جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بکارگیری پوشش خوراکی (Edible Coating) حاوی عصاره الکلی مریم گلی (*Salvia officinalis*) در جلوگیری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* روی مغز پسته

مجید جوانمرد*

استادیار گروه صنایع غذایی و تبدیلی ، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران.

(تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۴/۱۲)

چکیده

بسته بندی ضد میکروبی نوعی بسته بندی فعال محسوب شده که توانایی بهبود و افزایش ماندگاری غذا را داشته و موجب سلامت میکروبی این مواد جهت مصرف کنندگان می گردد. به منظورکنترل میکروارگانیسم های ناخواسته بر روی سطوح غذاها، می توان عوامل ضدمیکربی فرار و غیر فرار را در ساختار زیست بسپار (پلیمر) ها وارد نمود. افزودن عصاره های گیاهی و سایر عوامل ضدقارچی در ترکیب پوشش ها و فیلم های خوراکی به عنوان بسته بندی ضد میکروبی، توانایی مهار رشد قارچی بر روی پسته و عدم تولید آفلاتوکسین را دارا می باشند.

هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره مریم گلی (*Salvia officinalis*) 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 ضد قارچی عصاره مریم گلی با بررسی مهار رشد قارچ در سطح محیط کشت انجام گرفت. از طریق تاثیر عصاره به طور مستقیم (روش چاهک) و همچنین استفاده از دیسک هایی که از فیلم های پروتئین آب پنیر و حاوی رقت های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵ و ۲ (میکرولیتر در ۱۰۰ میلی لیتر محلول پوشش دهی) از عصاره تهیه شده بودند، اثرات ضد قارچی عصاره بررسی گردید . جهت بررسی اثر عصاره بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* در مغز پسته از مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ 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 پسته های پوشش دیده اندازه گیری گردید.

در شرایط آزمایشگاهی حداقل غلظت مهاری رشد عصاره مریم گلی بر روی *آسپرژیلوس فلاووس*۱۵۵ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره الکلی تعیین گردید. عصاره الکلی مریم گلی به مقدار ۴۰۰۰ ppm (غلظت ۳۰ درصد) در ترکیب پوشش پروتئین آب پنیر در مغزپسته های سترون به طورکامل از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی این مغز ها جلوگیری نمود.

با توجه به جنبه های اقتصادی اهمیت کنترل آلودگی به قارچ های مولد توکسین در مغز پسته، بکارگیری عصاره مریم گلی در ترکیب پوشش های خوراکی برای کنترل رشد قارچ ها و در نهایت جلوگیری از تولید توکسین در غذا ها توصیه می گردد.

کلید واژگان: پسته، پوشش های خوراکی ضد میکربی، مریم گلی، پروتئین آب پنیر، آسپرژیلوس فلاووس

*مسئول مکاتبات: Javanmard@irost.ir

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱- مقدمه

پسته یکی از شناخته شده ترین مغزهای درختی محسوب می گردد (Kashaninejad *et al.*) [۱]. گیاه پسته درختی است که به گفته ای بومی آسیای مرکزی و به گفته دیگر بومی آسیای غربی و آسیای صغیر شناخته شده است. در میان گونه های مختلف درختان پسته، تنها میوه ی درخت پسته معمولی خوراکی، مطبوع و خوشمزه است. سرزمین ایران قرن ها بدون رقیب بزرگ ترین تولید کننده پسته جهان بوده است ولی در حال حاضرکشورهای دیگری نیز در زمینه تولید و تجارت پسته با ایران به رقابت برخاسته اند. ایران یکی از بزرگترین تولید کنندگان و صادرکنندگان پسته محسوب می شود (Tavakkolipour) [۲]. ایران در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۴۵ هزار تن ازپسته را به کشورهای مختلف صادرکرده و در سال ۲۰۰۶ بیش از ۲۵۰ هزار تن از این فرآورده را تولید نموده است(FAO) [۳].

آسپرژیلوس فلاووس یکی از قارچ های مولد آفلاتوکسین در غذای انسان و حیوانات می باشد. طبق تحقیقات انجام شده گونه های آسپرژیلوس از روی پوسته نرم، پوسته سخت و مغز پسته ایران جدا شده است (Rahimi *et al.*)[۴]. از مهمترین قارچهای تولید کننده آفلاتوکسین که از پسته جدا شده اند می توان از*آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[1] و*آسپرژیلوس فلاووس*[2] نام برد. این دو گونه، سموم B_1 ، B_2، G_1 و G_2را تولید می کنند (Yu *et al.*)[۵]. تحقیقات نشان داد که در ایران(Ersahad, Mojtahedi *et al.*) [۶، ۷] و سایرکشور های تولید کننده پسته (Denizel *et al.*, Doster & Michailides) [۸، ۹] آلودگی پسته به گونه های آسپرژیلوس در طول مراحل رسیدگی محصول در باغ ایجاد می گردد. برای داشتن فرآورده ی سالم و عاری از سموم قارچی موضوع از دو جهت قابل بررسی است. یکی شناخت شرایط تولید آفلاتوکسین و روش های پیشگیری از تولید آن و دیگری شناخت روش های سالم سازی فرآورده آلوده به این گونه سموم است که در صورت عدم موفقیت در پیشگیری از تولید آفلاتوکسین لازم الاجرا هستند. بدیهی است برای جلوگیری از رشد قارچ ها بهترین روش تولید پسته های استاندارد است. یکی از روش های بیولوژیکی جهت کنترل تولید این سموم، بکارگیری عصاره های گیاهی ضد قارچی می باشد(Tavakkolipour) [۲].

در سالیان اخیر، تحقیقات بر روی بسته بندی مواد غذایی بیشتر بر روی فیلم های زیست سازگار[3] از جمله فیلم های تهیه شده از پروتئین های خوراکی با منشا گیاهی و حیوانی (زئین، گلوتن گندم، سویا و بادام زمینی، آلبومین، ژلاتین، کلاژن، کازئین و پروتئین های آب پنیر) استوار بوده است(Tharanathan) [۱۰]. به کارگیری پوشش های خوراکی یک رهیافت جایگزین برای بسته بندی، افزایش ماندگاری و بازارپسندی بیشتر و همچنین رفع معظل زیست محیطی ناشی از پسمانده های مواد بسته بندی محسوب می گردد. فیلم ها و پوشش های خوراکی بر پایه پروتئین آب پنیر[4] دارای نفوذپذیری پایین نسبت به گاز اکسیژن می باشند(Krochta) [۱۱]. بسته بندی ضد میکربی[5] نوعی بسته بندی فعال[6] محسوب شده که می تواند ماندگاری فرآورده های غذایی را افزایش داده و سلامت آنها را از نظر میکربی تامین نماید(Seydim & Sarkis)[۱۲]. این نوع بسته بندی باعث کاهش، مهار و یا به تعویق انداختن رشد میکرو ارگانیسم ها در بسته بندی و مواد غذایی می گردد. به منظور کنترل میکروارگانیسم های نامطلوب در سطوح مواد غذایی مواد ضد میکربی فرار و غیر فرار می توانند در داخل پلیمر ها ی بسته بندی بکار گرفته شوند.

مریم گلی(*Salvia officinalis*) از گیاهان خانواده Laminaceae می باشد. این گیاه به عنوان ادویه در غذا و همچنین عامل معطر در صنایع عطر و لوازم آرایشی به کار گرفته می شود. ترکیب اصلی اسانس روغنی این گیاه شامل ترکیباتی همانند ۱، ۸- سینه اول (اوکالیپتول)[7] و بورنه اول[8]، توژون[9] و

1. *Aspergillus parasiticus*
2. *Aspergillus flavus*

3. biodegradable
4.whey protein
5.Antimicrobial Packaging
6.Active Packaging
7.1,8-cineole (eucalyptol)
8.borneol
9.thujone

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کامفور[1] می باشد(Delamare *et al.*)[۱۳]. فعالیت ضد میکربی مریم گلی از چند دهه قبل شناسایی گردید (Jalsenjak *et al.*)[۱۴]. در سالیان اخیر علاقه فزاینده ای جهت بکارگیری از عصاره های گیاهی برای بهبود ماندگاری مواد غذایی، تاخیر رشد قارچ ها و جلوگیری از تولید سموم قارچی به وجود آمده است. مطالعات متعددی بر روی کارایی ضد قارچی عصاره های گیاهی صورت گرفته است (Thompson, Rasooli et al. , Durling *et al.*) [۱۵، ۱۶، ۱۷].

هدف از این تحقیق اولا بررسی اثر ضد قارچی عصاره الکلی مریم گلی بر علیه رشد قارچ توکسین زای *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط آزمایشگاهی و ثانیا بررسی امکان استفاده از این عصاره در ساختار پوشش خوراکی تهیه شده از پروتئین آب پنیر جهت تولید پوشش خوراکی ضد قارچی به منظور جلوگیری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی مغز پسته بوده است.

۲- روش بررسی

در این بررسی از رقم پسته اکبری استفاده گردید. پسته خام پس از تهیه از بازار تا زمان خشک کردن در محیط تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داشته شد. گلیسرول به عنوان پلاستی سایزر[2] از شرکت Merck آلمان وکنسانتره پروتئینی آب پنیرنیزاز شرکت Arla دانمارک خریداری گردید. عصاره الکلی گیاه آویشن نیز در پژوهشکده صنایع شیمیایی سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (PTCC 5006) از مرکز کلکسیون قارچ های سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران خریداری گردید.

۲-۱- خشک کردن پسته

نمونه های پسته خام (بدون آفت زدگی و نارسی) پس از برداشت، جدا کردن پوسته نرم، خندان کردن و خشک کردن آماده پوشش دهی می شود. عملیات خشک کردن توسط دستگاه خشک کن با جابجایی هوای داغ (ساخت شرکت کروگ- آلمان) انجام گرفت. درجه حرارت خشک کن ۵۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان خشک کردن ۴۸ ساعت به طول انجامید.

۲-۲- روش عصاره گیری

عصاره گیری بر اساس روش Durling و همکاران انجام گرفت (Durling *et al.*)[۱۷]. ۲۰ گرم از برگ و ساقه گیاه مریم گلی را وزن کرده و پس از پودرکردن 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 به۱ قسمت پودر اضافه شده و سپس داخل انکوباتور لرزاننده[3] در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت تا عصاره گیری انجام شود. سپس توسط خلا بخش مایع از تفاله ها جدا و در دستگاه روتاری خلا، حلال از عصاره جدا گردید. پس از حذف کلامل حلال در دستگاه روتاری تحت خلاء با توزین ماده خشک باقی مانده بازده استخراج عصاره الکلی آویشن شیرازی تعیین می گردد. ماده خشک باقی مانده به منظور استفاده در آزمایشات باید رقیق گردد برای این منظور از حلال اولیه که توسط روتاری حذف شده استفاده، می گردد پس از اضافه کردن حلال تا جایی که ماده خشک به طور کامل حل گردد کار را ادامه می دهیم و در نهایت با محاسبه میزان حلال الکلی افزوده شده به ماده خشک غلظت عصاره الکلی محاسبه می گردد که در پژوهش حاضر غلظت عصاره الکلی آویشن شیرازی ۴۸ درصد می باشد. عصاره الکلی تهیه شده در داخل یک بطری سترون و تیره تا زمان بررسی اثر بر روی قارچ در شرایط یخچال نگهداری گردید.

۲-۳- میزان تاثیر عصاره الکلی مریم گلی

الف) شمارش *آسپرژیلوس فلاووس*

برای بررسی تاثیر عصار های گیاهی بر روی رشد قارچ ابتدا میزان مشخصی از اسپور های قارچی تهیه گردید. به همین منظور از کشت لیوفیلیزه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* (PTCC 5006) بر روی محیط کشت جامد شیب دار

1. camphor

۲. ترکیباتی با فراریت پایین هستند که در فیلم های پلیمری برای افزایش میزان انعطاف پذیری آنها اضافه می شوند.

3.shaker incubator

(SDA) و گرمخانه گذاری آن در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته صورت گرفت و سپس این محیط با استفاده از محلول توئین ۵٪ درصد به منظور تهیه سوسپانسیون قارچی وشمارش اسپورهای قارچی شسته شد. برای شمارش اسپور های قارچی از لام نئوبار استفاده شد. پس از شمارش تعداد $۱۰^{۶}$ از اسپور قارچی جهت بررسی انتخاب گردید.

ب) تعیین میزان حداقل غلظت بازدارندگی MIC[1]

برای بررسی تاثیر عصاره بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* ابتدا بر روی محیط سابورود دکستروز آگار از سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۶}$ از اسپور قارچی پخش نموده و سپس چاهک[2] هایی با قطر ۵ میلی متر بر روی محیط کشت ایجاد نموده و مقداری از عصاره با غلظت ۳۰ درصد را تا میزانی که گوده ها پر گردند، در آن قرار دادیم. به عنوان شاهد در داخل گوده دیگر الکل (حلال) را ریختیم. و پس از گرمخانه گزاری در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ تا ۵ روز میزان مهار یا عدم مهار رشد را از طریق اندازه گیری قطر ناحیه مهاری رشد اطراف چاهک در مقایسه با گوده حاوی الکل (شاهد) بررسی نمودیم.

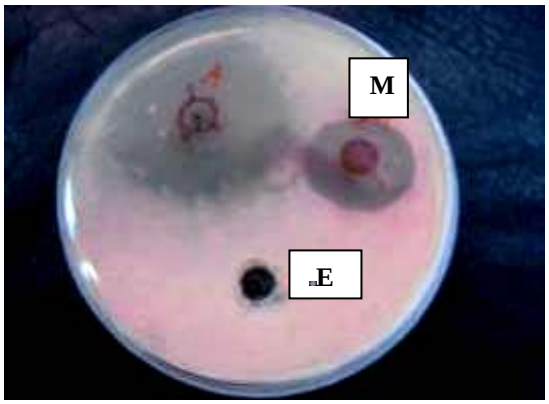
برای بررسی میزان حداقل غلظت مهاری از روش چاهک مشابه حالت ذکر شده استفاده نموده با این تفاوت که در این مرحله در داخل چاهک ها این بار از ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره استفاده گردید تا به حد تقریبی حداقل غلظت مهاری رسیدیم. در روش تکمیلی و دقیق تری میزان MIC با روش لوله ای تعیین گردید. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از روش کشت لوله ای در لوله های سری استفاده گردید. در هر لوله ۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع سابرود دکستروز ریخته و سپس ۵×۱۰^{۶} اسپور به هر لوله تلقیح گردید تا در هر میلی لیتر $۱۰^{۶}$ اسپور قارچی موجود باشد. بعد از تلقیح سوسپانسیون قارچی به لوله های حاوی محیط کشت سترون، عصاره از کمترین غلظت به بالاترین غلظت در هر لوله توسط سمپلر ریخته شد. برخی از لوله ها را به عنوان کنترل (شاهد) در نظر گرفتیم. لوله های شاهد شامل: لوله ی حاوی محیط کشت، لوله ی شامل محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی ولی بدون عصاره الکلی و لوله هایی که حاوی محیط کشت و مقادیر متفاوتی از عصاره الکلی بودند که از این لوله ها جهت مقایسه کدورت با لوله هایی که قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در آن ها رشد نکرده ولی به همان مقدار عصاره الکلی همراه اسپور قارچی را داشته اند، استفاده گردید. پس از گذشت ۳ روز از گرمخانه گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و با مشاهده لوله ها و تعیین آزمایش کدورت، حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره الکلی مریم گلی در محیط کشت تعیین تعیین گردید.

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

ابتدا بر اساس روش طرح شده در تحقیق Shaw و همکاران (۲۰۰۲) فیلم خوراکی از پروتئین آب پنیر تهیه گردید [۱۸]. در این روش ابتدا یک محلول ۱۰درصد از کنسانتره پروتئین آب پنیر در آب مقطر تهیه شد. جهت حل شدن بهترکنسانتره این مخلوط به مدت ۱ ساعت بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس جهت دناتوره شدن پروتئین ها در حمام آب گرم ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از آن تا دمای اتاق خنک شده و بوسیله سود ۱ نرمال pH آن روی ۷ تنظیم گردید. گلیسرول به محلول تهیه کننده پوشش به گونه ای اضافه شد که نسبت گلیسرول/پروتئین برابر ۰/۶(وزن/وزن) حاصل شود. مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره مریم گلی با غلظت ۳۰ درصد را به محلول تشکیل دهنده فیلم اضافه نمودیم. مقدار ۱۴ میلی لیتر از محلول فیلم را در داخل پلیت های پلاستیکی سترون با قطر ۱۰ سانتی متر وارد نموده و در زیر هود بیولوژیک قرار دادیم تا فیلم ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاهی خشک گردند. از هرکدام از فیلم های حاوی غلظت های مختلف عصاره، حاوی الکل و بدون عصاره و الکل دیسک هایی به قطر ۵ میلی متر نظیر دیسک های مورد استفاده در آزمون آنتی بیوگرام تهیه گردید. این دیسک ها سپس در وسط و چهار منطقه پیرامونی پلیت های تلقیح شده با CFU $۱۰^{۶}$ قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* قرار گرفته و فعالیت ضد قارچی را

1. Minimum Inhibition Concentration
2. well

با استفاده از اندازه گیری قطر هاله مهاری اطراف دیسک ها تعیین نمودیم. بررسی ناحیه[1] مهار رشد بر روی محیط کشت جامد ، جهت تعیین اثرات ضد میکروبی فیلم در برابر قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مورد استفاده قرار گرفت. پلیت ها به مدت ۳ روز در ۲۵ درجه سانتی گراد درگرمخانه قرار گرفتند. سپس پلیت ها از نظر ناحیه مهاری[2] که توسط دیسک های فیلم ها ایجاد می گردیدند، مورد بررسی و میزان هاله مهاری اندازه گیری گردید (شکل ۱). قطر این ناحیه توسط یک خط کش اندازه گیری شد. مساحت تمام ناحیه حاوی دیسک اندازه گیری و سپس از مساحت دیسک کم شده، باقیمانده به عنوان مساحت ناحیه مهار رشد بیان گردید



شکل ۱ ناحیه مهار رشد (دایره با خط نقطه چین درشت) کشت قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور عصاره مریم گلی (M) در مقایسه با شاهد الکل (E) (دایره با خط نقطه چین ریز)

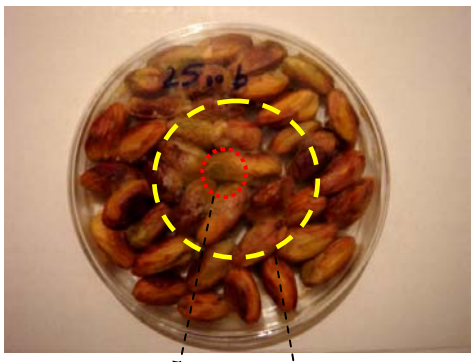
۲-۴- پوشش دهی مغز پسته

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

برای بررسی میزان اثر مهاری عصاره مریم گلی در مغز پسته تیمار هایی از امولسیون پوشش و ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm عصاره (غلظت ۳۰ درصد) تهیه نموده و پسته هایی 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 محلول های پوشش دهی غوطه ور نموده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در آون ۶۰ درجه به منظور تشکیل پوشش بر سطح مغز پسته خشک نمودیم(شکل۲). به عنوان شاهد ۲ گروه انتخاب شدند. گروه اول، مغز پسته هایی که هیچ گونه تیماری روی آنها انجام نشده بود. گروه دوم شامل پسته هایی بوده که پوشش دیده اما در پوشش آنها هیچگونه عصاره ای افزوده نگردید. مغز پسته های گروه تیمار و شاهد در داخل پلیت های سترون به صورت تک لایه قرار گرفته تا کل پلیت با مغز پسته در یک ردیف پر گردد (شکل ۳). در داخل تمامی پلیت ها، دیسکی (با قطر ۵ میلی متر) از محیط کشت ۹ روزه سابورود دکستروز آگار حاوی *آسپرژیلوس فلاووس* در وسط پلیت ها بر روی یک پسته (شکل ۳) قرار داده شد. هرکدام از پلیت ها در داخل کیسه های پلاستیکی (زیپ کیپ) با میزان رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار گرفتند (شکل ۲). این میزان رطوبت نسبی توسط نمک اشباع طعام ایجاد گردید. میزان گسترش میسلیای قارچی در وسط پلیت ها از طریق اندازه گیری شعاع در دو جهت ۹۰ درجه به عنوان شاخص رشد تعیین گردید.

1. zone

شکل ۲ طرح بسته بندی جهت بررسی اثرات ضد قارچی عصاره مریم گلی در مغز پسته سترون پوشش دیده با پوشش های حاوی عصاره در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد میزان گسترش رشد آ. فلاووس دیسک تلقیح شده (محیط کشت حاوی کشت ۹ روزه آ. فلاووس



شکل ۳ میزان رشد میسلیای *آسپرژیلوس فلاووس* (محدوده بیضی زرد رنگ) بر روی مغز پسته های پوشش دیده با پروتئین آب پنیر حاوی عصاره مریم گلی، تلقیح شده با (دایره قرمز به قطر ۱۰ میلی متر) کشت ۹ روزه *آسپرژیلوس فلاووس*

۲-۴- آنالیز آماری داده ها

برای هرکدام از تیمارها (مقادیر مختلف اسانس) و شاهد سه تکرار لحاظ گردید. معنی دار بودن کارایی عصاره مریم گلی بر اساس میزان مهار رشد محیط قارچی با بکارگیری از آنالیز واریانس یک طرفه(One way ANOVA) در هر دو سطح۱ و ۵ درصد تعیین شد. میانگین ها با بکارگیری از آزمون Duncan's multiple range میانگین ها با کمک از نرم افزار SAS مقایسه گردیدند.

۳- نتایج

در آزمون بررسی تعیین فعالیت مهاری عصاره الکلی مریم گلی میزان مهار رشد در غلظت 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 گردید، صفر میلی متر بود. حداقل غلظت مهاری برای عصاره مریم گلی بر روی *آسپرژیلوس فلاووس*۱۵۵ ppm از غلظت ۳۰ درصد عصاره تعیین گردید. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد که عصاره های الکلی گیاهان مریم گلی به خوبی باعث مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کشت گردیدند.

جدول ۱ میزان گسترش دیسک 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 آنها اعمال نشده است، میسلیای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* پس از ۲ روز تمام سطح پلیت های حاوی مغز پسته را پوشاند. در گروه پوشش دیده (بدون عصاره) نیز میسلیای قارچ به طورکامل سطح پلیت را فرا گرفت. در گروه های پوشش دیده با مقادیر ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm عصاره نیز تا پایان روز سوم محدودیت رشد (جدول ۱) را شاهد بودیم. در مقادیر ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ ppm به ترتیب تا پایان روز چهارم و ششم این محدودیت رشد مشاهده گردید. در مقدار ۴۰۰۰ ppm هیچگونه رشدی با ۳ تکرار مشاهده نگردید.

۴- بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش های حاصل از پروتئین آب پنیر بر روی مغز پسته سترون حاوی عصاره الکلی مریم گلی به طور معنی داری ($p<0/01$) باعث جلوگیری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی خود در رطوبت نسبی ۷۵ درصد گردیدند. 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.

جدول ۱ میزان پیشرفت و گسترش میسلیای *آسپرژیلوس فلاووس* موجود در دیسک (۵میلی متری) محیط کشت ۹ روزه بر حسب میلی متر بر روی مغز پسته های پوشش ندیده، پوشش دیده با پروتئین آب پنیر بدون افزودن عصاره و حاوی مقادیر مختلف عصاره روغنی مریم گلی در پلیت های سترون حاوی یک لایه از مغز پسته در مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد

مدت گرمخانه گذاری (روز)	مغز پسته پوشش ندیده	مغز پسته پوشش دیده بدون عصاره	مغز پسته پوشش دیده با مقادیر مختلف عصاره (ppm)					
			۱۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۴۰۰۰
۱	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۰/۰
۲	۰/۰	۴۲/۵	۴۸/۵	۳۴/۵	۱۶/۵	۱۰	۱۸/۵	۰/۰
۳	۱۰۰	۱۰۰	۸۵	۶۶	۵۷	۴۶	۴۵	۰/۰
۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۴	۵۹	۰/۰
۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۵	۰/۰
۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۰
۷	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۰

تنها بالاترین غلظت بکار رفته عصاره در ترکیب پوشش (۴۰۰۰ 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 سنیل هندی[1] تنها به مدت ۳ روز مهار گردید[۲۰]. Bluma و Etcheverry در سال ۲۰۰۷ میزان ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم در گرم ازعصاره های Boldus، Poleo ، میخک[2] و بادیان رومی[3] را برای کاهش رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در دانه های سترون ذرت کافی دانستند[۲۱]. مطالعه Karin 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 می باشد[۲۲].

Paster و همکاران در سال ۱۹۹۵ اثرات ضد قارچی اسانس روغنی پونه کوهی را بر روی قارچ های جنس آسپرژیلوس بررسی نموده و نتایج یافته های آنها نشان داد که غلظت های ۲ و ۲/۵ میلی لیتر در لیتر اسانس بر روی میسلیوم و هاگ های آسپرژیلوس نایجر، فلاووس و اوکراسئوس اثر مهاری دارد [۲۳]. Soliman و Badeaa در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که اسانس روغنی بادیان رومی به طورکامل از رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت ۵۰۰ میلی گرم درکیلوگرم جلوگیری می نماید (Soliman & Badeaa)[۲۴]. اسانس روغنی زیره سیاه[4]و رازیانه[5] در غلظت ۲۰۰۰ میلی گرم درکیلوگرم این تاثیر را داشته اند.

Paranagama و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که اسانس روغنی گیاه علف لیمو[6] به ترتیب در غلظت های ۰/۶ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر در محیط کشت مایع اثر مهاری و کشندگی بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* دارد. تولید آفلاتوکسین نیز به طورکامل در غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر مهار گردید [۲۵]. Seydim و Sarikisدر سال ۲۰۰۶ اثرات ضد میکربی فیلم های تهیه شده از آب پنیر حاوی عصاره های روغنی پونه[7]، اکلیل کوهی[8] و سیر را بر روی برخی از باکتری های بیماری زای غذازاد مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیقات نشان داد که فیلم های حاوی عصاره های این ادویه با عث ایجاد ویژگی ضد میکربی در این فیلم ها می گردد (Seydim & Sarkis) [۱۲].

1. citronella
2. clove
3. anise
4. caraway
5. fennel
6. lemon grass plant
7. oregano
8. rosemary

Viuda-Martos و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اسانس آویشن[1] باعث کاهش رشد میسلیای *آسپرژیلوس فلاووس* در مقادیر ۴،۲ و ۶ میلی لیتر وهمچنین مهار رشد در ۸ میلی لیتر می گردد (Viuda-Martos *et al.*)[۲۶]. تحقیقات امیدبیگی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نیز نشان داد که عصاره های روغنی آویشن، میخک ومرزه[2] توانایی مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* را در محیط کشت مایع و خمیر گوجه فرنگی داشته و عصاره روغنی آویشن و مرزه قوی ترین اثر مهاری را به ترتیب با ۳۵۰ و ۵۰۰ ppm غلظت نشان دادند. همچنین درصد مهار رشد در خمیر گوجه فرنگی نسبت به محیط مایع برای هرکدام از عصاره ها کمتر بود [۲۷].

همچنان که نتایج نشان داد مقدار مورد نیاز عصاره مریم گلی جهت مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط آزمایشگاهی نسبت به مدل غذایی بسیارکمتر بوده است (مقدار ۴۰۰۰ در مقابل ۱۵۵ ppm میزان حداقل غلظت مهاری). Hope و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند غلظت تاثیر اسانس های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بر روی قارچ ها در شرایط مدل غذایی یکسان نمی باشد. به عنوان مثال این محققین دریافتند که در حالیکه غلظت های ۵۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در گرم اسانس های روغنی در شرایط آزمایشگاهی بر روی فوزاریوم کولموروم [3] موثر هستند، اما در روی دانه گندم مقادیر بسیار بیشتری (۵۰۰ میکروگرم در گرم) آنها مورد نیاز می باشد[۲۸].

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش های حاصل از پروتئین آب پنیر حاوی مواد ضد میکربی طبیعی، توانایی جلوگیری از آلودگی و رشد ثانویه قارچ ها را بر روی سطح مغز پسته خواهند داشت. علاوه بر این چنین پوشش هایی می توانند از تغییرات انبار مانی مغز های خوراکی همانند کاهش وزن، فساد اکسیداتیو و جذب رطوبت کاسته (Michailides &Doster) [۹]، منجر به افزایش ماندگاری و سلامت مغز های خوراکی در طی مدت زمان ذخیره سازی گردند. افزایش میزان عصاره الکلی در ترکیب فیلم خوراکی پروتئین آب پنیر باعث افزایش میزان مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی محیط کشت گردید. این میزان مهار نسبت به عدم مهار رشد در گروه شاهد یعنی فیلم های بدون هرگونه عصاره کاملا معنی دار بود ($p<۰/۰۱$). پیشنهاد می گردد مطالعات آینده باید بر روی اثرات ضدمیکربی عصاره های گیاهی مختلف همراه با انواع فیلم های زیستی[4] انجام پذیرد.

1. thyme
2. summer savory
3. *F. culmorum*

۵- سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی شورای پژوهش های علمی کشور (توتک) و با مساعدت سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران در پژوهشکده کشاورزی انجام گرفته است. از سرکار خانم دکتر لیلا گلستان و مهندس روژین آهنگری به خاطر همکاری شان در مراحل تهیه فیلم و جناب آقای دکتر علیرضا بصیری به جهت در اختیار قرار دادن برخی از امکانات آزمایشگاهی سپاس گزاری می گردد.

۶- منابع

[1]Kashaninejad, M., Mortazavi, A., Safekordi, A. and TABIL, L.G. 2006. Some physical properties of pistachio (*Pistacia vera* L.) Nut and its kernel, Journal of Food engineering, 72:30-38.

[2]Tavakkolipour, H. 1379. Effects of Processing conditions on Pistachio Drying and its shelflife, PhD Thesis in Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch: 8-31 & 37-38.

[3]FAO, 2008. Statistical database. Available from http://www.fao.org. Access in 2007.

[4]Rahimi, P., Sharifnabi, B. and Bahar M. 2008. Detection of Aflatoxin in *Aspergillus Species* Isolated from Pistachio in Iran, Journal of Phytopathology, 156:15-20.

[5]Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., BhatnagaR, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P.

4. bio-based films

and Bennett, W. 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Applied Environmental Microbiology, 70:1253-1262.

[6]Ersahad, D. 1995. Fungi of Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization.

[7]Mojtahedi, H., Rabie, C.J., Lubben, A., Steyn, M. and Danesh, D. 1979. Toxic aspergilli from pistachio nuts, Mycopathologia, 67:123–127.

[8]Denizel, T., Jarvis, B. and Rolfe, E.J. 1976. A field survey of pistachio (*Pistacia vera*) nut production and storage in Turkey with particular reference to aflatoxin contamination. Journal of the Science Food Agriculture, 27:1021-1026.

[9]Doster, M.A. and Michailides, T.J., 1994. Aspergillus molds and aflatoxin in pistachio nuts in California. Phytopathology, 84:583-590.

[10]Tharanathan, R.N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in Food Science Technology, 14:71–78.

[11]Krochta, J.M. 1997. Film edible. In: Brody AL, March KS, editors. The Wiley encyclopedia of packaging technology. New York: John Wiley & Sons Inc., 397-401pp.

[12]Seydim, A.C. and Sarkis, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International, 39(5):639-644.

[13]Delamare, A. P. L., Moschen-PistorellO, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L. and Echeverrigaray, S. 2007. Antibacterial activity of the essential oils of Salvia officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil. Food Chemistry, 100: 603–608.

[14]Jalsenjak, V., Peljnajk, S. and Kustrak, D. 1987. Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity. Pharmazie, 42:419–420.

[15]Thompson, D.P. 1989.Fungi toxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia, 81:151–153.

[16]Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh A. 2006. Inhibition and morphological alterations of Aspergillus *niger* by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. Food Control, 17:359–364.

[17]Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey J.B., Webby, R.F., MitchelL, K.A., Foo, L.Y. and Perry, N.B. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. Food Chemistry, 101:1417-1424.

[18]Shaw, N.B., Monahan, F.J., O'Riordan, E.D. and O'sullivan, M. 2002. Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. Journal of Food Engineering, 51(4):299-304.

[19]Javanmard, M. 2008. Shelf life of whey protein-coated pistachio kernel (*pistacia vera* l.). Journal of Food Process Engineering, 31:247-259.

[20]Thanaboripat, D., Mongkontanawur, N., Suvathi, Y. and Ruangrattanamatee, V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. KMITL Science Journal, 4 (1).

[21]Bluma, R.V. and Etcheverry, M.G. 2007. Application of essential oils in maize grain: Impact on Aspergillus section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology, 25(2):324-334.

[22]Karin, I. S. and Nielsen, P.V. 2005. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil .Journal Of Food Science, 70(1):37-47.

[23]Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U. and Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain, Journal of Food Protection, 58**:** 81–85.

[24]Soliman, K.M. and Badeaa, R.I. 2002. Effect of oil extracts from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem Toxicol*ogy*, 40:1669–1675.

[25]Paranagama, P.A., Abeysekera. K.H.T., Abeywickrama, K. and Nugaliyadd, L.

2003. 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 Microbiology, 37: 86–90.

[26]Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Álvarez, J.A. 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. Journal of Food Safety, 27 (1): 91 – 101.

[27]Omidbeygi, M. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste, Food Control, 18: 1518-1523.

[28]Hope, R., Jestoi, M. and Magan, N. 2002. 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., Credland, D.M. Armitage, C.H. BELL, P.M. Cogan, and E. Highley. York CABI publishing.486-492 pp.

Application of edible coatings incorporated Sage (*Salvia officinalis)* alcoholic extract for inhibition of *Aspergillus flavus* growth on pistachio kernel

Javanmard, M.*

Department of Food Science, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization

(Received: 88/2/12 Accepted: 88/8/23)

Antimicrobial packaging is a form of active packaging that could extend the shelf-life of foods and provides microbial safety for consumers. In order to control undesirable microorganisms on food surfaces, volatile and non-volatile antimicrobial agents can be incorporated into polymers. Incorporation of essential oils and other antifungal agents in edible films composition is an antimicrobial packaging that able to inhibit fungal growth on the pistachio and aflatoxins production.

The antifungal activity of Sage (*Salvia officinalis*) extracts against *Aspergillus flavus* in whey protein concentrate-based coating on pistachio kernels was investigated.

The antifungal effect of Sage extracts was investigated in culture media by direct method (well method) and application of whey protein concentrate (WPC) films as discs (disc method) incorporated with different concentrations of extracts. In order to evaluate the antifungal effect of extract in pistachio, kernels coated with different concentrations of extract inoculated with a culture media discs contain 9-day-old growing *A. flavus* colony and the growth rate of inoculated discs were measured during 1 week.

In experimental condition, minimal inhibition concentration was achieved by 155 ppm of ahcoholic extract (30 percent concentration). The results also showed that WPC coating incorporated with 4000 ppm of *Salvia officinalis* extracts on pistachio kernels inhibited *A. flavus* growth totally.

Paying regard to economical aspects of importance of contamination with toxigenic fungi in pistachio kernel suggest the application of Sage extract incorporated in edible coatings for toxigenic fungi growth and toxin production in foods.

Keywords: Pistachio, Edible coatings, Sage (*Salvia officinalis*), Whey protein, Aspergillus flavus

* Corresponding Author E-Mail address: Javanmard@irost.ir