

بررسی خصوصیات ضد میکروبی نانوالیاف گلیادین حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و اثر آن بر افزایش زمان ماندگاری فیله دودی ماهی سالمون

زهرا بهرامی^۱، احمد پدram نیا^{۱*}، محمدرضا سعیدی اصل^۱، محمد آرمین^۲، مجتبی حیدری مجد^۳ و^۳

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران
* نویسنده مسئول (pedram@iaus.ac.ir)

۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۳- گروه تغذیه، مرکز تحقیقات ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه تولید نانوالیاف گلیادین الکتروپرسی شده حاوی اسانس آویشن شیرازی (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) برای ایجاد الیافهای ضد میکروبی فعال بود. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی اسانس ارزیابی شد. همچنین نانوالیاف تولیدی از لحاظ ویژگیهای فیزیکوشیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بررسی شد. نتایج باتوجه به حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که اسانس آویشن شیرازی اثرات معنی دار باکتری کشی دارد. نانوالیاف، راندمان ریزپوشانی نزدیک به ۹۵ درصد را نشان داد و وجود اسانس آویشن شیرازی سبب افزایش زاویه تماس و کدورت گردید. اسانس سبب جذب نور در طول موج مرئی شده و از این رو، باعث افزایش پارامتر b^* و کاهش پارامترهای a^* و L^* شد. فعالیت ضد میکروبی نانوالیافهای حاوی اسانس بررسی شد. نتایج نشان داد که باسیلوس سویتیلیس حساس ترین باکتری به نانوالیاف حاوی اسانس بوده در حالی که سالمونلا تیفی مقاوم ترین بود. نانوالیاف حاوی اسانس ویژگیهای آنتی اکسیدانی خوبی نشان داد و این فعالیت هنگامی که غلظت اسانس به ۱۵ درصد رسید، بهبود یافت. سپس، کارایی نانوالیاف زیست فعال حاوی ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد (وزنی/وزنی) اسانس آویشن برای کاهش رشد میکروبی (لیستریا مونوسیتوزنز) فیله دودی ماهی سالمون در طول نگهداری سرد بررسی شد. نتایج نشان داد که جمعیت نهایی این باکتری در دمای ۴ درجه سانتیگراد در حضور اسانس آویشن در مقایسه با نمونه کنترل منفی بدون اسانس آویشن، پس از ۱۶ روز نگهداری حدود ۳-۲/۵ لگاریتم کاهش یافت. این نتایج نشان می دهد که نانوالیاف گلیادین توسعه یافته با ماده فعال می تواند در طراحی مواد بسته بندی ضد میکروبی استفاده شود.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷

واژه های کلیدی

اسانس
بسته بندی
گلیادین
فراورده های دریایی
نانوالیاف



مقدمه

فراورده های غذایی، منجر به مشکلات متعدد اجتماعی و اقتصادی شده است (Heydari-Majd, Ghanbarzadeh, et al., 2019). لذا لزوم تلاش پژوهشگران به منظور تولید محصولات غذایی امن و یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدید، ضروری به نظر می رسد. از این رو، محققان

بی شک محصولات غذایی از عمده ترین نیازهای اولیه بشر می باشند و لذا تأمین غذای سالم به وسیله صنعت گران امر غذا با سلامت جامعه در ارتباط مستقیم است. امروزه افزایش بیماری های متعدد نشأت گرفته از مصرف

به‌دنبال منابع جدیدی از ترکیبات فعال زیستی می‌باشند که توانایی کاربرد به‌عنوان مواد ارتقادهنده سلامت در محصولات غذایی کاربردی را داشته باشند (Yong & Liu, 2021). در سالیان اخیر، اهمیت گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ضد میکروبی به‌خوبی درک شده است. لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی استخراج‌شده از گیاهان از قبیل اسیدهای آلی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌تواند جایگزین مهمی به‌منظور اطمینان از ایمنی مواد غذایی باشد.

از میان گیاهان دارویی، آویشن شیرازی^۱ گیاهی معطر با خواص دارویی و جزء خانواده لابیاسه^۲ است. آویشن غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد و دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی است (Heydari-Majd et al., 2019). همچنین، این تکنیک امکانات ویژه‌ای را به‌منظور استفاده از ترکیبات بی‌هوازی و هیدروکلوئیدهای غذایی از قبیل پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها فراهم می‌آورد، تا ساختارهای زیست‌تخریب‌پذیر با ویژگی مطلوب در صنایع ایجاد شود.

پلیمرهای متعددی با گرید غذایی به‌منظور انکپسوله‌کردن ترکیبات فعال دارویی و غذایی در تکنیک الکتروروسی کاربرد دارند. در میان این پلیمرها، گلیادین توانایی انکپسوله‌کردن و رهایش کنترل‌شده ترکیبات زیست‌فعال دارویی را دارا می‌باشد (Sharif et al., 2019). گلیادین، پروتئین ذخیره‌شده در دانه گندم می‌باشد و حدود ۴۰-۵۰ درصد وزن پروتئین ذخیره‌ای گندم را تشکیل می‌دهد (Hajjari et al., 2021). گلیادین‌ها به‌عنوان مخلوط‌های ناهمگن از پلی‌پپتیدهای تک‌زنجیره‌ای محلول در ۷۰ درصد الکل آبی توصیف می‌شوند. همچنین از دو بخش مرکزی و بیرونی تشکیل شده است. بخش مرکزی از توالی آمینواسیدهای تکرارشونده و باقی‌مانده اسید آمینه‌های پرولین و گلوتامین تشکیل شده است. بخش بیرونی نیز از ماهیت آب‌گریزی برخوردار است و دربرگیرنده بخش مرکزی می‌باشد (Hajjari et al., 2021).

فراورده‌های دریایی با دارا بودن درصد پروتئین زیاد و قابلیت هضم ۹۶ درصد و ازسوی دیگر وجود اسیدهای چرب امگا-۳ تحت‌عنوان مواد غذایی سلامت‌بخش مطرح می‌باشند و از اهمیت بالایی در جیره غذایی انسان برخوردار هستند (Rezaei et al., 2010). با این وجود، آبریان به‌دلیل داشتن مقادیر زیاد اسیدهای چرب چندغیراشباعی، پروتئین و رطوبت زیاد، جزء محصولات غذایی با درجه فساد زیاد، طبقه‌بندی می‌شوند و در صورت ذخیره‌سازی در شرایط نامناسب، برخی فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی سبب افت کیفیت آن می‌گردد (Heydari-Majd, Ghanbarzadeh, et al., 2019).

از میان گیاهان دارویی، آویشن شیرازی^۱ گیاهی معطر با خواص دارویی و جزء خانواده لابیاسه^۲ است. آویشن غنی از ترکیبات فنولی می‌باشد و دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد قارچی است (Heydari-Majd et al., 2022). ترکیبات مؤثره تشکیل‌دهنده اسانس آویشن شیرازی شامل تیمول^۳، کارواکرول^۴ هستند. اسید رزمارینیک از دیگر ترکیبات فعال موجود در اسانس آویشن می‌باشد که دارای ویژگی‌های آنتی‌باکتریایی، ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی است (Heydari-Majd et al., 2022). با وجود پتانسیل بالای ترکیبات مؤثره آویشن شیرازی، افزودن مستقیم اسانس به فراورده‌های غذایی معمولاً به علت ایجاد بوی شدید، مشکل مسمومیت و تغییرات احتمالی در خصوصیات اورگانولپتیک فراورده‌های غذایی، محدود شده است (Heydari-Majd, Rezaeinia, et al., 2019).

ازسوی دیگر، اسانس‌های گیاهی ترکیباتی فرار و ناپایدار می‌باشند که در صورت عدم محافظت در برابر فاکتورهای بیرونی می‌توانند به‌راحتی به‌وسیله اکسیداسیون، تبخیر، حرارت و نور تجزیه شوند. یک استراتژی عملی برای غلبه بر این مشکل، کاربرد نانوالیاف‌ها به‌عنوان حامل این ترکیبات می‌باشد که سبب رهایش کنترل‌شده این ترکیبات در فراورده‌های غذایی می‌گردد (Heydari-Majd, Rezaeinia, et al., 2019).

نانوالیاف‌ها رشته‌هایی کوتاه با قطر کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند که به‌صورت لایه‌ای روی یک صفحه تولید می‌گردند. نانوالیاف‌ها از طریق روش الکتروروسی تولید و ایجاد موادی می‌کنند که می‌تواند کاربردهایی در زمینه پزشکی و غذایی داشته باشد (Rezaeinia et al., 2019).

¹ *Zataria multiflora* Boiss (ZMEO)

² Labiatae family

³ Thymol

⁴ Carvacrol

نوترینت براث^۹ و محیط کشت ام آراس (MRS^{۱۰}))، محلول ۲-۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازین (DPPH^{۱۱})، معرف فولین و اسید گالیک (استاندارد ترکیبات فنولی) از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

استخراج گلیادین

بدین منظور برای استخراج گلیادین از گلوتن گندم، در ابتدا ۵ گرم گلوتن را با ۶۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حجمی/حجمی مخلوط شد و به مدت ۲ دقیقه در همزنایزر (IKA T25-Digital Ultra Turrax، ساخت آلمان) قرار گرفت. سپس توسط همزن آهن ربایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد. سوسپانسیون‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. این عمل تا به دست آمدن مایع رویی شفاف و عاری از گلوتن ادامه داشت. در نهایت از ترکیب مایع فوقانی در هر مرحله گلیادین‌ها به دست آمد. سپس محلول گلیادین توسط خشک کن انجمادی (TDS-00209-A، ساخت آمریکا) خشک شد و پس از آسیاب به صورت پودر و در یخچال نگهداری شد (Sharif et al., 2018).

تهیه نانوالیاف گلیادین حاوی اسانس آویشن

گلیادین استخراج شده از گلوتن با غلظت ۳۰ درصد (وزنی/حجمی) در اتانول ۷۰ درصد حل شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس اسانس آویشن شیرازی در سه سطح مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) به محلول گلیادین اضافه شد و پس از انحلال کامل، به هر محلول به مدت ۲۰ دقیقه تا از بین رفتن کامل حباب‌های هوا، استراحت داده شد. سپس هریک از محلول‌های تهیه شده در یک سرنگ پلاستیکی ریخته شد و فرایند الکتروروسی با استفاده از پمپ سرنگی با دبی ۱/۵ میلی لیتر بر ساعت مجهز به میدان الکتریکی با ولتاژ بالا (۲۵ کیلوولت) انجام شد. فاصله بین نوک سوزن (G 18، شرکت سیگما آلد ریچ، ساخت آمریکا) و کلکتور (صفحه کلکتور آلومینیومی، ۱۵۰×۱۵۰ میلی متر مربع) ۱۵۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. فرایند

منجمد کردن، یکی از متداول‌ترین روش‌های نگهداری است که از آن به منظور کاهش تغییرات بیوشیمیایی در ماهی استفاده می‌شود، اما این روش به طور کامل از واکنش‌های شیمیایی که منجر به افت کیفیت ماهی می‌شود، جلوگیری نمی‌کند (Sathivel, 2005). بسته بندی‌های فعال با کنترل انتقال گازها، رطوبت و ترکیبات طعمی از یک سو و از طرف دیگر با رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال، می‌تواند راهکاری امیدبخش به منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی باشد.

لذا در این پژوهش از گلیادین به منظور تشکیل نانوالیاف با استفاده از تکنیک الکتروروسی استفاده شده است. همچنین مرور مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که اسانس آویشن شیرازی با وجود خصوصیات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قوی، در قالب الحاق به نانوالیاف گلیادین مورد بررسی و کاربرد قرار نگرفته است. از این رو، در این پژوهش ضمن بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) بر خصوصیات ضد میکروبی نانوالیاف گلیادین، اثر این نانوالیاف بر افزایش زمان ماندگاری فیله ماهی دودی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گلوتن گندم از شرکت یاس مشهد خریداری شد. اسانس آویشن شیرازی از شرکت باریج اسانس (کاشان، ساخت ایران) خریداری شد. سویه‌های مختلف میکروبی شامل: باسیلوس سوبتیلیس^۱ (ATCC 7974)، لیستریا موسایتوزنز^۲ (ATCC 35152)، استافیلوکوکوس اورئوس^۳ (ATCC 25923)، اشریشیا کلی^۴ (ATCC 25922)، سودوموناس آئروژینوزا^۵ (ATCC 27853) و سالمونلا تیفی^۶ (ATCC 19430) از شرکت کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌ها (مشهد، ساخت ایران) خریداری شد. محیط کشت‌های لازم برای آزمون میکروبی (پلیت کانت آگار استاندارد (PCA^۷)، مولر هینتون آگار (MHA^۸))،

¹ *Bacillus subtilis*

² *Listeria monocytogenes*

³ *Staphylococcus aureus*

⁴ *Escherichia coli*

⁵ *Pseudomonas aeruginosa*

⁶ *Salmonella tphi*

⁷ Plate count agar

⁸ Muller-hinton agar

⁹ Nutrient broth

¹⁰ de Man, rogosa, and sharpe

¹¹ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

نانوالیاف گلیادین (۳×۲ سانتی متر مربع) با استفاده از یک میکروسرنگ قرار گرفت و بلافاصله از زاویه تماس قطره با سطح نانوالیاف عکس گرفته شد. از نرم افزار ImageJ نسخه ۱/۵۲ برای محاسبه زاویه تماس قطره با سطح نانوالیاف استفاده شد. زاویه بین خط مماس بر قطره در نقطه تماس و خط رسم شده در راستای سطح نانوالیاف نشان دهنده زاویه تماس می باشد. آزمایش ها برای هر نانوالیاف در سه تکرار و با ۶ قطره روی سطح آن انجام شد (Rezaeinia et al., 2020).

خصوصیات رنگی

به منظور بررسی ویژگی های رنگی نانوالیاف های گلیادین حاوی اسانس، از دستگاه رنگ سنج (Minolta Camera Osaka، ساخت ژاپن) استفاده گردید. بدین منظور در ابتدا، دستگاه رنگ سنج با استفاده از یک صفحه استاندارد سفید تنظیم شد و پارامترهای رنگ سنجی مرتبط با دستگاه از قبیل L^* ، a^* و b^* تعیین گردید. پارامترهای بررسی شده شامل درخشندگی یا L (سفید تا سیاه)، a (سبز تا قرمز) و b (آبی تا زرد) بودند (Heydari-Majd et al., 2022).

همچنین به منظور بررسی کدورت نانوالیاف ها، نمونه ها پس از بریدن، مستقیم داخل سل اسپکتروفوتومتر قرار گرفتند. مقدار کدورت پس از خواندن جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر و تقسیم آن بر ضخامت نمونه ها (میلی متر) گزارش شد (Heydari-Majd et al., 2022).

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^۳) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC^۴) اسانس آویشن

برای این منظور ابتدا، محلولی از اسانس آویشن با رقت ۱۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، دی متیل سولفوکساید تهیه شد و در ادامه غلظت های مختلف اسانس آویشن با استفاده از رقت سازی محلول های اصلی توسط محیط کشت (MHB) تهیه گردید. سپس باکتری های پاتوژن باسیلوس سوبتیلیس، اشیریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در مدت زمان ۲۴ ساعت قبل از انجام این آزمون، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محیط کشت نوترینت پراث کشت داده شدند و سپس به منظور تولید سوسپانسیون میکروبی ۱۰^۸ واحد تشکیل

الکتروروسی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۳±۲۵ درجه سانتی گراد) و رطوبت نسبی ۳±۲۴ درصد انجام شد (Sharif et al., 2018).

بازده ریزپوشانی^۱ و ظرفیت بارگذاری^۲

بازده ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری نانوالیاف گلیادین، حاوی غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی با استفاده از روش Heydari-Majd, Rezaeinia, و همکاران (۲۰۱۹) محاسبه شد. استخراج اسانس آزاد با استفاده از هگزان به عنوان حلال انجام شد. مقدار مشخصی از نانوالیاف گلیادین (۱۰۰ میلی گرم) در هگزان (۱۰ میلی لیتر) به مدت ۱ دقیقه هم زده شد و سپس به مدت ۳ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار اسانس آزاد شده در مایع رویی (هگزان) با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV-VIS 1601، ساخت ژاپن) در طول موج ۲۳۳ نانومتر λ_{max} اسانس آویشن در هگزان که قبلا با استفاده از اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شده است) اندازه گیری شد (Heydari-Majd, Rezaeinia, et al., 2019). از نانوالیاف بدون اسانس به عنوان نمونه بلانک استفاده شد. رابطه های (۱) و (۲) برای تعیین بازده ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری به کار برده شد:

رابطه (۱)

$$\text{درصد بازده ریزپوشانی} = \frac{W_{total} - W_f}{W_{total}} \times 100$$

رابطه (۲)

$$\text{درصد ظرفیت بارگذاری} = \frac{W_{total} - W_f}{W_z} \times 100$$

در رابطه (۱) و (۲)، W_{total} و W_z به ترتیب وزن اسانس و نانوالیاف گلیادین اعمال شده و W_f مقدار اسانس آزاد در مایع رویی می باشد. تمامی آزمایش ها در سه تکرار انجام پذیرفت.

ویژگی آب گریزی سطح

آب گریزی سطح نانوالیاف های گلیادین حاوی اسانس آویشن با استفاده از اندازه گیری زاویه تماس توسط دوربین Canon (EOS، ساخت آمریکا) انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار ۱ میکرولیتر آب مقطر روی سطح

³ Minimum inhibitory concentration

⁴ Minimum bactericidal concentration

¹ Encapsulation efficiency

² Loading capacity

متفاوت رسم شد. محتوای فنول کل (میلی گرم اسید گالیک به ازای گرم ماده خشک) طبق رابطه (۳) محاسبه شد:

رابطه (۳)

$$\text{محتوای فنول کل} = \frac{C \times V}{M}$$

در رابطه (۳)، C: غلظت اسید گالیک محاسبه شده توسط منحنی کالیبراسیون (میلی گرم بر میلی لیتر)، V: حجم عصاره نانوالیاف (میلی لیتر) و M: وزن نانوالیاف خشک (گرم) می باشد.

همچنین قدرت آنتی اکسیدانی نانوالیافها براساس روش DPPH محاسبه شد. ابتدا، غلظت های متفاوت (۲۰۰۰۰-۴۰۰۰۰ میلی گرم بر لیتر) از محلول نانوالیاف تولید شد و با ۳/۹ سی سی محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار DPPH مخلوط گردید و پس از ۶۰ دقیقه نگهداری، جذب هریک از محلولها در طول موج ۵۱۷ نانومتر یادداشت گردید و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی نانوالیافها طبق رابطه (۴) محاسبه شد:

رابطه (۴)

= درصد فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH

$$\left(\text{Abc}_{DPPH} - \frac{\text{Abc}_{\text{extract}}}{\text{Abc}_{DPPH}} \right) \times 100$$

در رابطه (۴)، Abc_{DPPH} : مقدار جذب محلول متانولیکی DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر و $\text{Abc}_{\text{extract}}$: مقدار جذب برای عصاره نانوالیافها در طول موج ۵۱۷ نانومتر می باشد.

آماده سازی فیله ماهی سالمون

ماهی دودی یک محصول سنتی در برخی کشورهاست که با استفاده از شور کردن ماهی به روش مخلوط و سپس دود سرد تهیه می شود. برای تهیه ماهی دودی، ابتدا بایست فیله ماهی تهیه شود. ماهی سالمون پرورشی به وزن تقریبی ۵ کیلوگرم از شرکت تعاونی پرورش ماهیان مشهد خریداری شد و به صورت زنده به آزمایشگاه مواد غذایی منتقل گردید. پس از شست و شوی ماهی با آب سرد و بهداشتی، تخلیه امعا و احشای آن به روش دستی انجام گرفت. سپس مجدد با آب بهداشتی شست و شو داده شد. پس از جدانمودن پوست، فیله هایی با وزن تقریبی (۵±۵۰ گرم) تهیه شد. برای دودی کردن

کلنی بر میلی لیتر از رقت ۰/۵ مک فارلند استفاده شد. در ادامه، پس از پر نمودن چاهکها، هریک از میکروپلیتها در مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند و سپس خانه های فاقد کدورت به عنوان MIC گزارش شد (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008). از هریک از خانه های فاقد کدورت، مقدار ۵ میکرو لیتر به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و در مدت زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. کمترین غلظت باتوجه به عدم مشاهده رشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف

بدین منظور از روش انتشار آگار^۱ جهت مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوالیافها بر باکتری های پاتوژن باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی استفاده شد. جهت انجام این آزمون، ابتدا هریک از نانوالیافها با پانچ استریل به شکل دیسک های ۶ میلی متر درآمد و در ادامه داخل پلیت های میکروبی حاوی باکتری های پاتوژن ذکر شده حاوی محیط کشت MHA که قبلا با ۱۰۰ میکرو لیتر کشت مایع در یک شب که تقریباً معادل با ۱۰^۸ واحد تشکیل کلنی بر میلی لیتر از هریک از باکتری ها می باشد، قرار داده شد. در پایان مساحت منطقه بازدارندگی (میلی متر مربع) محاسبه گردید (Aghaei et al., 2020).

ارزیابی محتوای فنولیک و فعالیت آنتی اکسیدانی

محتوای فنول نانوالیافها توسط روش فولین سیلکاتیو و اسید گالیک به عنوان ترکیب استاندارد مطابق با مطالعه Heydari-Majd، Ghanbarzadeh و همکاران (۲۰۱۹) محاسبه شد. ابتدا ۰/۱ سی سی از محلول تولیدی از نانوالیاف با ۷ سی سی آب مقطر و ۰/۵ سی سی معرف فولین مخلوط شد. پس از نگهداری محلول حاصله به مدت ۸ دقیقه (دمای اتاق)، ۱/۵ سی سی محلول کربنات سدیم ۲ درصد و همچنین ۰/۸ سی سی آب مقطر به آن اضافه شد، تا در نهایت حجم نهایی به ۱۰ سی سی برسد. پس از نگهداری محلول تولیدی در تاریکی کامل (۲ ساعت)، جذب محلول در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی کالیبراسیون توسط اسید گالیک در غلظت های

^۱ Agar diffusion method

از روش داغ و سریع استفاده شد. در دودی کردن به این روش زمان کمتری نیاز است. اما عمر مفید محصول کاهش می‌یابد دمای بین ۹۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد است و زمان دوددهی بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت است. برای این منظور ابتدا نمونه‌ها به منظور دوددهی روی شبکه‌های توری شکل دستگاه دوددهی قرار گرفت. به منظور دوددهی فیله‌ها، برش‌های مربعی شکل از آنها تهیه شد.

در ابتدا دمای دستگاه دوددهی روی ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه بدون هیچ‌گونه فرایند دوددهی تنظیم شد تا فیله‌های ماهی خشک شوند. سپس، فیله‌ها با دود طبیعی (کُند) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۱۰۰ دقیقه و در ادامه به مدت ۶۰ دقیقه با دود سریع با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و در نهایت، برای مدت ۲۰ دقیقه در معرض دود کُند با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد دوددهی شدند (Yean et al., 1998). به منظور بسته‌بندی فیله‌ها در شرایط استریل، برش‌های مربعی شکل از نانوالیافها با ابعاد یکسان بریده شد و سپس فیله‌های ماهی دوددهی شده در داخل نانوالیاف بسته‌بندی شد. نمونه‌ها بعد از برچسب‌زنی در دمای یخچال طی ۱۶ روز در ظروف استریل جهت بررسی میکروبی نگهداری شدند.

بررسی زمان ماندگاری فیله ماهی سالمون پوشش داده شده توسط نانوالیاف

در ابتدا اقدام به آلوده‌سازی مصنوعی فیله ماهی دودی با باکتری لیستریا مونوسیتوژنز^۱ گردید. بدین منظور با استفاده از لوپ سترون از سویه خالص لیستریا مونوسیتوژنز به لوله حاوی ۱۰ سی‌سی محیط کشت نوترینت براث تلقیح نموده و پس از گرم‌خانه‌گذاری لوله به مدت ۱۸ ساعت و تهیه کشت شبانه که معمولاً حاوی 6×10^8 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر از باکتری کشت داده شده است اقدام به شمارش بار کشت شبانه از طریق تهیه رقت‌های متوالی با استفاده از محلول رینگر و کشت پورپلیت با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار و گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گردید. محیط کشت در طی این ۲۴ ساعت کشت شبانه، به منظور جلوگیری از تغییر میزان

طرح آماری

آنالیز آماری این مطالعه با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام پذیرفت. همچنین در این مطالعه تمام آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

² Logarithmic scale of the colony forming units per gram of the fillets

¹ *Listeria monocytogenes*

جدول ۱- خواص فیزیکی شیمیایی نانوالیاف‌های گلیادین حاوی غلظت‌های مختلف آویشن شیرازی

زاویه تماس (درجه)	ظرفیت بارگذاری (LC) (درصد)	بازده ریزپوشانی (EE) (درصد)	نانوالیاف
$50/60 \pm 2/0^d$	-	-	گلیادین
$59/20 \pm 2/10^c$	$16/11 \pm 1/30^c$	$80/10 \pm 2/10^c$	گلیادین-۵ درصد اسانس آویشن شیرازی
$66/00 \pm 3/10^b$	$20/10 \pm 1/22^b$	$89/20 \pm 2/22^b$	گلیادین-۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی
$73/11 \pm 2/20^a$	$23/08 \pm 0/09^a$	$95/15 \pm 1/11^a$	گلیادین-۱۵ درصد اسانس آویشن شیرازی

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار در سه تکرار است.

حروف کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها می‌باشد ($P < 0/05$).

نتایج و بحث

بازده ریزپوشانی و ظرفیت بارگذاری اسانس

اسانس آویشن شیرازی به‌عنوان یک ماده بسیار فرار، در سطح نانوالیاف (بدون کپسول) مستعد تبخیر می‌باشد و از این رو، ظرفیت بارگذاری (LC^1) و بازده ریزپوشانی (EE^2) آن باید برای تعیین مناسب بودن روش الکترورسی بررسی شود (Yang et al., 2017). بازده ریزپوشانی (EE)، به‌عنوان راندمان به‌دام‌افتادن اسانس در ساختار نانوالیاف تعریف می‌گردد و ظرفیت بارگذاری (LC)، مقدار اسانس محصورشده از جرم کل استفاده‌شده در سیستم نانوالیاف در نظر گرفته می‌شود (Akhoond Zardini et al., 2018). نتایج این آزمون در جدول (۱) نشان داده شده است. با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی از ۵ به ۱۵ درصد، میزان درصد EE و LC اسانس در نانوالیاف گلیادین به ترتیب از ۸۰ به ۹۵ درصد و ۱۶ تا ۲۳ درصد افزایش یافت (جدول ۱). همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است، تمامی نانوالیاف‌های گلیادین بارگذاری‌شده با اسانس، مقادیر EE بسیار بالایی را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعه‌ها مطابقت داشت که در آن LC و EE اسانس باریجه به ترتیب حدود ۲۰ و ۹۴ درصد برای نانوالیاف زئین اندازه‌گیری شد (Heydari-Majd, 2019). همچنین Yang و همکاران (2017) ضمن بارگذاری اسانس در نانوالیاف الکترورسی‌شده به روش کوکسیال اظهار داشتند که مقادیر LC و EE اسانس بارگذاری‌شده به ترتیب حدود ۱۴/۵ و ۹۹/۶ درصد بود.

بررسی ویژگی آب‌گریزی سطح

میزان زاویه تماس، نشان‌دهنده آب‌دوستی و آب‌گریزی

سطح می‌باشد. هرچه گروه‌های آب‌دوست بیشتر و در دسترس‌تر باشد میزان زاویه تماس کمتر است. معمولاً زاویه تماس بیشتر از ۶۵ درجه حاکی از آب‌گریزی سطح می‌باشد. میزان آب‌گریزی نانوالیاف گلیادین حاوی سه غلظت اسانس آویشن شیرازی در جدول (۱) نشان داده شده است. نانوالیاف گلیادین خالص زاویه تماس ۵۰ را نشان داد (جدول ۲). افزودن سه غلظت مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) اسانس آویشن شیرازی موجب افزایش میزان زاویه تماس نانوالیاف از ۵۹ به ۷۳ درجه گردید. دلیل افزایش میزان آب‌گریزی سطح (افزایش زاویه تماس) با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی می‌تواند به دلیل حضور ترکیبات آب‌گریز (ترکیبات مؤثره) در ساختار اسانس باشد. از سوی دیگر، پیوند بین گروه‌های OH آزاد موجود در گلیادین با اسانس آویشن شیرازی سبب می‌گردد که این گروه‌های آب‌دوست از دسترس خارج شوند و لذا مقدار آب‌دوستی سطح نانوالیاف گلیادین کاهش یابد. نتایج مشابه برای فیلم کیتوزان (Ojagh et al., 2010) و فیلم پلی‌ساکارید محلول سوپا (Salarbashi et al., 2014) با افزودن اسانس گزارش شد. همچنین نتایج مطالعه Heydari-Majd و همکاران (2022) نشان داد که الحاق اسانس‌های آویشن شیرازی و نعناع به پلیمر پلی‌لاکتیک اسید منجر به افزایش بیشتر در زاویه تماس گردید. مقدار زاویه تماس به دست‌آمده برای اسانس آویشن شیرازی به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیشتر از مقدار به دست‌آمده برای اسانس نعناع بود که نشان می‌دهد اسانس آویشن شیرازی آب‌گریزتر است (Heydari-Majd et al., 2022).

¹ Loading Capacity

² Encapsulation efficiency

جدول ۲- مقادیر رنگ‌سنجی و کدورت نانوالیاف‌های گلیادین حاوی اسانس آویشن شیرازی

کدورت	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>L</i>	نانوالیاف
۵۵/۰±۰/۹۰ ^d	۸/۰۰±۰/۱۶ ^d	-۰/۶۲±۰/۱۳ ^a	۸۶/۹۷±۰/۰۰۳ ^a	گلیادین
۶۰/۱±۰/۳۰ ^c	۱۴/۸۰±۰/۶۵ ^c	-۲/۳۴±۰/۲۳ ^b	۸۵/۲۱±۰/۰۰۲ ^b	گلیادین-۵ درصد اسانس آویشن شیرازی
۶۹/۱±۰/۸۰ ^b	۲۳/۲۲±۱/۱۱ ^b	-۴/۲۸±۰/۱۱ ^c	۸۲/۸۱±۰/۰۰۲ ^c	گلیادین-۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی
۸۶/۰±۰/۸۰ ^a	۳۰/۳۳±۰/۶۶ ^a	-۴/۶۳±۰/۲۰ ^c	۷۹/۶۳±۰/۰۰۲ ^d	گلیادین-۱۵ درصد اسانس آویشن شیرازی

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه تکرار است.

حروف کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۳- مقادیر MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی بر ۴ باکتری پاتوژن

MIC (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)	MBC (میکرولیتر بر میلی‌لیتر)	میکروارگانیزم
۰/۱۲۵	۰/۲	استافیلوکوکوس اورئوس
۰/۲	۰/۴	اشریشیاکلی
۰/۲	۰/۴	باسیلوس سوبتیلیس
۰/۵	۱/۲۵	سودوموناس آئروژینوزا

ویژگی‌های رنگی

مقادیر کدورت نانوالیاف‌های گلیادین حاوی غلظت‌های مختلف (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) اسانس آویشن در **جدول ۲** نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن بود که افزودن اسانس به نانوالیاف گلیادین موجب افزایش مقادیر کدورت (کاهش شفافیت) شد. بیشترین مقدار کدورت (۸۶) در نانوالیاف حاوی ۱۵ درصد اسانس آویشن مشاهده شد. پراکنش نور به وسیله گلبول‌های چربی موجود در اسانس آویشن (با میزان اندیس رفراکت متفاوت نسبت به فاز پیوسته) و همچنین ویژگی‌های محلول تولیدی (حجم بخش و غلظت فاز چربی) سبب افزایش مقادیر کدورت نانوالیاف طی افزودن اسانس می‌شود. نتایج مشابهی در مطالعه Niu و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده شد که در آن، افزودن اسانس دارچین به نانوالیاف سبب افزایش مقادیر کدورت نانوالیاف گردید.

تعیین MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی

در **جدول ۳**، مقادیر MIC و MBC اسانس آویشن شیرازی بر ۴ باکتری پاتوژن اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است. نتایج این آزمون حکایت از آن دارد که در بین این ۴ باکتری بیماری‌زا، باکتری پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس (MIC، ۰/۱۲۵ میکرو بر میلی‌لیتر و MBC، ۰/۲ میکرو بر میلی‌لیتر) حساس‌ترین و باکتری سودوموناس آئروژینوزا (MIC، ۱/۲۵ میکرو بر میلی‌لیتر و MBC، ۰/۵ میکرو بر میلی‌لیتر) مقاوم‌ترین باکتری در برابر

خواص بصری و نوری از مهم‌ترین ویژگی‌های فیلم‌هایی است که در بسته‌بندی مواد غذایی به کار می‌روند. نتایج پارامترهای رنگی (L^* ، a^* و b^*) نانوالیاف‌های گلیادین در **جدول ۲** نشان داده شده است. بیشترین شفافیت (L^*) بیشتر) در نانوالیاف خالص گلیادین مشاهده شد. افزودن اسانس آویشن تا غلظت ۱۵ درصد به نانوالیاف سبب کاهش شفافیت از ۸۶/۹۷ به ۷۹/۶۳ شد. همچنین افزودن اسانس سبب شد که پارامتر رنگی a نیز از ۱/۷۲ تا ۵/۷۳- کاهش یابد اما در طرف مقابل یک روند افزایشی در پارامتر b از ۶/۵۰ تا ۲۴/۴۶ مشاهده شد. در پی افزودن اسانس آویشن به نانوالیاف گلیادین خالص مشاهده شد که میزان زردی نانوالیاف‌ها افزایش یافت که می‌تواند دلیلی برای کاهش پارامترهای L^* و a^* و از سوی دیگر افزایش مقادیر پارامتر b^* باشد. بررسی مطالعه‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات فنولیک اسانس آویشن (از قبیل تیمول و کارواکرول) سبب جذب نور در طول موج‌های خاصی می‌گردد و این امر می‌تواند دلیلی بر تغییرات پارامترهای ذکر شده باشد (Shen & Kamdem, 2015). در مطالعه Jouki و همکاران (۲۰۱۴) نتایج مشابهی را طی افزودن اسانس پونه کوهی بر پارامترهای رنگی فیلم خوراکی موسیلاژ دانه به مشاهده نمودند. همچنین این نتایج مشابه با نتایج مطالعه Shojaee-Aliabadi و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد که در آن افزودن اسانس زیره به پوشش تولیدی برحسب کاراگینان سبب کاهش پارامترهای L^* و a^* گردید.

غلظت اسانس آویشن تا ۱۵ درصد، فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی ($P < 0.05$) روی هر دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی به وجود آمد. نتایج جدول (۴) نشان داد که مقادیر مهارکنندگی اسانس آویشن بر باکتری سالمونلا تیفی (گرم منفی) بسیار کمتر از باسیلوس سوبتیلیس (گرم مثبت) می باشد. به عنوان مثال در غلظت ۱۵ درصد اسانس، میزان هاله تشکیل شده برای باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی به ترتیب ۲۹۷ و ۱۹۵ میلی متر مربع بود. به عبارتی دیگر باکتری پاتوژن گرم منفی، از مقاومت بیشتری نسبت به اسانس آویشن برخوردار بود. مطالعه ها نشان می دهد که باکتری های گرم منفی از قبیل سالمونلا تیفی به دلیل دارا بودن غشای اضافی خارجی در اطراف دیواره سلولی خود، توانایی این را دارند که از رهائش ترکیبات آب گریزی مانند اسانس گیاهی از عرض غشای لیپوساکاریدی خود تا حد زیادی جلوگیری نمایند (Heydari-Majd, 2021). مطالعه (Tayebi-Moghaddam et al., 2021) و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که در آن مطالعه، فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی دو اسانس آویشن شیرازی و نعناع، سبب مهار بیشتر رشد باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی شد. فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف گلیادین فعال موجود در این مطالعه حاوی اسانس آویشن شیرازی به دلیل وجود ترکیبات مؤثره (با خاصیت ضد میکروبی) موجود در اسانس آویشن شیرازی می باشد. مکانیسم های متعددی برای فعالیت ضد میکروبی ترکیبات مؤثره موجود در اسانس آویشن شیرازی گزارش شده است. این مکانیسم ها شامل غیرفعال سازی در مسیر سنتز آنزیم های تنفسی در میتوکندری، اختلال در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری و خروج یون ها و محتوای داخل سلولی آن می باشد (Burt, 2004).

تأثیرات ضد میکروبی اسانس آویشن می باشد. لذا می توان بیان نمود که باکتری گرم منفی حساسیت کمتری نسبت به باکتری گرم مثبت به اسانس آویشن نشان داد. مطالعه ها نشان می دهد که باکتری های گرم منفی به دلیل وجود یک دیواره اضافی در اطراف غشای لیپوپلی ساکاریدی خود در برابر ترکیبات ضد میکروبی اسانس ها مقاومت می نمایند (Oulkheir et al., 2017). Heydari-Majd, Rezaeina و همکاران (۲۰۱۹) ضمن مطالعه روی ویژگی های ضد میکروبی نانوالیاف زئین حاوی سه غلظت اسانس باریجه دریافتند که باکتری های پاتوژن گرم مثبت دارای حساسیت بیشتری در مقایسه با گرم منفی ها در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس باریجه داشتند. همچنین مطالعه ها نشان داده است که ویژگی های ضد باکتریایی اسانس آویشن شیرازی به دلیل حضور ترکیبات مؤثره موجود در آن از قبیل تیمول و کارواکرول می باشد (Oulkheir et al., 2017).

فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف

خصوصیات ضد میکروبی نانوالیاف گلیادین حاوی سه غلظت اسانس آویشن شیرازی (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی) در برابر دو باکتری باسیلوس سوبتیلیس و سالمونلا تیفی بیماری زا در جدول (۴) نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که نانوالیاف خالص گلیادین هیچ گونه هاله رشدی در برابر باکتری های پاتوژن نشان نداد. افزودن اسانس آویشن به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی به نانوالیاف باعث شد که اسانس آویشن از طریق ژل آگار نفوذ نماید و هاله قابل مشاهده ای را در اطراف دیسک های نانوالیاف تشکیل دهد. هیچ گونه هاله عدم رشدی در اطراف نانوالیاف گلیادین حاوی ۵ درصد اسانس آویشن روی باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی مشاهده نشد (عدم ایجاد هاله). اما با افزایش

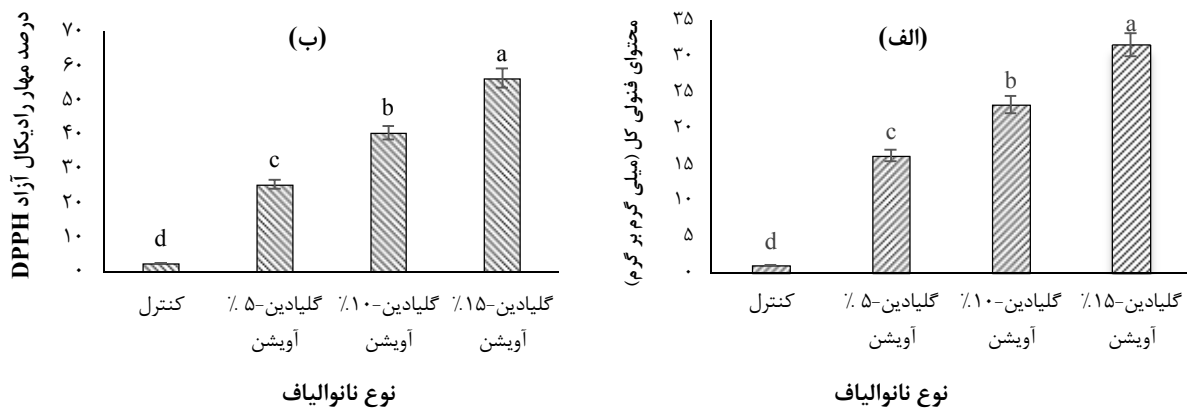
جدول ۴- فعالیت ضد میکروبی نانوالیاف های فعال گلیادین

هاله بازدارندگی (میلی متر مربع)		فیلم
باسیلوس سوبتیلیس	سالمونلا تیفی	گلیادین
nd	nd	گلیادین- ۵ درصد اسانس آویشن شیرازی
۸۹/۸۸±۶/۷۰	nd	گلیادین- ۱۰ درصد اسانس آویشن شیرازی
۱۷۷/۲۶±۴/۹۰	۶۱/۳۱±۱۵/۳۹	گلیادین- ۱۵ درصد اسانس آویشن شیرازی
۲۹۷/۶۸±۵/۷۰	۱۹۵/۵۹±۹/۴۱	

nd: شناسایی نشد.

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار در سه تکرار است.

حروف کوچک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی داری بین داده ها می باشد ($P < 0.05$).



شکل ۱- نانوالیاف گلیادین حاوی اسانس آویشن (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، وزنی/وزنی)، (الف) محتوای فنول و (ب) فعالیت آنتی‌اکسیدانی حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌داری بین داده‌ها می‌باشد ($P < 0.05$).

شیرازی مشاهده شد. بررسی مطالعه‌ها نشان می‌دهد که افزودن اسانس به بسته‌بندی‌های خوراکی موجب بهبود خصوصیات آنتی‌اکسیدانی شد. به‌طور مشابه، فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه استات سلولز طی افزودن غلظت‌های مختلف اسانس مرزه، ویژگی آنتی‌اکسیدانی نشان داد (Sukhtezari et al., 2017) و همچنین فیلم کیتوزان با افزودن اسانس آویشن شیرازی خاصیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد (Moradi et al., 2012).

ارزیابی میکروبی فیلۀ پوشش داده‌شده

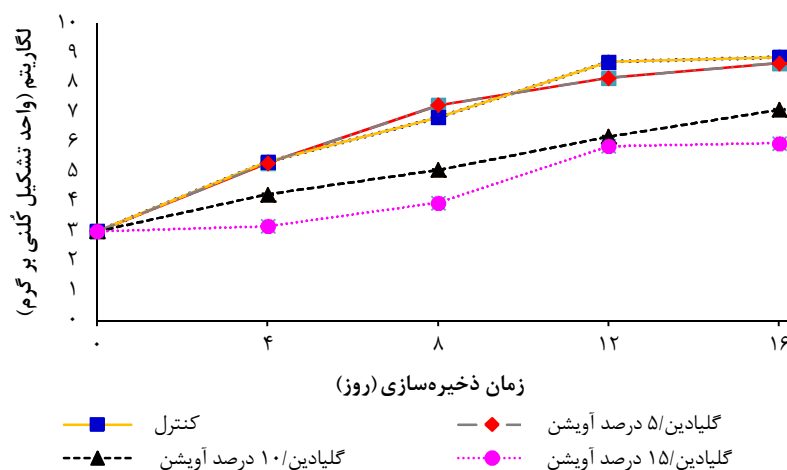
نتایج بررسی ویژگی ضد میکروبی نانوالیاف گلیادین حاوی اسانس آویشن روی فیلۀ ماهی دودی حاوی باکتری پاتوژن لیستریا مونوسیتوژنز در شکل (۲) نمایش داده شده است. مقدار اولیه باکتری لیستریا در فیلۀ دودی مقدار ۳ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم بود. مطابق با شکل (۲)، در نمونه کنترل، جمعیت لیستریا در روز ۱۲ نگهداری به ۸/۷ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم رسید و در روز ۱۶، تا ۸/۸۷ لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر گرم افزایش یافت. با پوشش‌دهی فیلۀ توسط نانوالیاف خالص گلیادین، یک کاهش غیرمعنی‌دار ($P < 0.05$) در میزان لیستریا طی کل زمان نگهداری در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده گردید. نانوالیاف حاوی ۱۵ درصد اسانس آویشن شیرازی رشد میکروب‌ها را نسبت به نانوالیاف حاوی ۵ درصد اسانس به شکل مناسب‌تری به تأخیر انداخت. نانوالیاف حاوی ۱۵ درصد اسانس سبب کاهش حدود ۳ لگاریتم در جمعیت لیستریا در مقایسه با نمونه پوشش داده‌نشده در روز ۱۶ نگهداری گردید.

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانوالیاف

نتایج ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانوالیاف گلیادین در شکل (۱) نشان داده شده است. نانوالیاف خالص گلیادین خالص به‌خودی‌خود هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان نداد (شکل ۱-الف). محتوای فنول کل نانوالیاف گلیادین با افزایش غلظت آویشن شیرازی افزایش یافت و بیشترین مقدار محتوای فنولی (۳۱/۱۶) میل‌گرم اسید گالیک بر گرم نمونه) در نانوالیاف گلیادین حاوی ۱۵ درصد اسانس آویشن شیرازی مشاهده گردید. این موضوع درباره مقادیر بیشتر ترکیبات فنولیک و ترپنوئیدی موجود در آویشن (تیمول، کارواکرول و او-سیمن^۱) با گسترۀ وسیعی از توانایی آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در مطالعه‌های مشابه، فیلم کاپا-کاراگینان با افزودن اسانس مرزه، محتوای فنول بیشتری را نشان داد (Shojaee-Aliabadi et al., 2013).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن شیرازی برحسب رادیکال‌های DPPH به‌عنوان درصدی از اسانس آویشن بیان می‌شود که می‌تواند مقادیر جذب رادیکال DPPH را به نصف آن مقادیر کاهش دهد. شکل (۱-ب) میزان مهار رادیکال DPPH توسط نانوالیاف‌های گلیادین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش غلظت اسانس آویشن شیرازی افزایش یافت. شکل (۱-ب) نشان داد که بیشترین میزان مهار رادیکال (۵۶/۵ درصد) در نانوالیاف گلیادین حاوی ۱۵ درصد اسانس آویشن

¹ O-Cymene



شکل ۲- میانگین لگاریتمی باکتری‌های لیستریا مونوسیژنوز فیله ماهی سالمون طی ۱۶ روز نگهداری در دمای یخچال

عدم رشد نشد و افزایش غلظت اسانس موجب بهبود ویژگی‌های ضد میکروبی نانوالیاف شد. محتوای ترکیبات فنولیک نانوالیاف فعال گلیادین با افزایش غلظت آویشن افزایش یافت. پوشش‌دهی فیله ماهی سالمون با این نانوالیاف سبب شد که زمان ماندگاری آن تا ۱۶ روز افزایش پیدا کند. به‌طور کلی می‌توان بیان داشت که این نانوالیاف می‌تواند در قالب یک بسته‌بندی فعال در پوشش‌دهی محصولات گوشتی و کشاورزی به‌منظور افزایش زمان ماندگاری آنها به‌کار گرفته شود. البته با توجه به اینکه پلیمرها به تنهایی ممکن است به دلیل ویژگی‌های محدودکننده مکانیکی در حین بسته‌بندی در صنعت مواد غذایی، کاربرد محدودی پیدا نمایند لذا در مطالعه‌های آینده بایستی تأثیر افزودن نانوذرات مهندسی شده جهت بهبود ویژگی‌های مکانیکی نانوالیاف‌ها را در کنار ترکیبات ضد میکروبی، مورد مطالعه قرار گیرد.

مشارکت نویسندگان

زهره بهرامی: جمع‌آوری داده و نوشتن پیش‌نویس مقاله؛ احمد پدram‌نیا: بازبینی و اصلاح مقاله؛ محمدرضا سعیدی اصل: تأیید نسخه نهایی؛ محمد آرمین: تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، آنالیز داده‌ها؛ مجتبی حیدری مجد: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، نظارت بر مطالعه.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

Barbiroli و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه خود از ساکاسین^۱ به‌عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی در پوشش‌دهی گوشت استفاده کرد و گزارش نمود که این باکتریوسین توانست جمعیت لیستریا را حدود ۱/۵ لگاریتم در گوشت پوشش‌داده شده بعد از ۴۸ ساعت در دمای یخچالی کاهش دهد. همچنین Trinetta و همکاران (۲۰۱۰) از فیلم خوراکی پولولان حاوی باکتریوسین ساکاسین به‌منظور پوشش‌دهی گوشت سینه بوقلمون استفاده نمودند و نتایج این محققین نشان داد که این فیلم فعال توانست بعد از ۳ هفته در دمای یخچالی سبب کاهش ۱/۵ لگاریتم در جمعیت باکتری پاتوژن لیستریا مونوسیژنوز شود. همان‌گونه که در مبحث خصوصیت ضد میکروبی نانوالیاف ذکر گردید مواد مؤثره اسانس به‌عنوان ترکیبات اصلی بروز خصوصیات ضد میکروبی می‌باشند. مواد مؤثره اسانس سبب صدمه غشای سلولی میکروب می‌گردد و در نتیجه سبب رهایش آدنوزین تری فسفات (ATP^۲) از باکتری می‌گردد (Gram & Huss, 1996).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی بر خصوصیات نانوالیاف فعال گلیادین بررسی شد. افزودن آویشن شیرازی سبب بهبود خصوصیات آب‌گریزی سطح نانوالیاف و ویژگی‌های رنگی گردید. غلظت‌های پایین آویشن در آزمون ضد میکروبی سبب تشکیل هاله

¹ Sakacin

² Adenosin triphosphate

منابع

- Aghaei, Z., Ghorani, B., Emadzadeh, B., Kadkhodae, R., & Tucker, N. (2020). Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness. *Food Control*, *111*, 107065. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107065>
- Akhoond Zardini, A., Mohebbi, M., Farhoosh, R., & Bolurian, S. (2018). Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. *J Food Sci Technol*, *55*(1), 287-298. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2937-5>
- Barbiroli, A., Musatti, A., Capretti, G., Iametti, S., & Rollini, M. (2017). Sakacin-A antimicrobial packaging for decreasing *Listeria* contamination in thin-cut meat: preliminary assessment. *J Sci Food Agric*, *97*(3), 1042-1047. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8120>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol*, *94*(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). *Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard-third edition. CLSI document M31-A3 (ISBN 1-56238-659-X)*. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. <https://www.dbt.univr.it/documenti/OccorrenzaIns/matdid/matdid485539.pdf>
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int J Food Microbiol*, *33*(1), 121-137. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8)
- Hajjari, M. M., Golmakani, M.-T., & Sharif, N. (2021). Fabrication and characterization of cuminaldehyde-loaded electrospun gliadin fiber mats. *LWT*, *145*, 111373. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111373>
- Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Abdolshahi, A., Dahmardeh, S., & Malek Mohammadi, M. (2022). Poly(lactic acid)-based bionanocomposites: effects of ZnO nanoparticles and essential oils on physicochemical properties. *Polymer Bulletin*, *79*(1), 97-119. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03490-z>
- Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M., Najafi, M. A., & Hosseini, M. (2019). A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated *Otolithes ruber* fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, *19*, 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.002>
- Heydari-Majd, M., Rezaeina, H., Shadan, M. R., Ghorani, B., & Tucker, N. (2019). Enrichment of zein nanofibre assemblies for therapeutic delivery of Barije (*Ferula gummosa* Boiss) essential oil. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *54*, 101290. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101290>
- Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A., & Khzaei, N. (2014). Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.001>
- Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(2), 477-484. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.020>
- Niu, B., Yan, Z., Shao, P., Kang, J., & Chen, H. (2018). Encapsulation of Cinnamon Essential Oil for Active Food Packaging Film with Synergistic Antimicrobial Activity. *Nanomaterials (Basel)*, *8*(8). <https://doi.org/10.3390/nano8080598>
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, *122*(1), 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>
- Oulkheir, S., Aghrouh, M., El Mourabit, F., Dalha, F., Graich, H., Amouch, F., . . . Chadli, S. (2017). Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. *Journal of diseases and medicinal plants*, *3*(2-1), 1-5. <https://doi.org/10.11648/j.jdmp.s.2017030201.11>

- Rezaei, M., Montazeri, N., & Heydari, M. (2010). Study of Bacterial Load and Biogenic Amines content in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during storage in ice. *Journal of food science and technology (Iran)*, 7(24), 61-70. <http://fsc.modares.ac.ir/article-7-6082-en.html> (in Persian)
- Rezaeinia, H., Ghorani, B., Emadzadeh, B., & Mohebbi, M. (2020). Prolonged-release of menthol through a superhydrophilic multilayered structure of balangu (*Lallemantia royleana*)-gelatin nanofibers. *Materials Science and Engineering: C*, 115, 111115. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111115>
- Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R., & Noghabi, M. S. (2014). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. *Food Chem*, 146, 614-622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.014>
- Sathivel, S. (2005). Chitosan and Protein Coatings Affect Yield, Moisture Loss, and Lipid Oxidation of Pink Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Fillets During Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 70(8), e455-e459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11514.x>
- Sharif, N., Golmakani, M.-T., Niakousari, M., Ghorani, B., & Lopez-Rubio, A. (2019). Food-grade gliadin microstructures obtained by electrohydrodynamic processing. *Food Research International*, 116, 1366-1373. <https://doi.org/10.3390/nano8110919>
- Sharif, N., Golmakani, M. T., Niakousari, M., Hosseini, S. M. H., Ghorani, B., & Lopez-Rubio, A. (2018). Active Food Packaging Coatings Based on Hybrid Electrospun Gliadin Nanofibers Containing Ferulic Acid/Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *Nanomaterials (Basel)*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.027>
- Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046>
- Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., . . . Khaksar, R. (2013). Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.026>
- Sukhtezari, S., Almasi, H., Pirsá, S., Zandi, M., & Pirouzifard, M. (2017). Investigation of the physical and antioxidant properties of bacterial cellulose active film containing *Scrophularia striata* extract. *Journal of Food Research*, 27(2), 51-62 (in Persian) .
- Tayebi-Moghaddam, S., Khatibi, R., Taklavi, S., Hosseini-Isfahani, M., & Rezaeinia, H. (2021). Sustained-release modeling of clove essential oil in brine to improve the shelf life of Iranian white cheese by bioactive electrospun zein. *International Journal of Food Microbiology*, 355, 109337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109337>
- Trinetta, V., Floros, J. D., & Cutter, C. N. (2010). Sakacin a-containing pullulan film: An active packaging system to control epidemic clones of *listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Safety*, 30(2), 366-381. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00213.x>
- Yang, H., Wen, P., Feng, K., Zong, M. H., Lou, W. Y., & Wu, H. (2017). Encapsulation of fish oil in a coaxial electrospun nanofibrous mat and its properties [10.1039/C7RA00051K]. *RSC Advances*, 7(24), 14939-14946. <https://doi.org/10.1039/C7RA00051K>
- Yean, Y. S., Pruthiarenun, R., Doe, P., Motohiro, T., & Gopakumar, K. (1998). Chapter 3-Dried and smoked fish products. In D. Peter E. (Ed.), *Fish Drying & Smoking: Production and Quality* (pp. 47-87). CRC Press, Technomic Pub. <https://doi.org/10.1201/9780203756003>
- Yong, H., & Liu, J. (2021). Active packaging films and edible coatings based on polyphenol-rich propolis extract: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 2106-2145. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12697>

Evaluation of Antimicrobial Properties of Gliadin Nanofibers Containing *Zataria multiflora* Boiss Essential Oil and its Effect on Shelf-life Extension of Smoked Salmon Fish Fillet

Zohreh Bahrami¹, Ahmad Pedram Nia^{1*}, Mohammadreza Saeidi-Asl¹,
Mohammad Armin², Mojtaba Heydari-Majd^{1,3}

1- Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

* Corresponding author (pedram@iaus.ac.ir)

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

3- Department of Nutrition, Research Center for Clinical Immunology, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran

Abstract

The aim of this study was to produce electrospun gliadin nanofibers containing *Zataria multiflora* Boiss essential oil (ZMEO) (5, 10 and 15%, w/w) to create active antimicrobial mats. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericide concentration (MBC) of essential oil were measured. The ZMEO loaded gliadin nanofibers were characterized for physicochemical, antioxidant and antibacterial activity. Results according to the MIC and MBC revealed that the ZMEO showed the most remarkable bactericidal effect. The nanofibers showed an encapsulation efficiency close to 95% and the presence of ZMEO led to increased contact angle and opaque. ZMEO increased the absorption of color in the visible region, which in turn led to increase of the b^* parameter but reduced a^* and L^* parameters. The nanofibers' antimicrobial activities were induced by incorporating ZMEO, and *Bacillus subtilis* was the most sensitive bacterium to ZMEO-containing nanofibers, while *Salmonella typhi* was the most resistant. The nanofibers incorporating ZMEO showed good antioxidant properties; this effect was greatly improved when the proportion of added ZMEO was 15%. Then, efficacy of bioactive nanofibers included 5, 10 and 15% (w/w) ZMEO to reduce microbial growth (*Listeria monocytogenes*) of smoked salmon fish fillet during chilled storage was evaluated; the results indicated that its final population was reduced to about 2.5-3 Log cycles after 16 days of storage at 4 °C in presence of ZMEO, compared with negative control mats produced without the ZMEO. These results suggest that the developed gliadin nanofibers with active substance could be used in designing antimicrobial packaging materials.

Keywords: Dairy product, Essential oil, Gliadin, Nanofibers, Packaging

