

Original Article

بررسی خاصیت ضد میکروبی فیلم تهیه شده از پولولان حاوی اسانس درمنه

فاطمه هدایتی راد^۱، انوشه شریفان^{۱*}، فرامرز خدائیان چگینی^۲، سید ابراهیم حسینی^۱

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۲۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: در دنیا حجم زیادی از مواد بسته بندی از ترکیبات غیر قابل بازیافت که برای سلامتی مصرف کنندگان نیز مضر است تولید می گردد. راهکار پیشنهادی، استفاده از فیلم‌ها و پوشش‌های تجزیه پذیر در طبیعت است. پولولان، بیوپلیمری است که توسط *Aureobasidium pullulans* تولید و در ساخت فیلم‌های خوراکی استفاده می گردد. فیلم‌های خوراکی می توانند حاوی آنتی اکسیدان و مواد ضد میکروبی باشند. هدف از این پژوهش، ابتدا بررسی امکان تولید فیلم ترکیبی خوراکی از پولولان و اسانس طبیعی گیاه درمنه (*Artemisia sieberi*) و سپس بررسی خواص ضد میکروبی فیلم حاصله است.

مواد و روش‌ها: اسانس درمنه در هفت غلظت به محلول فیلم پولولان افزوده شده و خاصیت ضد میکروبی از طریق روش Dick diffusion بررسی گردید. نهایتاً حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای هر یک از میکروب‌ها معلوم گردید. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SAS (V. 9.1) در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

نتایج: تولید فیلم پولولان حاوی اسانس درمنه امکان پذیر است. *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را در برابر خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه دارند. MIC اسانس درمنه بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* به ترتیب در غلظت‌های ۱۵، ۱۰ و ۱۵٪ بدست آمده است.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه امکان تولید فیلم‌های تجزیه پذیر در طبیعت که دارای اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی هستند وجود دارد، پس شایسته است که از این مواد به منظور کاهش بار میکروبی و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی استفاده گردد.

کلمات کلیدی: فیلم، پولولان، اسانس، *Artemisia sieberi*.

مقدمه

تولید جهانی مواد بسته بندی که اغلب از جنس پلی اتیلن یا سایر پلاستیک‌ها هستند، بیشتر از ۱۸۰ میلیون تن در سال گزارش می گردد. با توجه به اینکه این مواد بسته بندی قابل بازیافت نبوده و به صورت طبیعی تجزیه نمی شوند، در طبیعت باقی می ماندند و برای سلامتی مصرف کنندگان، مخاطرات فراوانی را ایجاد می کنند. هر ساله میزان زیادی از مواد غذایی مختلف به دلیل شرایط نامناسب نگهداری و رشد میکروارگانیسم‌ها دچار فساد می شوند و از بین می روند (۱). در سال‌های اخیر، رویکرد جدیدی به استفاده از مواد بسته بندی پلیمری بر پایه مواد طبیعی رواج یافته است که نه تنها برای مصرف کنندگان، بی ضرر است بلکه به دلیل بهبود شرایط، عمر نگهداری مواد غذایی را نیز بالا می برند. از ترکیبات مختلفی می توان برای تولید بیوپلیمرهای تجزیه پذیر، قابل خوردن از نظر سازمان غذا و دارو ایالات متحد آمریکا (FDA^۱) به صورت کلی به عنوان ایمن به رسمیت شناخته شده (GRAS^۲) باشند، استفاده کرد. در ضمن استفاده از منابع تجدیدناپذیر و میزان پس ماندها را نیز از طریق بازیافت

بیولوژیکی کاهش می دهند (۱، ۲). فیلم‌های خوراکی^۳ لایه نازک و یک پارچه‌ای هستند که ابتدا به شکل جامد تهیه می شوند و سپس مواد غذایی را درون آن می پیچند. فیلم‌های خوراکی به منظور ایجاد سد در برابر ورود و خروج رطوبت، گازها، بو، چربی، جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها، حفاظت مکانیکی و نیز حفظ ویژگی‌های کیفی ماده غذایی تهیه می گردند (۳، ۴). از مزایای بالقوه دیگر فیلم‌های خوراکی، بهبود کیفیت، افزایش عمر نگهداری، قابلیت تجزیه زیستی، سهولت دسترسی و هزینه کم مواد بسته بندی است (۵). بیوپلیمرهای زیست تجزیه پذیر در سه گروه، طبقه بندی می شوند که شامل: (۱) بیوپلیمرهای پلی ساکاریدی، (۲) بیوپلیمرهای پروتئینی، (۳) بیوپلیمرهای بر پایه چربی می باشند (۶، ۷). باکتری *Aureobasidium pullulans* قابلیت تولید نوعی هموپلی ساکارید با نام پولولان را به عنوان یک متابولیت ثانویه به صورت خارج سلولی دارد. ساختار پولولان از گلوکزهایی که با پیوندهای (۶→۱)α به صورت خطی به یکدیگر پیوسته اند، درست شده است. فیلم تولیدی از پولولان، شفاف و خصوصیات مکانیکی مطلوبی دارد و همچنین، نفوذپذیری آن به اکسیژن

1- Food and Drug Administration
2- Generally Recognized As Safe
3- Edible film

* نویسنده مسئول: انوشه شریفان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۶۱۷۸۳۸۸
Email: a_sharifan2000@yahoo.com

بود، اضافه گردید. ۱۰ میلی لیتر از محلول فیلم حاوی اسانس درمنه را در زیر هود لامینار در مرکز پلیت‌های پلاستیکی استریل به آرامی ریخته شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید و فیلم تشکیل شد. در نهایت فیلم‌های سالم، بدون حباب و فاقد ترک برای انجام آزمون‌ها انتخاب شدند.

آماده سازی سوسپانسیون میکروبی: سوش میکروب‌های *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189)، *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1058) و *Escherichia coli* (PTCC 1399) از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه گردید. ابتدا به کمک لوپ استریل، مقداری از هر باکتری را از داخل آمپول‌های استریل حاوی آن برداشته و به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت BHI Broth اضافه گردید. محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. پس از طی این مدت از لوله‌ها با استفاده از لوپ استریل روی محیط کشت Nutrient Agar کشت خطی داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری گردید. ۳ تا ۵ کلنی که به خوبی ایزوله شده‌اند و شکل یکسانی دارند، با استفاده از سواب استریل، به لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی انتقال داده شد. به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ nm کدورت سوسپانسیون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. وقتی کدورت در حد نیم مک فارلند، که معادل جمعیتی در حدود CFU/ml $10^8 \times 1/5$ از *Escherichia coli* ATCC 25922 رسید، بعد از حدود ۱۵ دقیقه سوسپانسیون، آماده تلقیح است. با استفاده از سواب استریل، از هر کدام از لوله‌های حاوی سوسپانسیون روی محیط‌های اختصاصی خود کشت داده شد، به طوری که تمام سطح پلیت با سوسپانسیون آغشته گردید. برای این کار هر بار ۶۰ درجه پلیت چرخانده شده و در آخر دور پلیت نیز تلقیح می‌گردید تا تراکم مطلوب به دست آید.

لازم به ذکر است که در این پژوهش برای *Lactobacillus plantarum* از محیط اختصاصی MRS agar، برای *Staphylococcus aureus* از محیط اختصاصی Baird Parker agar و برای *Escherichia coli* از محیط اختصاصی Maconky agar، که همگی محصول کارخانه Merck آلمان بودند، مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی فیلم پولولان حاوی اسانس درمنه: برای انجام آزمون‌های تشخیص فعالیت ضد میکروبی، فیلم‌ها به شکل دیسک‌های دایره‌ای به قطر ۶ میلی‌متر با استفاده از چاقوی دایره‌ای بریده شدند. با استفاده از روش Agar diffusion، فیلم‌های خوراکی بریده شده به قطر ۶ میلی‌متر را روی محیط‌های کشت تلقیح شده با سوسپانسیون در فاصله مناسب با هم جاگذاری شده و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، قطر هاله شفاف در اطراف فیلم بر اساس میلی‌متر گزارش شد (۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور مقایسه نتایج خواص ضد میکروبی فیلم‌های تولیدی استفاده شد. معنی‌دار بودن نتایج در سطح ۵٪ و با مقایسه میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SAS (V. 9.1) استفاده گردید.

بالا است (۸). بسته‌بندی‌های ضد میکروبی، نوع خاصی از بسته‌بندی‌های فعال هستند که می‌توانند عمر محصول را افزایش داده و ایمنی میکروبی بیشتری را برای مصرف‌کننده تأمین نمایند. این بسته‌بندی‌ها در جهت کاهش، مهار و یا به تأخیر انداختن رشد پاتوژن‌ها در غذاهای بسته‌بندی شده و یا مواد بسته‌بندی عمل می‌کنند. پوشش‌های خوراکی می‌توانند به عنوان حامل ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مختلفی همچون اسیدهای آلی، آنزیم‌ها (لیزوزیم)، ضدقارچ‌ها (بنومیل^۱) و ضد میکروب‌های طبیعی نظیر بسیاری از ادویه‌ها و اسانس‌های روغنی مورد استفاده قرار گیرند (۹). از خواص ضد میکروبی اسانس‌ها به عنوان ترکیبات ضد میکروبی استفاده می‌گردد. به این منظور اسانس‌ها را در ترکیب با مواد بسته‌بندی قرار داده و در نتیجه فیلم تولیدی موجب کاهش بار میکروبی مواد غذایی و افزایش زمان ماندگاری آن‌ها می‌شود (۱۰-۱۲). اثر ضد میکروبی شش نوع اسانس در فیلم آلژینات پوره سیب علیه *Escherichia coli* O157:H7 مورد ارزیابی قرار گرفت، که به ترتیب Ci، Oil Oregano، Carvacrol، Lemongrass oil، Cinnamaldehyde بیشترین اثر ضد میکروبی را علیه *Escherichia coli* O157:H7 از خود نشان دادند (۱۳). اسانس گیاه درمنه از خواص ضد میکروبی (*Artemisia sieberi*) برخوردار است. زیستگاه اصلی این گیاه بوته‌ای، قاره آسیا است (۱۴). این گیاه دارای ۱/۱۲٪ اسانس نسبت به وزن گیاه خشک می‌باشد که حاوی ترکیبات زیادی از جمله کامفر، لیمونن، ۱ و ۸ سیننول، کامفن و آلفاپینن می‌باشد (۱۴، ۱۵). اسانس درمنه پس از ورود به سیستم تنفسی توسط اکسیژن موجود به لاکتون‌ها تبدیل شده و از طریق مجاری تنفسی و ادرار دفع می‌گردد. این ترکیب، از رشد قارچ‌ها جلوگیری می‌کند و همچنین رشد باکتری‌های مسبب بوی نامطبوع عرق را مهار می‌کند (۱۶).

با توجه به اینکه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های پاتوژن رو به افزایش است، درمان بیماران مبتلا به این باکتری‌ها با مشکلاتی رو به رو شده است. در تحقیقات انجام شده اسانس گیاهان مختلف توانایی نابودی این باکتری‌ها را دارند و می‌توانند در درمان این بیماران موثر باشند (۱۷). هدف از این پژوهش، ابتدا بررسی امکان تولید فیلم خوراکی از پولولان حاوی اسانس گیاه درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) و سپس بررسی خواص ضد میکروبی فیلم حاصل علیه میکروب‌های *Staphylococcus aureus*، *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* است.

مواد و روش‌ها

این بررسی در طی شش ماه، از خرداد تا آذرماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. در ابتدا، ساخت فیلم‌های حاوی اسانس درمنه انجام گرفت و سپس خاصیت ضد میکروبی آن‌ها از طریق روش Dick diffusion مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت MIC^۲ برای هر یک از میکروب‌ها معلوم گردید.

تهیه فیلم از پولولان حاوی اسانس درمنه: پنج گرم پودر پولولان و ۱/۷۵ گرم گلیسرول (۳۵٪ وزن خشک پولولان) با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانیده شد و توسط همزن مغناطیسی حرارت داده شد و مخلوط گردید. اسانس طبیعی گیاه درمنه با نام علمی *Artemisia sieberi* به عنوان ترکیب ضد میکروبی طبیعی از شرکت باریج اسانس تهیه شد و در هفت غلظت ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ درصد ماده خشک (۷/۷)، به محلول فیلم پولولان که دمای آن به ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسیده

1- Binomial

2- Minimal Inhibitory Concentration

نتایج

فیلم‌های تولیدی یکنواخت، بدون حباب و ترک خوردگی بودند که کاملاً بوی اسانس درمنه از آن‌ها به مشام می‌رسید (شکل ۱).



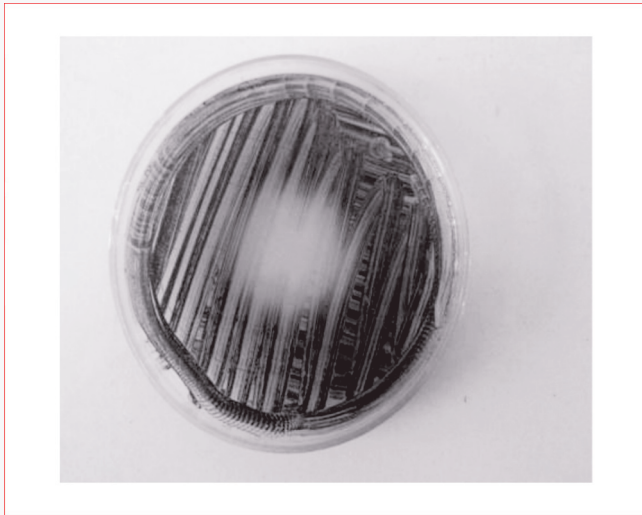
شکل ۱- فیلم‌های تولیدی حاوی اسانس درمنه

بیان اثر ضد میکروبی بر اساس محاسبه میانگین قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف فیلم‌های حاوی اسانس درمنه بر حسب میلی‌متر می‌باشد. جدول ۱ نتایج خواص ضد میکروبی فیلم پولولان تیمار شده با اسانس درمنه را علیه باکتری‌های *Lactobacillus plantarum*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تجزیه و تحلیل آماری انجام شده در زمینه بررسی خواص ضد میکروبی نمونه‌های فیلم پولولان تیمار شده با اسانس درمنه بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* نشان می‌دهند که بیشترین اثر بازدارندگی اسانس

درمنه با غلظت ۳۰ و ۳۵٪ علیه *Staphylococcus aureus* بوده است. در غلظت ۵٪ این اسانس، قابلیت نابودی هیچ‌کدام از میکروب‌ها را نداشته است. در غلظت ۱۰٪ نیز نتوانسته است از رشد *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* جلوگیری کند و فقط به میزان بسیار کمی اثر ضد میکروبی خود را بر روی *Staphylococcus aureus* بر جای گذاشته است. اسانس درمنه از غلظت ۱۵٪ به بالا خاصیت ضد میکروبی بر هر سه میکروب را دارد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس درمنه بر علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Lactobacillus plantarum* و *Escherichia coli* به ترتیب در غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۱۵٪ بوده است. در میان سه باکتری مورد بررسی، *Staphylococcus aureus* کمترین (شکل ۲)، و *Escherichia coli* بیشترین مقاومت (شکل ۳) را در برابر اثر ضد میکروبی اسانس درمنه از خود نشان دادند.



شکل ۲ میزان بازدارندگی فیلم‌های تولیدی حاوی اسانس درمنه در مقابل رشد *Staphylococcus aureus*

همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، باکتری گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) بسیار حساس‌تر از دو باکتری گرم منفی است.

جدول ۱- خواص ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس درمنه

<i>Escherichia coli</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	غلظت اسانس
.m	.m	.m	۵٪
.m	.m	۷/۵±۰/۳۲ ^{kl}	۱۰٪
۷/۴۳±۰/۶۱ ^l	۸/۵۲±۰/۶۴ ^{jk}	۹/۱±۰/۵۸ ^{ij}	۱۵٪
۹/۵۲±۰/۸۵ ^{hi}	۱۰/۴۵±۰/۷۳ ^{eh}	۱۳/۴۳±۰/۶۴ ^c	۲۰٪
۱۱/۶۲±۰/۴۲ ^f	۱۱/۰۳±۰/۴۲ ^{fg}	۱۵/۵۸±۱/۰۷ ^c	۲۵٪
۱۴/۷۲±۰/۸۲ ^d	۱۴/۲۸±۰/۷۱ ^d	۱۷/۲۲±۰/۴۷ ^e	۳۰٪
۱۴/۶۴±۰/۲۱ ^d	۱۶/۴۳±۹/۸۲ ^b	۱۸/۵۲±۰/۷۳ ^a	۳۵٪

ارقام میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است.

coccus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Esche-Aspergillus niger* و *Cryptococcus neoformans* نشان داد که کمترین *richia coli* و *Candida albicans* کوچکترین هاله عدم رشد و کمترین میزان حساسیت را به این اسانس‌ها دارند. در تمامی گونه‌های درمنه مورد بررسی، میزان بازدارندگی در مقابل رشد *Staphylococcus aureus* به مراتب بیشتر از *Escherichia coli* بوده است (۱۵).

با توجه به تمامی تحقیقات انجام گرفته در زمینه فیلم‌های بسته‌بندی حاوی اسانس‌های گیاهی، امکان تولید این فیلم‌ها و استفاده از این نگهدارنده‌های طبیعی به منظور کاهش بار میکروبی و به طبع آن افزایش عمر نگهداری مواد غذایی مختلف وجود دارد. اسانس درمنه نیز به دلیل وجود ترکیبات ضد میکروبی خود، قابلیت استفاده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی، ایمن و بی‌ضرر را برای مصرف کننده دارد.

این باکتری‌های پاتوژن دارای مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی هستند. اسانس گیاه درمنه می‌تواند به درمان عفونت‌های این سویه‌های مقاوم به دارو در بیمارستان‌ها کمک کند. در تحقیق حاضر، میزان توانایی اسانس گیاه درمنه در نابودی سه باکتری پاتوژن معلوم گردید. دادگر و همکاران در سال ۱۳۸۶ اثر ضدباکتریایی ۲۰ گونه از گیاهان دارویی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متی‌سیلین مورد بررسی دادند. از بین ۲۰ گیاه مورد بررسی عصاره اتانولی ۸ گیاه اوکالیپتوس، اسپند، درمنه، سیاه‌دانه، زرشک، گل راعی، انار و گز در روش دیسک دیفیوژن، بهترین اثر آنتی استافیلوکوکی را با توجه به قطر هاله عدم رشد نشان دادند. قطر هاله عدم رشد گیاهان مورد بررسی در اکثر موارد روی سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین بیش از سویه‌های حساس بود. گیاهان درمنه، زرشک، اوکالیپتوس، اسپند و گل راعی، سیاه دانه، انار و گز دارای بیشترین اثرات ضدباکتریایی سویه‌های (MSSA) *Methicillin Re-Susceptible Staphylococcus aureus* و *Methicillin Sistant Staphylococcus aureus* (MRSA) می‌باشند (۱۷).

در این بررسی معلوم گردید که امکان تولید فیلم پولولان حاوی اسانس درمنه وجود دارد. فیلم‌های تولیدی از نظر ظاهری هموزن و بدون ترک‌خوردگی بودند. با توجه به اندازه هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف فیلم‌ها، میزان خاصیت ضد میکروبی این اسانس بر روی *Lactobacillus plantarum*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichiacoli* معلوم گردید. *Escherichiacoli* بیشترین و *Staphylococcus aureus* کمترین مقاومت را در برابر اثر ضد میکروبی اسانس درمنه از خود نشان دادند. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس درمنه، علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Lactobacillus plantarum* و *Escherichiacoli* به ترتیب در غلظت‌های ۱۵، ۱۰ و ۱۵٪ بوده است.

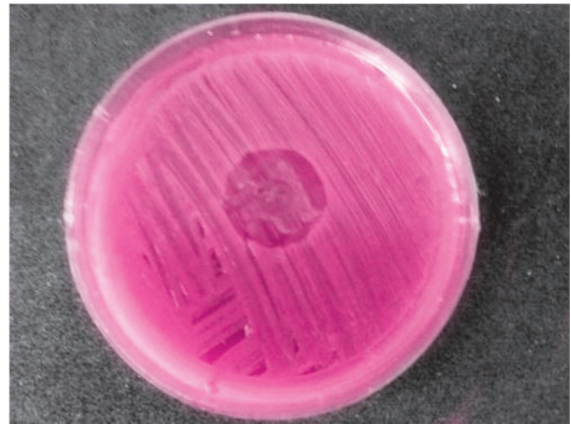
تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای دکتر محمدرضا شمس اردکانی معاون محترم غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی تهران، به دلیل کمک‌هایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Nettles C. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further

1- Biomembrane



شکل ۳ میزان بازدارندگی فیلم‌های تولیدی حاوی اسانس درمنه در مقابل رشد *Escherichia coli*

علت این مطلب را به ساختار دیواره سلولی این دو گروه باکتری نسبت می‌دهند. ماده موثر اصلی اسانس گیاه درمنه، منوترپن‌های غیرحلقوی اکسیژن‌دار می‌باشند، که حاوی ترکیباتی همچون کامفر، لیمونن، او ۱ سینئول، کامفن و آلفاپینن هستند (۱۵). ترکیبات منوترپنی، خاصیت چربی دوستی نسبی و حلالیت در آب را دارند و در نتیجه باعث ایجاد اغتشاش در بخش لیپیدی پلازما و غشاء زیستی^۱ میکروارگانیسم‌ها می‌شوند و این تغییرات منجر به نفوذپذیری غشاء و نشت ترکیبات داخل سلول و در نهایت مرگ سلول می‌گردند. علاوه بر دلیل ذکر شده، باید به ساختار چربی و شارژ سطحی شبکه غشای میکروارگانیسم‌ها نیز توجه نمود، زیرا ممکن است ترکیبات ضد میکروبی توانایی عبور از غشاء را به واسطه همخوانی ساختارشان با ساختار غشایی میکروارگانیسم‌ها داشته باشند (۱۸).

خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی اسانس *Artemisia asiatica* بر روی *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* و *Aspergillus fumigates* توسط Kalembe و همکاران در سال ۲۰۰۲ مورد آزمایش قرار گرفت که مشخص گردید با توجه به ترکیبات موجود همچون *selin-11-en-4-ol*، *1,8-cineole* و *monoterpene* و *alcohols* باعث کاهش قابل توجه میزان میکروارگانیسم‌ها شده است. خاصیت ضد میکروبی این اسانس بر روی باکتری‌های گرم مثبت، به مراتب بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بوده است (۱۹).

نتایج بررسی انجام شده در زمینه خاصیت ضد میکروبی هفت گونه از گیاه *Artemisia* شامل *Artemisia biennis*، *Artemisia absinthium* L.، *Artemisia dracunculus* L.، *Artemisia cana* Pursh، *Artemisia longifolia* Nuttall، *Artemisia frigida* Willd.، *Artemisia ludoviciana* Nutt و *Escherichia coli*، *Staphylo-*

- processed muscle foods. *Meat Sci.* 2006;74(1):131-42.
2. Krochta JM, Saltveit M, Cisneros-Zevallos L. Method of

- preserving natural color on fresh and minimally processed fruits and vegetables. Google Patents; 1996.
3. Cao N, Fu Y, He J. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids*. 2007;21(7):1153-62.
 4. Tong Q, Xiao Q, Lim LT. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. *Food Res Int*. 2008;41(10):1007-14.
 5. Krochta JM, De Mulder-Johnston C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol*. 1997;51(2): 61-74.
 6. Galus S, Mathieu H, Lenart A, Debeaufort F. Effect of modified starch or maltodextrines incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity and appearance of soy protein isolate-based edible films. *Inno Food Sci & Emerg Tec*. 2012;16:148-154.[In Press]
 7. Kristo E, Biliaderis C, Zampraka A. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chem*. 2007; 101(2):753-764.
 8. Leathers T. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl microbiol biotechnol*. 2003;62(5):468-73.
 9. Sothornvit R, Krochta JM. Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films. *J Food Eng*. 2001;50(3):149-55.
 10. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci*. 2006;73(2):236-44.
 11. Emiroğlu ZK, Yemiş GP, Coşkun BK, Candoğan K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci*. 2010;86(2):283-8.
 12. Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int J Infect Dis*. 2006;10(3):236-41.
 13. Del Nobile MA, Conte A, Incoronato AL, Panza O. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *J Food Eng*. 2008;89(1):57-63.
 14. Zargari A. Medicinal plants. 2nd ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Press; 1997. P.243-245.
 15. Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*. 2008;69(8):1732-8.
 16. Negahban M, Moharrampour S, Sefidkon F. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *J Stored Prod Res*. 2007;43(2):123-8.
 17. Dadgar T, Ghaemi E, Bazouri M, Asmar M, Mazandarani M, Sayfi A, et al. The Antibacterial effects of 20 herbal plant-sonmethicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* in golestan province. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2007;9(1):55-62.
 18. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob agents chemother*. 2005;49(6):2474-8.
 19. Kalembe D, Kusewicz D, Wia der K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. *Phytother Res*. 2002;16(3):288-91.



Original Article

Antimicrobial activity of Pullulan film incorporated with *Artemisia sieberi* essential oil

Hedayati rad F¹, Sharifan A^{1*}, Khodayian Chegini F², Hosini E⁴

1- Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Assistant Professor of the College of Food Science & Technology, Agriculture and Natural Resources of Tehran university, Tehran, Iran.

Received: 03 Apr 2013

Accepted: 18 Jun 2013

Abstract

Background & Objective: A large number of non-recyclable packaging materials, which are harmful for the health of consumers, are produced all over the world. The Suggested solution is using films and coatings which are biodegradable in nature. Pullulan is a biopolymer that is produced by *Aureobasidium pullulans* and used in order to produce edible films. These edible films could contain antioxidant and antimicrobial agents. The primary aim of this study is to produce edible blended films that form pullulan whit *Artemisia sieberi* essential oil and the secondary goal is to investigate the antimicrobial attributes of the obtained film.

Materials & Methods: The Essential oil of *Artemisia sieberi* was added to the solution of pullulan films in seven concentrations. Then, the antimicrobial attributes were determined with the dick diffusion method. Finally, minimal inhibitory concentration was calculated for each microbe. The SAS program (Version 9.1) was used for the completely randomized design of data analyses.

Results: It is possible to produce pullulan film containing *Artemisia sieberi* essential oil. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* had maximum and minimum resistance towards the antimicrobial attributes of *Artemisia sieberi* essential oil, respectively. MIC of *Artemisia sieberi* essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli* were respectively obtained at 15, 10 and 15%.

Conclusion: Due to the possibility of the production of biodegradable films with the addition of natural antimicrobial agents such as essential oils it can be concluded that it is appropriate to use these materials in order to decrease microbial load and increase the shelf life of foods.

Keywords: Film, Pullulan, Essential oil, *Artemisia sieberi*

* Corresponding author: Sharifan Anooshe, Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Tel: +98 912 617 8388

Email: a_sharifan2000@yahoo.com