲۵۰ هزار تن از این فرآورده را تولید نموده است [۳].

آسپرژیلوس فلاووس یکی از قارچ‌های مولد آفلاتوكسین در غذای انسان و حیوانات می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده گونه‌های آسپرژیلوس از روی پوسته نرم، پوسته سخت و مغز پسته ایران جدا شده است [۴]. از مهم‌ترین قارچ‌های تولیدکننده آفلاتوكسین که از پسته جدا شده‌اند می‌توان از آسپرژیلوس پارازیتیکوس^۸ و آسپرژیلوس فلاووس^۹ نام برد. این دو گونه، سموم B1، B2، B1، G1 و G2 را تولید می‌کنند [۵]. تحقیقات نشان داد که در ایران [۶،۷] و سایر کشورهای تولیدکننده پسته [۹،۸] آلدگی پسته به گونه‌های آسپرژیلوس در طول مراحل رسیدگی محصول در باغ ایجاد می‌شود. برای داشتن فرآورده‌ی سالم و عاری از سموم قارچی موضوع از دو جهت قابل بررسی است. یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوكسین و روش‌های پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روش‌های سالم‌سازی فرآورده آلدگی به این گونه سموم است که در صورت عدم موفقیت در پیشگیری از تولید آفلاتوكسین لازم‌الاجرا هستند. بدیهی است برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها بهترین روش تولید پسته‌های استاندارد است. یکی

¹ Biodegradable

² Whey Protein

³ Antimicrobial Packaging

⁴ Active Packaging

⁵ Zataria multiflora Boiss.

⁶ Carvacrol

⁷ Thymol

¹ Aspergillus parasiticus

² Aspergillus flavus



[۱۵، ۱۶، ۱۷]

کرده و پس از پودر کردن توسط آسیاب برقی، در داخل بشر با ۱۲۰ میلی لیتر حلال اتانول/ آب (۷۵ درصد الکل و ۲۵ درصد آب) به نسبت ۶ قسمت محلول الکلی به ۱ قسمت پودر اضافه شده و سپس داخل انکوباتور لرزاننده^۱ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت تا عصاره‌گیری انجام شود. سپس توسط خلاء بخش مایع از تعاله‌ها جدا و در دستگاه روتاری خلاء، حلال از عصاره جدا شد. پس از حذف کامل حلال در دستگاه روتاری تحت خلاء با توزین ماده خشک باقی مانده بازده استخراج عصاره الکلی آویشن شیرازی تعیین می‌شود. ماده خشک باقی مانده به منظور استفاده در آزمایش‌ها باید رقیق شود، برای این منظور اولیه که توسط روتاری حذف شده استفاده می‌شود پس از اضافه کردن حلال تا جایی که ماده خشک به طور کامل حل شود کار را ادامه می‌دهیم و در نهایت با محاسبه میزان حلال الکلی افروده شده به ماده خشک غلظت عصاره الکلی محاسبه می‌شود که در پژوهش حاضر غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی ۴۸ درصد می‌باشد. عصاره الکلی تهیه شده در داخل یک بطری سترون و تیره تا زمان بررسی اثر بر روی قارچ در شرایط یخچال نگهداری شد.

میزان تاثیر عصاره الکلی آویشن شیرازی

الف) شمارش آسپرژیلوس فلاووس

برای بررسی تاثیر عصاره‌ای گیاهی بر روی رشد قارچ ابتدا میزان مشخصی از اسپورهای قارچی تهیه شد. به همین منظور از کشت لیوفیلیزه قارچ آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006)^۲ بر روی محیط کشت جامد شیبدار و گرمخانه گذاری آن در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت یک هفت‌هه صورت گرفت و سپس این محیط با استفاده از محلول تؤین ۵/۰ درصد به منظور تهیه شسته شد. برای شمارش اسپورهای قارچی شسته شد. برای شمارش اسپورهای قارچی از لام ثوبار استفاده شد. پس از شمارش تعداد ۱۰۶ از اسپور قارچی جهت بررسی انتخاب شد.

¹ Shaker incubator² SDA

هدف از این تحقیق اولاً بررسی اثر ضدقارچی عصاره الکلی آویشن شیرازی بر علیه رشد قارچ توکسین‌زای آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی و ثانیاً بررسی امکان استفاده از این عصاره در ساختار پوشش خوراکی شده از پروتئین آب پنیر جهت تولید پوشش خوراکی ضدقارچی به منظور جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی معزز پسته بوده است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از رقم پسته اکبری استفاده شد. پسته خام پس از تهیه از بازار تا زمان خشک کردن در محیط تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. گلیسروول به عنوان پلاستی سایزر^۱ از شرکت Merck آلمان و کنسانتره پروتئینی آب پنیر نیز از شرکت Arla دانمارک خریداری شد. عصاره الکلی گیاه آویشن نیز در پژوهشکده صنایع شیمیایی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شد. قارچ آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006) از مرکز کلکسیون قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شد.

خشک کردن پسته

نمونه‌های پسته خام (بدون آفت‌زدگی و نارسی) پس از برداشت، جدا کردن پسته نرم، خندان کردن و خشک کردن آماده پوشش دهی می‌شود. عملیات خشک کردن توسط دستگاه خشک کن با جابجایی هوای داغ (ساخت شرکت کروگ- آلمان) انجام شد. درجه حرارت خشک کن ۵۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان خشک کردن ۴۸ ساعت به طول انجامید.

روش عصاره‌گیری

عصاره‌گیری بر اساس روش دورلینگ^۲ و همکاران انجام شد [۱۷]. ۲۰ گرم از برگ و ساقه گیاه آویشن شیرازی را وزن

۱. Plasticizer: ترکیباتی با فرآوریت پایین هستند که در فیلم‌های پلیمری برای افزایش میزان انعطاف پذیری آنها اضافه می‌شوند.

² Durling

ممانعت کنندگی عصاره الكلی آویشن شیرازی در محیط کشت تعیین شد.

ج) تعیین فعالیت مهاری عصاره در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش انتشار از دیسک

ابتدا بر اساس روش طرح شده در تحقیق شاو^۱ و همکاران (۲۰۰۲) فیلم خوراکی از پروتئین آب پنیر تهیه شد [۱۸]. در این روش ابتدا یک محلول ۱۰ درصد از کنسانتره پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه شد. جهت حل شدن بهتر کنسانتره این مخلوط به مدت ۱ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس جهت دناتوره شدن پروتئین‌ها در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن تا دمای اتاق خنک شده و به وسیله سود ۱ نرمال pH آن روی ۷ تنظیم شد. گلیسروول به محلول تهیه‌کننده پوشش به گونه‌ای اضافه شد که نسبت گلیسروول/پروتئین برابر $۰/۶$ (وزن/وزن) حاصل شود. مقادیر ۲۵ ، ۱۰۰ ، ۷۵ ، ۵۰ ، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۳۰ درصد را به محلول تشکیل‌دهنده فیلم اضافه نمودیم. مقدار ۱۴ میلی‌لیتر از محلول فیلم را در داخل پلیت‌های پلاستیکی ستون با قطر ۱۰ سانتی‌متر وارد نموده و در زیر هود بیولوژیک قرار دادیم تا فیلم‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی خشک شوند. از هر کدام از فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف عصاره، حاوی الكل و بدون عصاره و الكل دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر نظری دیسک‌های مورد استفاده در آزمون آنتی‌بیوگرام تهیه شد. این دیسک‌ها سپس در وسط چهار منطقه پیرامونی پلیت‌های تلقیح شده با $CFU^{۱}$ ۱۰ قارچ آسپرژیلوس فلاووس قرار گرفته و فعالیت ضدقارچی را با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله مهاری اطراف دیسک‌ها تعیین نمودیم. بررسی ناحیه مهار رشد^۲ بر روی محیط کشت جامد، جهت تعیین اثرات ضدمیکروبی فیلم در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار گرفتند (شکل شماره ۱). سپس

ب) تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی MIC

برای بررسی تاثیر عصاره بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس ابتدا بر روی محیط سابورود دکستروز آگار از سوسپانسیون حاوی ۱۰۶ از اسپور قارچی پخش نموده و سپس چاهک^۳‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر بر روی محیط کشت ایجاد نموده و مقداری از عصاره با غلظت ۳۰ درصد را تا میزانی که گوده‌ها پر شوند، در آن قرار دادیم. به عنوان شاهد در داخل گوده ۲۵ دیگر الكل (حال) را ریختیم و پس از گرمخانه گذاری در درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز میزان مهار یا عدم مهار رشد را از طریق اندازه‌گیری قطر ناحیه مهاری رشد اطراف چاهک در مقایسه با گوده حاوی الكل (شاهد) بررسی نمودیم.

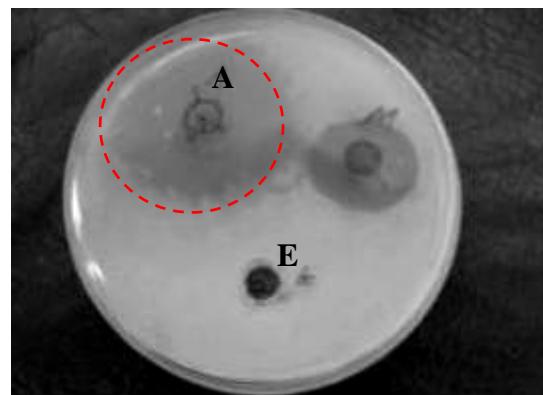
برای بررسی میزان حداقل غلظت مهاری از روش چاهک مشابه حالت ذکر شده استفاده نموده با این تفاوت که در این مرحله در داخل چاهک‌ها این باز از مقادیر ۱۰۰ ، ۷۵ ، ۵۰ ، ۲۵ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استفاده شد تا به حد تقریبی حداقل غلظت مهاری رسیدیم. در روش تکمیلی و دقیق‌تری میزان MIC با روش لوله‌ای تعیین شد. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش کشت لوله‌ای در لوله‌های سری استفاده شد. در هر لوله ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع سابورود دکستروز ریخته و سپس ۵×۱۰^۶ اسپور به هر لوله تلقیح شد تا در هر میلی‌لیتر $۱۰^۷$ اسپور قارچی موجود باشد. بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچی به لوله‌های حاوی محیط کشت ستون، عصاره از کمترین غلظت به بالاترین غلظت در هر لوله توسط سمپلر ریخته شد. برخی از لوله‌ها را به عنوان کترول (شاهد) در نظر گرفتیم. لوله‌های شاهد شامل: لوله‌ی حاوی محیط کشت، لوله‌ی شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی ولی بدون عصاره الكلی و لوله‌هایی که حاوی محیط کشت و مقادیر متفاوتی از عصاره الكلی بودند که از این لوله‌ها جهت مقایسه کدورت با لوله‌هایی که قارچ آسپرژیلوس فلاووس در آن‌ها رشد نکرده ولی به همان مقدار عصاره الكلی همراه اسپور قارچی را داشته‌اند، استفاده شد. پس از گذشت ۳ روز از گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با مشاهده لوله‌ها و تعیین آزمایش کدورت، حداقل غلظت

¹ Shaw

² Growth Inhibition Zone

¹ Minimum Inhibition Concentration

² Well



شکل شماره ۱- ناحیه مهار رشد (دایره قرمز با خط نقطه‌چین) کشت قارچ آسپرژیلوس فلاووس در حضور عصاره آویشن شیرازی (A) در

مقایسه با شاهد الکل (E)

سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آون ۶۰ درجه به منظور تشكیل پوشش بر سطح مغز پسته خشک نمودیم (شکل شماره ۲). به عنوان شاهد ۲ گروه انتخاب شدند. گروه اول، مغز پسته‌هایی که هیچ گونه تیماری روی آن‌ها انجام نشده بود. گروه دوم شامل پسته‌هایی بوده که پوشش دیده اما در پوشش آن‌ها هیچ گونه عصاره‌ای افزوده نشد. مغز پسته‌های گروه تیمار و شاهد در داخل پلیت‌های سترون به صورت تک لایه قرار گرفته تا کل پلیت با مغز پسته در یک ردیف پر شود (شکل شماره ۳). در داخل تمامی پلیت‌ها، دیسکی (با قطر ۵ میلی‌متر) از محیط کشت ۹ روزه سابورود دکستروز آگار حاوی آسپرژیلوس فلاووس در وسط پلیت‌ها بر روی یک پسته (شکل شماره ۳) قرار داده شد. هر کدام از پلیت‌ها در داخل کیسه‌های پلاستیکی (زیپ کیپ) با میزان رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار گرفتند (شکل شماره ۲). این میزان رطوبت نسبی توسط نمک اشباع طعام ایجاد شد. میزان گسترش میسلیایی قارچی در وسط پلیت‌ها از طریق اندازه‌گیری شعاع در دو جهت ۹۰ درجه به عنوان شاخص رشد تعیین شد.

آنالیز آماری داده‌ها

برای هر کدام از تیمارها (مقادیر مختلف اسانس) و شاهد سه تکرار لحاظ شد. معنی دار بودن کارایی عصاره آویشن شیرازی بر اساس میزان مهار رشد محیط قارچی با به کارگیری از آنالیز واریانس یک طرفه^۱ در هر دو سطح ۱ و ۵ درصد

پلیت‌ها از نظر ناحیه مهاری^۱ که توسط دیسک‌های فیلم‌ها ایجاد می‌شدند، مورد بررسی و میزان هاله مهاری اندازه‌گیری شد. قطر این ناحیه توسط یک خط کش اندازه‌گیری شد. مساحت تمام ناحیه حاوی دیسک اندازه‌گیری و سپس از مساحت دیسک کم شده باقیمانده به عنوان مساحت ناحیه مهار رشد بیان شد.

پوشش دهنده مغز پسته

این مرحله بر اساس بررسی پیشین جوانمرد در سال ۲۰۰۸ انجام شد [۱۹]. تمام محلول‌های پوشش دهنده حاوی ۱۰ درصد (وزن/وزن) از کنسانتره آب پنیر (۸۵ درصد پروتئین) در آب مقطر بودند. برای ایجاد محلول پوشش دهنده پیش از افروختن عصاره آویشن، محلول ۱۰ درصد پروتئین آب پنیر به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در ۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دیده تا پروتئین‌ها دناچوره شوند. سپس محلول دناچوره شده در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خنک شده و گلیسرول به عنوان عامل پلاستی سایزر به نسبت ۱ به ۱ میزان ماده پروتئینی به محلول پوشش دهنده افروده شد.

برای بررسی میزان اثر مهاری عصاره آویشن شیرازی در مغز پسته تیمارهایی از امولسیون پوشش و ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ ppm عصاره (غلظت ۴۸ درصد) تهیه نموده و پسته‌هایی که به مدت یک شبانه روز توسط اشعه UV سترون شده بودند را پس از بررسی سترون بودن آن‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه در این محلول‌های پوشش دهنده غوطه‌ور نموده و

¹ One way ANNOVA

¹ Inhibition zone

الکلی گیاهان آویشن شیرازی به خوبی باعث مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت شدند.

جدول شماره ۲ میزان گسترش عصاره از دیسک به محیط کشت حاوی آسپرژیلوس فلاووس را براساس میلی متر بر روی مغز پسته ها نشان می دهد. در پسته هایی که به عنوان گروه کنترل هیچ گونه تیماری (عدم پوشش دهی و عدم وجود عصاره) بر روی آن ها اعمال نشده است، میسلیایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از ۲ روز تمام سطح پلیت های حاوی مغز پسته را پوشاند. در گروه پوشش دیده (بدون عصاره) نیز میسلیایی قارچ به طور کامل سطح پلیت را فراگرفت. در گروه های پوشش دیده با مقادیر ۱۰۰ و ۱۰۰۰ ppm عصاره نیز تا پایان روز سوم محدودیت رشد (جدول شماره ۲) را شاهد بودیم. در مقادیر ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm به ترتیب تا پایان روز چهارم و ششم این محدودیت رشد مشاهده شد. در مقدار ۲۵۰۰ ppm هیچ گونه رشدی با ۳ تکرار مشاهده نشد.

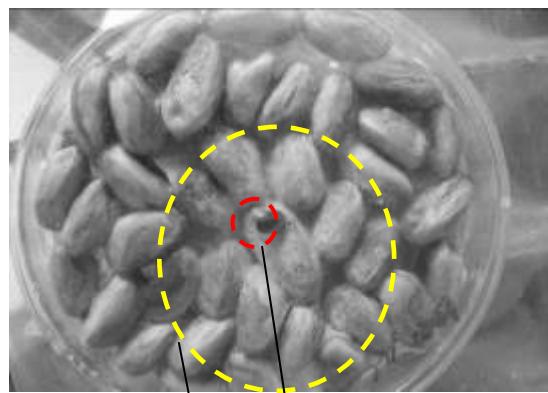
تعیین شد. میانگین ها با به کارگیری از آزمون Duncan's multiple range میانگین ها با کمک از نرم افزار SAS مقایسه شدند.

نتایج

ترکیبات عمده شیمیایی تشکیل دهنده عصاره روغنی آویشن شیرازی در جدول شماره ۱ ذکر شده است. در آزمون بررسی تعیین فعالیت مهاری عصاره الکلی آویشن شیرازی میزان مهار رشد در غلضت های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد عصاره در دیسک حاصل از فیلم پروتئین آب پنیر به ترتیب ۱۱، ۱۳، ۱۸، ۲۳ و ۲۷ میلی متر بود. این میزان مهار رشد در گروه کنترل که فیلم های بدون عصاره را شامل می شد، صفر میلی متر بود. حداقل غلظت مهاری برای عصاره آویشن شیرازی بر روی آسپرژیلوس فلاووس ۹۰ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره تعیین شد. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد که عصاره های



شکل شماره ۲- طرح بسته بندی جهت بررسی اثرات ضدقارچی عصاره آویشن شیرازی در مغز پسته سترون پوشش دیده با پوشش های حاوی عصاره در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد



دیسک تلقیح شده (محیط کشت حاوی کشت ۹ روزه آ. فلاووس)
میزان گسترش رشد آ. فلاووس

شکل شماره ۳- میزان رشد میسلیای آسپرژیلوس فلاووس (محدوده بیضی زرد رنگ) بر روی مغز پسته‌های پوشش دیده با پروتئین آب پنیر حاوی عصاره آویشن شیرازی، تلقیح شده با (دایره قرمز به قطر ۱۰ میلی‌متر) کشت ۹ روزه آسپرژیلوس فلاووس

جدول شماره ۱- درصد ترکیبات عمدۀ شیمیایی تشکیل دهنده عصاره الکلی آویشن شیرازی

درصد	ترکیب
۲۵/۳۲۲۰	Thymol
۳/۸۳۴۳	α -Pinene
۱۱/۳۱۲۵	Paracine
۱۱/۹۵۷۰	Linalool
۷/۹۷۵۱	Carvacrol

جدول شماره ۲- میزان پیشرفت و گسترش میسلیای آسپرژیلوس فلاووس موجود در دیسک (۵ میلی‌متر) محیط کشت ۹ روزه بر حسب میلی‌متر بر روی مغز پسته‌های پوشش ندیده، پوشش دیده با پروتئین آب پنیر بدون افزودن عصاره و حاوی مقادیر مختلف عصاره روغنی آویشن شیرازی در پلیت‌های سترون حاوی یک لایه از مغز پسته در مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

گذاری (روز)	مدت گرمخانه	مغز پسته پوشش دیده	مغز پسته	پوشش دیده بدون عصاره	پوشش ندیده	با مقادیر مختلف عصاره (ppm)					
						۲۵۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۱۰۰
۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
۰/۰	۸/۵	۱۰	۱۶/۵	۱۲/۵	۱۹/۵	۳۷/۵	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
۰/۰	۲۹	۵۵	۶۵	۷۵	۸۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۰	۵۵	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۰	۶۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۰	۷۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۰/۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش‌های حاصل از پروتئین آب پنیر بر روی مغز پسته سترون حاوی عصاره الکلی آویشن شیرازی به طور معنی داری ($p < 0.01$) باعث جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی خود در رطوبت نسبی ۷۵ درصد شدند. آنالیز آماری نشان داد که تاثیر این عصاره با توجه به افزایش غلظت عصاره در ترکیب پوشش بر روی مغز پسته و مدت زمان تلقیح معنی دار بوده است. تنها بالاترین غلظت به کار رفته عصاره در ترکیب پوشش (2500 ppm) توانایی فعالیت مهار رشد قارچ آسپرژیلوس را تا ۷ روز دارا بود. Thanaboripat و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که رشد آسپرژیلوس فلاووس در غلظت ۱ درصد اسانس روغنی سنبیل هندی^۱ تنها به مدت ۳ روز مهار شد [۲۰]. Etcheverry و Bluma (۲۰۰۷) در سال ۲۰۰۷ میزان 2000 ppm میکروگرم در گرم از عصاره‌های Boldus، Poleo، میخک^۲ و بادیان رومی^۳ را برای کاهش رشد آسپرژیلوس فلاووس در دانه‌های سترون ذرت کافی دانستند [۲۱]. مطالعه کارین^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در نان گندم و چاودار با استفاده از اسانس روغنی فرار خردل نشان داد، این قارچ نسبت به این اسانس بیشترین مقاومت را در شرایط اتمسفر معمولی دارا می‌باشد [۲۲].

پاستر^۵ و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثرات ضدقارچی اسانس روغنی پونه کوهی را بر روی قارچ‌های جنس آسپرژیلوس بررسی نموده و نتایج یافته‌های آن‌ها نشان داد که غلظت‌های ۲ و $2/5$ میلی‌گرم در لیتر اسانس بر روی میسلیوم و هاگ‌های آسپرژیلوس نایجر، فلاووس و اوکرائسنس اثر مهاری دارد [۲۳]. سلیمن^۶ و بادا^۷ در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که اسانس روغنی بادیان رومی به طور کامل از رشد آسپرژیلوس فلاووس در غلظت 500 ppm میلی‌گرم جلوگیری

می‌نماید [۲۴]. اسانس روغنی زیره سیاه^۸ و رازیانه^۹ در غلظت 2000 میلی‌گرم در کیلوگرم این تاثیر را داشته‌اند. پاراناگاما^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اسانس روغنی گیاه علف لیمو^{۱۱} به ترتیب در غلظت‌های $0/6$ و 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محیط کشت مایع اثر مهاری و کشنده‌گی بر روی آسپرژیلوس فلاووس دارد. تولید آفلاتوکسین نیز به طور کامل در غلظت $0/1$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مهار شد [۲۵]. سیدیم^{۱۲} و ساریکیس^{۱۳} در سال ۲۰۰۶ اثرات ضدمیکروبی فیلم‌های تهیه شده از آب پنیر حاوی عصاره‌های روغنی پونه^۷، اکلیل کوهی^۸ و سیر را بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیقات نشان داد که فیلم‌های حاوی عصاره‌های این ادویه باعث ایجاد ویژگی ضدمیکروبی در این فیلم‌ها می‌گردد [۱۲].

Viuda-Martos و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اسانس آویشن^۹ باعث کاهش رشد میسلیای آسپرژیلوس فلاووس در مقادیر 2 ، 4 و 6 میلی‌لیتر و همچنین مهار رشد در 8 میلی‌لیتر می‌شود [۲۶]. تحقیقات امیدبیگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز نشان داد که عصاره‌های روغنی آویشن، میخک و مرزه^{۱۰} توانایی مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را در محیط کشت مایع و خمیر گوجه فرنگی داشته و عصاره روغنی آویشن و مرزه قوی‌ترین اثر مهاری را به ترتیب با 350 و 500 ppm غلظت نشان دادند. همچنین درصد مهار رشد در خمیر گوجه فرنگی نسبت به محیط مایع برای هر کدام از عصاره‌ها کمتر بود [۲۷].

همچنان که نتایج نشان داد مقدار موردنیاز عصاره آویشن شیرازی جهت مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی نسبت به مدل غذایی بسیار کمتر بوده است (مقدار 2500 ppm در مقابل 90 ppm میزان حداقل غلظت مهاری). هپ^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند غلظت تاثیر

¹ Caraway

³ Paranagama

⁵ Seydim

⁷ Oregano

⁹ Thyme

¹¹ Hope

² Fennel

⁴ Lemon grass plant

⁶ Sarikis

⁸ Rosemary

¹⁰ Summer savory

¹Citronella

³ Anise

⁵ Paster

⁷ Badeaa

² Clove

⁴ Karin

⁶ Soliman

میزان مهار نسبت به عدم مهار رشد در گروه شاهد یعنی فیلم‌های بدون هرگونه عصاره کاملاً معنی دار بود (p<0.01). پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده باید بر روی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی مختلف همراه با انواع فیلم‌های زیستی^۲ انجام پذیرد.

اسانس‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچ‌ها در شرایط مدل غذایی یکسان نمی‌باشد. به عنوان مثال این محققین دریافتند که در حالی که غلظت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در گرم اسانس‌های روغنی در شرایط آزمایشگاهی بر روی فوزاریوم کولمورووم^۱ موثر هستند، اما در روی دانه گندم مقادیر بسیار بیشتری (۵۰۰ میکروگرم در گرم) آن‌ها مورد نیاز می‌باشد [۲۸].

تشکر و قدردانی

این پژوهه با حمایت مالی شورای پژوهش‌های علمی کشور (توک) و با همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در پژوهشکده کشاورزی انجام گرفته است. از سرکار خانم دکتر لیلا گلستان و مهندس روزین آهنگری به خاطر همکاری‌شان در مراحل تهیه فیلم و جناب آقای دکتر علیرضا بصیری به جهت در اختیار قرار دادن برخی از امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌شود.

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش‌های حاصل از پروتئین آب پنیر حاوی مواد ضدمیکروبی طبیعی، توانایی جلوگیری از آلدگی و رشد ثانویه قارچ‌ها را بر روی سطح مغز پسته خواهند داشت. علاوه بر این چنین پوشش‌هایی می‌توانند از تغییرات انبار مانی مغزهای خوراکی همانند کاهش وزن، فساد اکسیداتیو و جذب رطوبت کاسته [۹]، منجر به افزایش ماندگاری و سلامت مغزهای خوراکی در طی مدت زمان ذخیره‌سازی شوند. افزایش میزان عصاره الكلی در ترکیب فیلم خوراکی پروتئین آب پنیر باعث افزایش میزان مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی محیط کشت شد. این

منابع

1. Kashaninejad M, Mortazavi A, Safekordi A, and Tabil LG. Some physical properties of pistachio (*Pistacia vera L.*) Nut and its kernel. *J. of Food engineering* 2006; 72: 30 - 8.
2. Tavakkolipour H. Effects of Processing conditions on Pistachio Drying and its shelflife, PhD Thesis in Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch. 1379: 8 - 31 & 37 - 8.
3. FAO. Statistical database. Available from <http://www.fao.org>. Access in 2007.
4. Rahimi P, Sharifnabi B and Bahar M. Detection of Aflatoxin in *Aspergillus Species* Isolated from Pistachio in Iran. *J. of Phytopathol.* 2008; 156: 15 - 20.
5. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP and Bennett W. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied Environmental Microbiol.* 2004; 70: 1253 - 62.
6. Ersahad D. Fungi of Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization. 1995, pp: 868 - 9.
7. Mojtabaei H, Rabie CJ, Lubben A, Steyn M and Danesh D. Toxic aspergilli from pistachio nuts. *Mycopathologia*. 1979; 67: 123 – 7.
8. Denizel T, Jarvis B and Rolfe EJ. A field survey of pistachio (*Pistacia vera L.*) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination. *J. of the Sci. Food Agriculture* 1976; 27: 1021 - 6.
9. Doster MA and Michailides TJ. Aspergillus molds and aflatoxin in pistachio nuts in California. *Phytopathol.* 1994; 84: 583 - 90.
10. Tharanathan R N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future.

- Trends in Food Science Technol.* 2003; 14: 71 – 8.
- 11.** Krochta, JM. Film edible. In: Brody AL, March KS, editors. *The Wiley encyclopedia of packaging technology*. New York: John Wiley & Sons Inc. 1997, pp: 397 - 401.
- 12.** Seydim AC and Sarkis G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res. International.* 2006; 39 (5): 639 - 44.
- 13.** Ali M, Saleem M, Ali Z and Ahmad VU. Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). *Phytochem.* 2000; 55: 933 - 6.
- 14.** Aliagiannis N, Kalpoutzakis E, Chinou IB, Mitakou S, Gikas E, and Tsarbopoulos A. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of Wave taxa of Sideritis from Greece. *J. of Agricultural and Food Chem.* 2001; 49: 811 – 5.
- 15.** Thompson DP. Fungi toxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia.* 1989; 81: 151 – 3.
- 16.** Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. *Food Control* 2006; 17: 359 – 4.
- 17.** Durling NE, Catchpole OJ, Grey JB, Webby RF, Mitchell KA, Foo LY, and Perry NB. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol – water mixtures. *Food Chem.* 2007; 101: 1417 - 24.
- 18.** Shaw NB, Monahan FJ, O'Riordan ED and O'Sullivan M. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. *J. of Food Engineering* 2002; 51 (4): 299 - 304.
- 19.** Javanmard M. Shelf life of whey protein-coated pistachio kernel (*Pistacia vera L.*). *Journal of Food Process Engineering.* 2008; 31: 247 - 59.
- 20.** Thanaboripat D, Mongkontanawur N, Suvathi Y and Ruangrattanamatee V. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Sci. J.* 2004; 4 (1): 1 - 16.
- 21.** Bluma RV and Etcheverry MG. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiol.* 2007; 25 (2): 324 - 34.
- 22.** Karin I S and Nielsen P V. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. *J. of Food Sci.* 2005; 70 (1): 37 - 47.
- 23.** Paster N, Menasherov M, Ravid U and Juven B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. of Food Protection* 1995; 58: 81 – 5.
- 24.** Soliman KM and Badeaa RI. Effect of oil extracts from some medicinal plants on different mycotoxicogenic fungi. *Food Chem. Toxicol.* 2002; 40: 1669 – 75.
- 25.** Paranagama PA, Abeysekera KHT, Abeywickrama K and Nugaliyadd L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice, *Letters in Applied Microbiol.* 2003; 37: 86 – 90.
- 26.** Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J and Perez-Alvarez JA. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J. of Food Safety* 2007; 27 (1): 91 – 101.
- 27.** Omidbeygi M. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste, *Food Control* 2007; 18: 1518 - 23.
- 28.** Hope R, Jestoi M and Magan N. Multitarget environmental approach for control of growth and toxin production by *Fusarium culmorum* using essential oil and antioxidant. In: *Advances in Stored Product Protection. Proceedings of 8th International Working conference on Stored Product Protection (IWCSPP).* (Eds P.F., Crelland, D.M. Armitage, C.H. Bell, P.M. Cogan and E. Highley). York CABI publishing. 2002, pp: 486 - 92.

