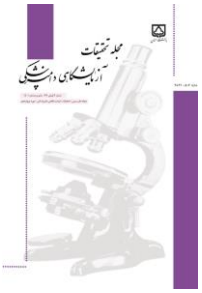

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 15(2023-24)191-201

Designing an antimicrobial edible film based on calcium pectinate containing essential oil and aqueous extract of red pepper

Rezaei, N.[1] , Misaghi, A.[2*], Kamkar, A.[2], Jebelli Javan, A.[3], Akbarian, H.[2].

Received: 21.05.2023 Accepted: 10.03.2024

Abstract

Edible films have gained significant attention as carriers of antioxidant and antimicrobial compounds. Essential oils and aqueous extracts of red pepper, known for their antimicrobial properties in food systems, can be incorporated into the matrix of edible films. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of calcium pectinate edible films containing essential oil and aqueous extract of red pepper against four major foodborne pathogenic bacteria, including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (O157:H7), and *Salmonella enteritidis*, using the disc diffusion method. Disks with a diameter of 9 mm were prepared from calcium pectinate-based films containing 0.5% and 1% essential oil and 2% aqueous extract of red pepper and placed under sterile conditions on pre-inoculated BHI agar plates. The diameter of the inhibition zones was considered as an indicator of the antimicrobial activity of the films. Statistical analysis was performed using Sigma Plot software. The results demonstrated that the designed films effectively inhibited the tested pathogens. Composites containing red pepper essential oil exhibited a remarkable ability to restrict the growth of foodborne pathogenic bacteria at both concentrations. However, the film containing only 0.5% essential oil did not form an inhibition zone against Salmonella enteritidis, indicating no inhibitory effect at this concentration. Additionally, the addition of aqueous extract of red pepper further enhanced the antibacterial properties of the essential oil-containing films. These findings suggest that essential oil and aqueous extract of red pepper can be employed as natural preservatives in calcium pectinate edible films for food packaging applications.

Keywords:Calcium Pectinate, Packaging Film, Antimicrobial, Food, Bioactive Compound.

---

1 Ph.D. student, Department of Food Hygiene, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran, Iran.
2. Department of Food Hygiene, University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran, Iran.
3. Department of Food Hygiene, Semnan University, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan, Iran.
*__Corresponding author__: amisaghi@ut.ac.ir

طراحی فیلم خوراکی ضد میکروبی بر پایه پکتینات کلسیم حاوی اسانس و عصاره آبی فلفل قرمز

رضایی ، ن.[۱]، میثاقی ، ع.[۳*]، کامکار ، ا.[۲]، جبلی جوان، ا.[۳]، اکبرین ، ح.[۲]

دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۳۱ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

خلاصه

فیلم‌های خوراکی به عنوان حامل ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی به ایفای نقش می‌پردازند. اسانس روغنی و عصاره آبی فلفل قرمز که تحت عنوان ترکیبات ضدمیکروبی در سیستم‌های غذایی به شمار می‌روند، می‌توانند در ماتریکس فیلم خوراکی گنجانده شوند. در این مطالعه اثر ضدمیکروبی فیلم خوراکی پکتینات کلسیم حاوی اسانس و عصاره فلفل قرمز بر چهار گونه از مهمترین باکتری‌های پاتوژن غذازاد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیاکلی* (O157;H7) و *سالمونلا انتریتیدیس* با روش دیسک‌های انتشاری مورد بررسی قرار گرفت. از فیلم‌های تولید شده بر پایه پکتینات کلسیم حاوی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد از اسانس و غلظت ۲ درصد عصاره آبی فلفل قرمز، دیسک‌هایی به قطر ۹ میلی‌متر تهیه و در شرایط استریل روی محیط مغز و قلب (BHI) از قبل کشت داده شده، قرار گرفتند. قطر هاله‌های تشکیل شده به عنوان شاخص میزان فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Sigma Plot انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که فیلم‌های طراحی شده به‌طور مؤثر علیه پاتوژن‌های مورد آزمایش عمل کردند و کامپوزیت‌های حاوی اسانس روغنی فلفل قرمز در هر دو غلظت ظرفیت مناسبی برای محدود کردن رشد باکتری‌های بیماریزای مواد غذایی از خود به نمایش گذاشتند. تنها فیلم حاوی ۰/۵ درصد اسانس روی پاتوژن *سالمونلا انتریتیدیس* هیچ هاله عدم رشدی تشکیل نداد یا به عبارتی هیچگونه اثر بازدارندگی در این غلظت نداشت. همچنین اضافه شدن عصاره آبی فلفل قرمز به فیلم‌های حاوی اسانس روغنی، ویژگی‌های ضد باکتریایی فیلم‌ها را تقویت کرد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که اسانس روغنی و عصاره آبی فلفل قرمز می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در ترکیب فیلم خوراکی پکتینات کلسیم جهت بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پکتینات کلسیم، فیلم بسته‌بندی، ضدمیکروبی، مواد غذایی، ترکیب زیست فعال.

---

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

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

۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه سمنان، دانشکده دامپزشکی ، سمنان، ایران.

*نویسنده مسئول: amisaghi@ut.ac.ir

مقدمه

در سال‌های اخیر، با توجه به تمایل روزافزون مصرف کنندگان به مصرف مواد غذایی تازه با فرآوری کمتر، فاقد مواد نگهدارنده و افزودنی‌ها، با کیفیت و مدت زمان ماندگاری بالا، تکنولوژی‌های جدید، با هدف بهبود کیفیت و امنیت زیستی مواد غذایی اهمیت پیدا کرد (Azeredo و همکاران، ۲۰۱۶). با این وجود، بکارگیری یک بسته‌بندی مناسب همواره بعنوان آخرین مرحله فرآیند نگهداری پیش از مصرف ضروری می‌باشد (Bohlmann، ۲۰۰۵). همچنین با استفاده از سیستم بسته‌بندی فعال می‌توان بار میکروبی مواد غذایی را کاهش داده و با ممانعت از فرآیند-های شیمیایی نامطلوب، کیفیت محصول، تازگی و ماندگاری آن را افزایش داد. امروزه، استفاده از بیوپلیمرهای[1] زیست تخریب‌پذیر با مزایایی چون تجزیه‌پذیری، سازگاری با محیط زیست، کاهش واکنش‌های مخرب آنزیمی، فیزیکی، شیمیایی و افزایش ماندگاری مواد غذایی مورد توجه تولیدکنندگان قرارگرفته است. بیوپلیمرهایی که در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: پروتئین‌ها[2]، پلی‌ساکاریدها[3]، لیپیدها[4]، پلی‌استرها [5]که بصورت تنها یا در ترکیب با یکدیگر استفاده می‌شوند (Rojas-graü و همکاران، ۲۰۰۷). پکتین [6]یک پلی‌ساکارید مناسب در تولید فیلم خوراکی می‌باشد. در مطالعات متعددی گزارش شده است که پکتین بعنوان یک پلیمر زیستی به دلیل توانایی تشکیل ژل امکان ساخت فیلم‌های خوراکی را دارد (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۲). از طرف دیگر، کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در موادغذایی مستلزم بکارگیری ترکیبات ضدمیکروبی شیمیایی است. از جمله میکروارگانیسم‌های بیماریزای مهم مواد غذایی، *لیستریا مونوسیتوژنز*[7]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[8]، *اشریشیاکلی* (O157;H7)[9]، *سالمونلا تیفی‌موریوم*[10] می‌باشند که هر ساله عامل ایجاد بیماری‌های غذازاد در جوامع در حال توسعه می‌باشند (Jay و همکاران، ۲۰۰۵). استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی نظیر اسانس‌های روغنی و عصاره‌های گیاهی با ممانعت از واکنش‌های شیمیایی نظیر اکسیداسیون و فعالیت ضدمیکروبی موجب افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی می‌گردند. فلفل قرمز گیاهی از تیره پیپراسه [11]می‌باشد که در بسیاری از مطالعات اثرات ضد-میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن اثبات شده است. برخی از ترکیبات ضدمیکروبی استخراج شده از این گیاه عبارتند از: تیمول[12]، کاپسانتین[13]، لینالول[14]، ترپینن [15]و ترپینئول [16](Zarringhalam و همکاران، ۲۰۱۳). افزودن مستقیم اسانس‌های روغنی و عصاره‌های گیاهی بعنوان مواد نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی اغلب به دلیل ایجاد طعم و مزه محدود شده است. بنابراین برای جلوگیری از این مشکل بهترین رویکرد ادغام این ترکیبات طبیعی در فیلم-های خوراکی است (Kanatt و همکاران، ۲۰۰۸)، از طرفی فیلم‌ها و پوشش‌های پکتین دارای مناطق کریستالی یا آمورف [17]می‌باشند که برای حمل مواد ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی و ادغام شدن با آنها مناسب هستند (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۲).

فیلم‌های خوراکی غنی شده با ترکیبات ضدمیکروبی به لحاظ توانایی آن‌ها در افزایش عمر مفید محصولات غذایی و اثرات بازدارنده آن‌ها در برابر پاتوژن‌های غذازاد بویژه *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیاکلی O157:H7* بطور گسترده‌ای مورد بررسی قرارگرفته‌اند (Salmieri و همکاران، ۲۰۱۴؛ Javidi و همکاران، ۲۰۱۶). هدف از این پژوهش تولید فیلم ضدمیکروبی حاوی اسانس روغنی و

---

[1] Biopolymers
[2] Proteins
[3] Polysaccharides
[4] Lipids
[5] Polyesters
[6] Pectin
[7] *Listeria monocytogenes*
[8] *Staphylococcus aureus*

[9] *Escherichia coli*
[10] *Salmonella typhimurium*
[11] *Piperaceae*
[12] Thymol
[13] Capsanthin
[14] Linalool
[15] Terpinene
[16] Terpineol
[17] Amorphous

عصاره آبی فلفل قرمز و بررسی تاثیر خواص ضد میکروبی آن بر برخی پاتوژن های غذازاد نظیر *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی O157;H7* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به روش دیسک‌های انتشاری بوده است.

مواد و روش کار

مواد

در این پژوهش، پکتین مرکبات به عنوان ماده اصلی ساخت فیلم‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفت. این پکتین که قابلیت ایجاد پیوند با کاتیون‌های دو ظرفیتی نظیر کلسیم و منیزیم را دارا می‌باشد، از شرکت سیگما آلدریچ [18]تهیه گردید. گلیسرول [19]با درجه خلوص ۸۷ درصد به عنوان پلاستی‌سایزر[20]، کلسیم کلرید به عنوان عامل اتصال عرضی و توئین ۸۰ [21]به عنوان امولسیفایر [22]از شرکت مرک [23]خریداری شدند. سویه‌های میکروبی مورد مطالعه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران واقع در سازمان پژوهش‌های علمی–صنعتی ایران اخذ گردیدند.

تاکید می‌شود که کلیه محیطهای کشت، محلول‌های شیمیایی و مواد مصرفی در این تحقیق از نمایندگی شرکت مرک آلمان تهیه و محیطهای کشت فوق‌الذکر بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده آماده‌سازی گردیدند. برای انجام مراحل مختلف این پژوهش، از دستگاه هموژنایزر [24]مدل IKA T25-digital شرکت Itra turraxU(آلمان) و کالیپر دیجیتال با دقت ± ۲ میلی‌متر ساخت Scientific Fisher استفاده شد.

استخراج اسانس

گیاه فلفل قرمز (*capsicum annum*) خریداری و پس از شناسایی، اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر [25]و آنالیز ترکیبات با دستگاه gc/ms انجام شد. در هر نوبت ۱۰۰ گرم پودر فلفل قرمز با نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط و به مدت ۳ ساعت توسط دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد.

اسانس فلفل قرمز را در ویال‌ها جمع و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی تا زمان استفاده نگهداری کردیم. اسانس فلفل قرمز پس از آماده‌سازی، به دستگاه gc/ms تزریق شد تا نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده آن مشخص شود .مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل (Finningan Quest Thermo) شامل: ستون مویینه به طول ۳۰ mm، قطر داخلی ۲۵۰ µm و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ µmاز نوع MS-5Hp با برنامه دمایی ^{o}c ۵۰ تا ^{o}c ۲۶۵ و با افزایش تدریجی ^{o}c ۲/۵ در هر دقیقه و نگهداری ستون در ^{o}c ۲۶۵ به مدت ۱۰–۲ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق^{o}c ۲۶۵ و سرعت گاز هلیوم به‌عنوان حامل ۲/۱ میلی‌لیتر در هر دقیقه بود. طیف-سنج جرمی مدل (FQuest Thermo) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ^{o}c ۲۵۰ بود.

استخراج عصاره آبی

استخراج عصاره آبی فلفل قرمز به روش سان و همکاران (۲۰۱۸) انجام پذیرفت. ۲۰۰ گرم گیاه به نسبت یک به یک وزنی_حجمی در بافر فسفات ۲۰۰ میلی‌مولاری با pH= ۷ با هموژنایزر همگن شد. پس از صاف شدن آن را به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کردیم و مایع رویی به عنوان عصاره آبی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه فیلم خوراکی پکتین

آماده‌سازی فیلم پکتین با اندکی تغییرات طبق روش نیسار و همکاران (۲۰۱۸) صورت گرفت. پکتین را به میزان ۲ درصد وزنی/حجمی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با همزن مغناطیسی مخلوط کردیم، پس از سرد شدن، ماده خشک گلیسرول به میزان ۴۰ درصد وزنی/وزنی به محلول اضافه و محلول به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مخلوط و در نتیجه محلول فیلم شاهد تهیه شد. برای تهیه فیلم‌های حاوی اسانس فلفل قرمز بعد از مخلوط شدن گلیسرول به محلول حاصل، اسانس در غلظت‌های ۱ و ۰/۵درصد حجمی/ وزنی ماده خشک پکتین به همراه ۵ درصد حجمی/حجمی ماده خشک، توئین–۸۰ بعنوان امولسیفایر اضافه و سپس توسط همزن با دور ۹۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. عصاره آبی فلفل قرمز به نسبت ۲ درصد حجم به حجم به محلول اضافه شد و مخلوط حاصل به کمک

[18] Sigma-Aldrich
[19] Glycerol
[20] Plasticizers
[21] tween 80
[22] Emulsifier
[23] *Merck*
[24] Homogenizer
[25] Clevenger

دستگاه هموژنایزر با دور ۸۰۰۰ در دقیقه به مدت ۲ دقیقه کاملا هموژن گردید. محلول تهیه شده در قالب‌های شیشه-ای ریخته شد و بعد از بخار شدن حلال در دمای اتاق، کامپوزیت‌های تهیه شده در شرایط استریل از قالب‌ها جدا و در ابعاد دیسک‌های ۹ میلی‌متری بریده شدند. در نهایت نیز تمامی کامپوزیت‌ها درون دسیکاتور[۲۶]حاوی سیلیکاژل تا زمان تست قرار گرفتند.

فعالسازی سویه‌های میکروبی استاندارد

اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های موردنظر علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری‌های بیماریزا عبارت بودند از *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 19111)، *اشریشیاکلی* O 157;H7 (ATCC 10536)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028). بمنظور فعالسازی سویه‌های میکروبی از کشت‌های ذخیره سویه‌های میکروبی در محیط آگار مغز و قلب (BHI[۲۷]) به‌مدت یک شبانه روز در ۳۷ ^{o}c گرمخانه‌گذاری شدند. برای تهیه میزان تلقیح، سلول‌های باکتریایی به لوله‌های حاوی محیط آبگوشت مغز و قلب، انتقال داده شد و پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، از سوسپانسیون میکروبی حاصل در داخل کووت استریل ریخته شد تا تراکم باکتریایی ۱۰^{۷} × ۱ واحد تشکیل‌دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر[۲۸]در طول موج ۶۰۰ nm حاصل شود. تعداد سلول‌های باکتریایی در هر سوسپانسیون به کمک کشت در محیط آگار قلب و مغز تخمین زده شد (Özge Erdohan و همکاران، ۲۰۱۳).

بررسی اثر ضدمیکروبی فیلم پکتینات کلسیم حاوی اسانس و عصاره فلفل قرمز بر باکتری‌ها

عملکرد ضدمیکروبی فیلم پکتینات کلسیم حاوی غلظت های مختلف اسانس و عصاره آبی فلفل قرمز در شرایط آزمایشگاهی به کمک روش انتشار از دیسک به آگار مورد ارزیابی قرار گرفت (Jouki و همکاران، ۲۰۱۴). در شرایط استریل و در زیر هود مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون-های باکتریایی با غلظت ۱۰^{۷} × ۱، با کمک سمپلر به محیط کشت آگار مولر هینتون[۲۹]منتقل گردید و به وسیله میله‌ای شکل استریل در سطح محیط کشت پخش شد. سپس فیلم‌های حاوی اسانس و عصاره آبی فلفل قرمزکه به صورت دیسک‌هایی با قطر ۹ mm بریده شده بود، روی محیط کشت قرار داده شد. محیط‌های کشت همراه با دیسک‌ها به صورت وارونه در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت از گرمخانه خارج و مورد بررسی قرار گرفتند و قطر هاله عدم رشد که در اطراف دیسک‌ها تشکیل شده بود به‌وسیله کالیپر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و ثبت شد. فیلم پکتینات کلسیم خالص به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

طرح آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل اسانس و عصاره فلفل قرمز در ۶ تیمار و بر ۴ باکتری پاتوژن غذایی بودند. جهت بررسی معنی‌دار بودن تاثیر سطوح مختلف اسانس و عصاره فلفل قرمز بر اساس میزان مهار رشد باکتری بر روی محیط کشت از نرم افزار Sigma Plot استفاده گردید و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA[۳۰]) جهت مقایسه میانگین‌ها در سطح 0.05 P< استفاده شد.

نتایج

آنالیز اسانس فلفل قرمز

نتیجه آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس فلفل قرمز دراین مطالعه با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنجی جرمی همراه با شاخص بازداری در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج بیشترین ترکیب موجود در اسانس مربوط به تیمول (۴۴/۷۰ درصد) بود و پس از آن هگزیل ایزووالرات[۳۱](۱۴/۵۰ درصد)، لینالول (۵/۵۰) و کپسایسین[۳۲](۵/۴۹ درصد) بود.

[26] Desiccator
[27] brain-heart infusion
[28] Spectrophotometer
[29] Mueller-Hinton agar
[30] Analysis of variance
[31] Hexyl isovalerate
[32] Capsaicin

جدول ۱. ترکیبات اسانس فلفل قرمز

شماره	اجزاء	شاخص بازدارندگی	نسبت (٪)
۱	D-Limonene	۱۰۲۵	۲/۵۰
۲	Y-Terpinene	۱۰۳۸	۰/۳
۳	1-Octanol	۱۱۶۵	۱/۴۵
۴	Linalool	۱۱۹۸	۵/۵۰
۵	Hexyl isobutyrate	۱۲۳۱	۲/۶۵
۶	4-Carvomenthenol	۱۳۱۱	۱/۶۵
۷	Decanal	۱۳۳۵	۰/۴۵
۸	Terpineol	۱۳۳۲	۲/۹۹
۹	β-Citronnellol	۱۳۵۰	۱/۶۰
۱۰	Hexyl isovalerate	۱۳۷۵	۱۴/۵۰
۱۱	Geranial	۱۳۹۰	۰/۳۵
۱۲	1-Decanol	۱۴۱۰	۱/۲۵
۱۳	Thymol	۱۴۲۵	۴۴/۷۰
۱۴	capsaicin	۱۴۶۰	5.49
۱۵	dihydrocapsaicin	۱۴۶۷	۱/۰۲
۱۶	Decanoic acid	۱۴۸۹	۰/۸
۱۷	Copaene	۱۵۲۵	۰/۴۲
۱۸	β-elemene	۱۵۵۱	۱/۶۲
۱۹	α-ionone	۱۵۸۲	۰/۲۲
۲۰	Caryophyllene	۱۵۹۲	۱/۰۵
۲۱	α-Humulene	۱۶۳۰	۰/۱۸
۲۲	Myristicin	۱۶۶۰	۰/۵
۲۳	β-Selinene	۱۶۷۱	۲/۰۶
۲۴	δ-Cadinene	۱۶۸۷	۰/۹۱
۲۵	Elemol	۱۷۳۲	۰/۷۰
۲۶	Elemicin	۱۷۳۷	۰/۹
۲۷	Oxyde de caryophyllene	۱۷۷۳	۱/۰۱
۲۸	δ-Cadinol	۱۷۹۶	۰/۳۵
۲۹	α-Cadinol	۱۸۴۹	۰/۹
۳۰	Asarone	۱۸۵۵	۰/۰۵
۳۱	Myristic acid	۱۹۲۵	۰/۶
۳۲	benzyl benzoate	۱۹۵۰	۱/۰۵
			۹۹/۶۲

٪: با مساحت پیک کروماتوگرافی محاسبه می شود.

جدول شماره ۲ نتایج مربوط به اثر ضد میکروبی فیلم پکتینات کلسیم حاوی غلظت‌های مختلف 0/5 و ۱ درصد اسانس فلفل قرمز و غلظت ۲ درصد عصاره آبی فلفل قرمز علیه چهار پاتوژن مورد مطالعه، با روش دیسک‌های انتشاری را نشان می‌دهد.

جدول ۲. اثر ضد میکروبی فیلم پکتینات کلسیم

متوسط قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر (انحراف معیار ± میانگین)				
تیمارهای فیلم خوراکی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*لیستریا مونوسیتوژن*	*اشریشیا کلی*	*سالمونلا انتریتیدیس*
فیلم پکتینات کلسیم	۰^{f}	۰^{f}	۰^{f}	۰^{f,e}
فیلم حاوی اسانس ۰/۵ درصد فلفل قرمز	(۹/۰۲ ± ۰/۱۲۱)^{d}	(۷/۸۰ ± ۰/۳۰۰)^{d}	(۶/۵۰ ± ۰/۵۰۰)^{d}	(۰)^{e,f}
فیلم حاوی اسانس ۱ درصد فلفل قرمز	(۱۱/۹۳ ± ۰/۳۰۶)^{c}	(۱۰/۵۳ ± ۰/۵۰۳)^{c,b}	(۹/۱۳ ± ۰/۳۵۱)^{c}	(۷/۴۰ ± ۰/۲۶۵)^{b}
فیلم حاوی عصاره فلفل قرمز	(۸/۰۳ ± ۰/۳۰۶)^{e}	(۶/۷۰ ± ۰/۴۵۸)^{e}	(۵/۲۰ ± ۰/۳۰۰)^{e}	(۶/۰۳ ± ۰/۱۵۳)^{d,c}
فیلم اسانس ۰/۵ درصد فلفل قرمز+عصار ه	(۱۳/۰۰ ± ۰/۵۰۰)^{b}	(۱۱/۱۳ ± ۰/۳۵۱)^{b,c}	(۱۰/۰۳ ± ۰/۲۵۲)^{b}	(۶/۲۶ ± ۰/۰۵۷)^{c,d}
فیلم حاوی اسانس ۱ درصد فلفل قرمز+عصاره	(۱۵/۵۶ ± ۰/۵۰۳)^{a}	(۱۲/۵۱ ± ۰/۳۰۱)^{a}	(۱۱/۴۰ ± ۰/۳۴۶)^{a}	(۹/۳۰ ± ۰/۲۶۵)^{a}

*در هر ستون (پارامتر) حروف کوچک غیریکسان نشان‌دهنده معنادار بودن است.

همانطور که مشاهده می‌شود به استثناء فیلم خالص پکتینات کلسیم که هیچ‌گونه فعالیت ضدمیکروبی نشان نداد، تمامی فیلم‌های تهیه شده در این مطالعه، در کشت های مربوط به چهار پاتوژن مورد استفاده هاله عدم رشد ایجاد نمودند به‌جز فیلم حاوی اسانس 0/5 درصد فلفل قرمز که در رابطه با باکتری سالونلا فعالیت ضدمیکروبی چندانی نشان ندادند. بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به دیسک فیلم پکتینات کلسیم حاوی هر دو ترکیب اسانس (با غلظت یک درصد) و عصاره آبی فلفل قرمز بود که به ترتیب ۱۵/۵، ۱۲/۵، ۱۱/۲ و ۹/۵ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد اطراف این فیلم در کشت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا انتریتیدیس* ثبت شد.

با افزودن عصاره آبی فلفل قرمز به هر دو گروه (فیلم + اسانس 0/5 درصد) و گروه (فیلم + اسانس ۱ درصد) قطر هاله عدم رشد نسبت به فیلم‌های حاوی اسانس به‌تنهایی، بطور معنی‌داری بهبود یافت ($P<0/5$). این موضوع نشان‌دهنده اثر ضدمیکروبی عصاره فلفل قرمز است، اما به تنهایی اثر ضد میکروبی کمتری در مقایسه با اسانس روغنی فلفل قرمز دارد. هر دو باکتری گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به دو باکتری گرم منفی در برابر فیلم‌های فعال داشتند.

بحث

در مطالعه حاضر، به دو علّت از روش دیسک انتشاری برای ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های مذکور بهره گرفته شد؛ اولا، اساس این روش که بر پایه آزاد سازی ماده فعال

از دیسک ها به آگار پیرامونی و ایجاد ناحیه عدم رشد میکروبی در اطراف خود است، و در ثانی کمی بودن این آزمون. پکتین ماده بیولوژیکی و یک پلیمر زیستی موثر در تولید فیلم‌های خوراکی است. بر اساس مطالعات صورت گرفته، فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های فعال به عوامل مختلفی از جمله خصوصیات فیزیکی _ شیمیایی ترکیب ضدمیکروبی و پلیمر اصلی و روش تولید این فیلم‌ها بستگی دارد (Woraprayote و همکاران، ۲۰۱۳؛ Solano و de Gante، ۲۰۱۲). فیلم‌ها و پوشش‌های پکتین دارای مناطق کریستالی یا آمورف می‌باشند که برای حمل مواد ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی و ادغام شدن با آنها مناسب هستند. در مطالعات پیشین، فعالیت ضدباکتریایی اسانس و عصاره فلفل قرمز تائید شده است، در این مطالعه نیز مونوترپن‌ها، ترکیبات استری و ترپینوئیدها بعنوان اجزاء اصلی ضدمیکروبی گزارش شده‌اند که رشد بسیاری از گونه-های باکتریایی را مهار کرده‌اند. نتایج آنالیز اسانس روغنی فلفل قرمز نشان داد که ترکیباتی چون تیمول و دی–لیمونن[۳۳]بعنوان مونوترپن‌های فنلی، لینالول بعنوان مونوترپن‌های الکلی و هگزیل ایزووالرات فراوان‌ترین ترکیب استری می-باشد. نتایج این مطالعه با مطالعه Yao و همکاران(۲۰۱۷) که در پژوهش خود فعالیت ضدمیکروبی و ویژگی‌های فیزیکی فیلم‌های خوراکی ژلاتین ماهی –کیتوزان حاوی د–لیمونن را بررسی کردند و فعالیت ضدباکتریایی موثری در برابر *اشرشیاکلی* از خود نشان دادند، همخوانی داشت. با توجه به مطالعه Thapamagar و Shrestha (۲۰۲۳) می‌توان ادعا کرد که آلکالوئیدهایی نظیر کپسایسین، فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها و استرول‌ها ترکیبات موجود در عصاره *کپسیکوم فورتیسنس* هستند؛ درنتیجه اثرات ضدمیکروبی نیز از فیلم های حاوی این ترکیب انتظار می-رفت. در مطالعه Koffi-Nevry و همکاران (۲۰۱۲) که با هدف بررسی خواص ضد باکتریایی متانولی و عصاره‌های آبی حاصل از فلفل قرمز *کپسیکوم آنوم* و *کپسیکوم فورتیسنس* انجام شد. به طور خاص، تاثیر این عصاره‌ها بر روی باکتری‌های منتخب (*استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، ویبریو کلرا، سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتریا*) مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد که هر دو عصاره در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* مؤثر بودند و از این نظر با مطالعه حاضر مطابقت داشت. همچنین در مطالعه‌ای که توسط مهدی‌زاده و همکاران(۲۰۱۲) بر روی ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی فیلم خوراکی کامپوزیت نشاسته–کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی انجام پذیرفت، دریافتند که مونوترپن‌های فنلی نظیر تیمول و کارواکرول بعنوان اجزاء اصلی اسانس، به دلیل ایجاد اختلال در عملکر دیواره و غشاء سلولی باکتری اثر مهاری بسیار خوبی در برابر *اشرشیاکلی* O157:H7 و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشتند. مطابق با مطالعه چانگ و همکاران(۲۰۲۱) در خصوص فیلم‌های پلی‌اتیلن ادغام شده با لینالول و تیمول، مشخص کردند که با افزایش غلظت این ترکیبات در فیلم فعالیت *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکوئا* و *ساکارومیسز سرویزیه* مهار می‌گردد. اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های فعال بر پایه پکتینات کلسیم حاوی اسانس لیمو توسط de Oliveira Filho و همکاران (۲۰۲۰)مورد بررسی قرار گرفت و گزارش کردند که کامپوزیت‌های حاصل، علیه هر دو دسته باکتری‌های گرم منفی و مثبت مؤثر بودند. در تحقیق حاضر باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری به فیلم‌های فعال مورد مطالعه نشان دادند. در حقیقت این نتایج در توافق با پژوهش انجام شده توسط Van LOI و همکاران(۲۰۲۳)، در خصوص ارزیابی توانایی ضد میکروبی فلفل قرمز بود و در این مطالعه دریافتند که باکتری‌های بیماریزای گرم مثبت حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی بوده و در این میان *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین حساسیت و قطر هاله عدم رشد در برابر اسانس فلفل قرمز نشان دادند. اسانس گیاه فلفل قرمز منبع غنی از مونوترپن‌ها با خصوصیات برجسته ضدمیکروبی است. طبق آنالیز اسانس مورد مطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فعالیت-های ضد باکتریایی فیلم‌های حاوی این اسانس ظاهراً مربوط به مقادیر بالای ترکیبات فنولیک مثل تیمول است که این نکته با مطالعات گذشته همخوانی دارد. اثبات شده است که این ترکیبات چربی دوست از طریق اثرگذاری بر غشا سلولی باکتری‌ها باعث بروز آسیب‌های اساسی سلولی شده و درنتیجه افزایش نفوذپذیری غشا و آزاد سازی محتویات غشا سلولی را در پی دارد.

در این مطالعه اثر ضدباکتریایی کمتر از انتظار فیلم‌های حاوی عصاره آبی در مقایسه با فیلم حاوی اسانس خالص

[33] D-limonene

فلفل قرمز را می‌توان به استخراج کمتر ترکیبات فنلی در عصاره آبی نسبت داد. اجزاء فعال در ترکیب شیمیایی عصاره فلفل قرمز نیز حضور داشتند، به همراه ترکیبات اسانس فلفل قرمز قدرت ضدباکتریایی فیلم‌ها را افزایش دادند.

نتایج مربوط به فیلم‌های حاوی اسانس خالص فلفل قرمز نشان داد که اسانس بخوبی در ساختار فیلم‌ها ادغام شده است و قادر بوده در زمان آزمون به محیط کشت آزاد شود و این موضوع با مطالعه Kristo و همکاران، در رابطه با غلظت ماده ضد میکروبی هنگامیکه به طور مستقیم به کار می‌رود در مقایسه با استفاده از آن همراه با فیلم خوراکی، همخوانی داشت. آن‌ها خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیلم کازئینات سدیم حاوی عوامل ضدمیکروبی و فعالیت بازدارندگی آن بر *لیستریا مونوسیتوژنز* را بررسی کردند و چنین بیان کردند که فیلم می‌تواند در نگه‌داشتن ماده ضدمیکروبی به مدت طولانی‌تر موثر باشد، به این صورت که افزودن مستقیم ماده ضدمیکروبی سبب کاهش کوتاه مدت جمعیت باکتری شده درحالی که فیلم‌های ضدمیکروبی از رشد باکتری‌ها طی نگهداری بعد از بسته‌بندی به مدت طولانی‌تر جلوگیری می‌کنند. همچنین در ادامه بیان کردند که ماده ضدمیکروبی به فیلم متصل شده و از خاصیت ضدمیکروبی آن کاسته می‌شود، بنابراین باید از درصد بیشتری از ماده ضدمیکروبی استفاده نمود (Kristo و همکاران، ۲۰۰۸).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از بین فیلم‌های طراحی‌شده فیلم‌های پکتینات کلسیم حاوی اسانس فلفل قرمز توان مناسبی برای محدود کردن رشد باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی از خود نشان دادند. بعلاوه، اثر سینرژیستی ضدمیکروبی بین اسانس و عصاره آبی فلفل قرمز علیه چهار باکتری مورد مطالعه ثبت شد، در نتیجه این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی مناسب در بسته‌بندی مواد غذایی مورد توجه قرار گیرد. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند دریچه جدیدی به‌سوی بکارگیری فیلم های خوراکی زیست تخریب پذیر به‌عنوان بسته‌بندی فعال در صنایع غذایی جهت ارتقاء کیفیت و امنیت زیستی مواد غذایی بگشاید.

منابع

Azeredo, h. M., morrugares-carmona, r., wellner, n., cross, k., bajka, b., & waldron, k. W. 2016. Development of pectin films with pomegranate juice and citric acid. Food chemistry. ***198***, 101-106.

Bohlmann, g. M. 2005. General characteristics, processability, industrial applications and market evolution of biodegradable polymers. Handbook of biodegradable polymers, **183**-218.

Rojas-graü, m. A., avena-bustillos, r. J., olsen, c., friedman, m., henika, p. R., martín-belloso, o., & mchugh, t. H. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. Journal of food engineering. ***81*(3)**, 634-641.

Ahmad, m., benjakul, s., prodpran, t., & agustini, t. W. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food hydrocolloids. ***28*(1)**, 189-199.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005.Modern food microbiology. 7th ed. New York, NY: Springer Science Business Media, Inc.

Zarringhalam, m., zaringhalam, j., shadnoush, m., safaeyan, f., & tekieh, e. 2013. Inhibitory effect of black and red pepper and thyme extracts and essential oils on enterohemorrhagic *Escherichia coli* and DNase activity of *staphylococcus aureus*. Iranian journal of pharmaceutical research. ***12*(3)**, 363.

Kanatt, s. R., chander, r., & sharma, a. 2008. Chitosan and mint mixture: a new preservative for meat and meat products. Food chemistry, ***107*(2)**, 845-852.

Salmieri, S., Islam, F., Khan, R. a., Hossain, F.M., Ibrahim, H.M.M., Miao, C., Hamad, W.Y. and Lacroix, M., 2014. Antimicrobial nanocomposite films made of poly (lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A—effect of nisin release on the inactivation of Listeria monocytogenes in ham. Cellulose. **21(3)**:1837–50.

Javidi, Z., Hosseini, S.F. and Rezaei, M., 2016. Development of flexible bactericidal films based on poly (lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. Food Science and Technology, **72**:251–60.

Nisar, t., wang, z. C., yang, x., tian, y., iqbal, m., & guo, y. 2018. Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. International journal of biological macromolecules, **106**, 670-680.

Sun, dawen., yuanyuan, pan., cheng, junhu., han, zhong. 2018. Meat food preservation device and meat food shelf life extension method. Meat science, **65** 2, 877-84

Özge Erdohan, Z., Çam, B. and Turhan, K.N., 2013. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. Journal of Food Engineering, **119 (2)**:308–15.

Jouki, M.**,** Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki A., 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties, Food Hydrocolloids. **36**, 9-19.

Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Kruenate, J., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2013. Anti-listeria activity of poly (lactic acid)/sawdust particle biocomposite film impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork. journal of International food microbiology, **167(2)**:229–35.

Solano, A.C.V. and de Gante, C.R. 2012. Two Different Processes to Obtain Antimicrobial Packaging Containing Natural Oils. Food and Bioprocess Technology, **5(6)**:2522–8.

Yao, Y., Ding, D., Shao, H., Peng, Q., & Huang, Y.2017. Antibacterial activity and physical properties of fish gelatin-chitosan edible films supplemented with D-Limonene. International Journal of Polymer Science, **1**-9.
Thapa Magar, S., **and Shrestha**, R. 2023. assessment of antioxidant and antibacterial activities of capsaicin extracted from chili samples of Nepal. International Journal of Advanced Research. **11**. 988-1003.
Koffi-Nevry, R., Kouassi, K. C., Nanga, Z. Y., Koussémon, M., & Loukou, G. Y. 2012. Antibacterial activity of two bell pepper extracts: Capsicum annuum L. and Capsicum frutescens. International journal of food properties. ***15*(5)**, 961-971.
Mehdizadeh t., tajik h., razavi rohani, sm., oromiehie, ar. 2012. Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing thymus kotschyanus essential oil. Veterinary Research Forum.**3(3)**:167-73.
Chang s, Mohammadi nafchi a, Baghaie h. 2021. Development of an active packaging based on polyethylene containing linalool or thymol for mozzarella cheese. Food Science & Nutrition. **19**;9(7):3732-3739.
de Oliveira Filho, J.G.; de Deus, I.P.B.; Valadares, A.C.F.; Fernandes, C.C.; Estevam, E.B.B.; Egea, M.B. 2020. Chitosan Film with *Citrus limonia* Essential Oil: Physical and Morphological Properties and Antibacterial Activity. Colloids Interfaces. **4**, 18.
Van Loi, N., Thi Binh, P., Thi Thanh, K., & Ngoc, N. T. T. 2023. Study to determine the chemical constituents, antibacterial ability, and antioxidant activity of the red pepper (Piper Nigrum l.) essential oil in Gia Lai Province, Vietnam. Food Science and Technology, **43**. 152-158.
Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. 2008. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on Listeria monocytogenes. Food hydrocolloids, ***22*(3)**, 373-386.