

تأثیر دما و مدل غذایی بر رهائش لوریل آرژنین اتیل استر مونوهیدروکلراید و خواص ضدمیکروبی فیلم‌های بر پایه زئین

محبوبه کشیری^{*۱}

استادیار گروه تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: لوریل آرژنین اتیل استر مونوهیدروکلراید (LAE) به‌عنوان یک ترکیب فعال دارای خواص ضدمیکروبی است که برای نگهداری مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نگرانی‌های زیست محیطی، افزودن ترکیبات نگهدارنده به فیلم‌های طبیعی در مقایسه با سایر فیلم‌های پلاستیکی می‌باشد. هدف از این تحقیق تولید فیلم ضدمیکروبی حاوی لوریل آرژنین اتیل استر در بستر پلی‌مر زیستی زئین ارزیابی رهائش لوریل آرژنین اتیل استر در محیط‌های مشابه مواد غذایی و خواص ضدمیکروبی فیلم‌های تولید بود.

مواد و روش‌ها: فیلم زیست‌فعال زئین حاوی ۱۰ درصد لوریل آرژنین اتیل استر به روش کاستینگ تولید گردید. سینتیک و مقدار انتقال لوریل آرژنین اتیل استر از فیلم زیست‌فعال زئین حاوی ۱۰ درصد به دو مدل غذایی (اسید استیک ۳ درصد و اتانول ۱۰ درصد) با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در دمای ۴، ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید. تأثیر مدل‌های غذایی بر ساختار فیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شد. فعالیت ضدمیکروبی فیلم زئین حاوی ۱۰ درصد LAE علیه لیستریا اینوکوا و اشرشیا کلای در دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقدار رهائش لوریل آرژنین اتیل استر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محیط اسیدی در مقایسه با محیط اتانولی بیش‌تر بود. تصاویر میکروسکوپ روبشی تاییدکننده نقش مدل غذایی بر ساختار فیلم زئین بود که این تغییر ساختاری زئین بر سرعت رهائش ترکیبات فعال اسانس در مدل‌های غذایی موثر بود. افزایش دمای محیط

* نویسنده مسئول: kashiri.m@gmail.com

مدل غذایی به ۳۷ درجه سانتی‌گراد سبب تخریب ساختار فیلم زئین و کاهش زمان رهائش لوریل آرژنین اتیل استر گردید. اندیس کاهش لگاریتمی فیلم زیست‌فعال زئین حاوی ۱۰ درصد لوریل آرژنین اتیل استر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد علیه لیستریا اینوکوا و اشرشیا کلی به ترتیب ۳/۹۱ و ۴/۵۱ تعیین شد. بیش‌ترین خواص ضد میکروبی فیلم زئین در غلظت ۱۰ درصد لوریل آرژنین اتیل استر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد علیه لیستریا اینوکوا (۴/۹۹ کلنی در هر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: رهائش لوریل آرژنین اتیل استر از فیلم زئین وابسته به نوع مدل غذایی و دماست. مدل غذایی اسیدی با تغییر ساختار فیلم زئین سبب افزایش سرعت رهائش آرژنیناتیل استر در مقایسه با محیط اتانولی گردید. از آن‌جا که دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منجر به تخریب ساختار فیلم می‌گردد، از این‌رو دمای یخچال و اتاق محیط مناسب‌تری برای پایداری و رهائش فیلم زئین بود. فیلم‌های زئین حاوی لوریل آرژنیناتیل استر علیه لیستریا اینوکوا و اشرشیا کلای از خواص ضد میکروبی مطلوبی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: رهائش، خواص ضد میکروبی، زئین، لوریل آرژنیناتیل استر

مقدمه

ان لوریل ال-آرژنین اتیل استر مونوهیدروکلراید (LAE) با فرمول مولکولی $C_{20}H_{41}N_4O_3Cl$ ، یک نگهدارنده نسبتاً جدیدی در صنعت غذایی و مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) است (۸ و ۱۷). یکی از ویژگی‌های مهم LAE بروز خواص ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در دامنه وسیعی از pH می‌باشد. همچنین، این نگهدارنده قادر به حفظ خواص ضد میکروبی در شرایط اعمال فرایند گرمایشی است، از حیث کاربردی به‌ویژه در تولید فیلم ضد میکروبی می‌تواند قابل توجهه واقع گردد (۱). در اول سپتامبر ۲۰۰۵ سازمان غذا و داروی آمریکا این ترکیب را به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی امن و سالم جهت استفاده در گروه‌های مختلف مواد غذایی در سطح ۲۰۰ قسمت در میلیون به رسمیت شناخت.

بروز خواص ضد میکروبی LAE در پنیر نرم مکزیکی (۲۰)، شیر کم‌چرب و شیر کامل (۲۱) مورد تایید محققین قرار گرفته است. LAE به‌عنوان یک فعال سطحی کاتیونی می‌تواند سبب تخریب دیواره سلولی و به دنبال آن دیپلاریزه شدن غشاء سیتوپلاسمی و ایجاد اختلال در متابولیسم فرآیندهای سلولی و تغییر در چرخه طبیعی میکروارگانیسم گردد (۱، ۶ و ۱۷). بررسی‌های انجام شده در خصوص اثربخشی انتخابی LAE بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت نشان داده است که مکان اثرگذاری این ترکیب ضد میکروبی تحت تاثیر ساختار باکتری قرار دارد. بدین مفهوم که این ترکیب غشاء سیتوپلاسمی و دیواره خارجی در باکتری‌های گرم مثبت دیواره سلولی و غشاء سیتوپلاسمی در باکتری‌های گرم منفی را مورد هدف قرار می‌دهد.

بسته‌بندی ضد میکروبی نوعی بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد، به طوری که تداوم رهایش ترکیبات ضد میکروبی، اجازه رشد به سلول‌های ترمیم یافته میکروبی را نخواهد داد. بنابراین، از بسته‌بندی ضد میکروبی به‌عنوان تکنولوژی هردل جهت افزایش امنیت و بهبود کیفیت مواد غذایی یاد می‌شود (۱۱). اثر ضد میکروبی LAE پوشش‌دهی شده بر بستر پلی‌اتیلن ترفتالات و پلی‌پروپیلن در پنیر گوسفندی (۱۳) و همچنین در ترکیب با پلی‌مر اتیلن وینیل الکل جهت بسته‌بندی در غذای کودک به‌عنوان یک مدل غذایی (۱۲) مثبت ارزیابی شده است. زئین، پروتئین ذخیره‌ای ذرت (*Zea mays* L.) است که در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر مورد استقبال فراوان قرار گرفته است (۴ و ۱۵). موفقیت کاربرد زئین به‌عنوان پلی‌مری صنعتی به ویژگی‌هایی نظیر استحکام، شفافیت، آب‌گریزی، مقاومت در برابر روغن،

انعطاف‌پذیری و تراکم‌پذیری مطلوب نسبت داده شده است (۳). موضوع زیست پلی‌مرهای حامل دارو و چگونگی رهایش و مهاجرت ترکیبات فعال آن‌ها در اوایل سال‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ میلادی مطرح گردید. پدیده مهاجرت به معنای انتقال جرم ترکیبات با وزن مولکولی پایین از بستر پلی‌مری به درون محصول غذایی بسته‌بندی شده اطلاق می‌گردد. پدیده مهاجرت در نتیجه نفوذ، انحلال و رسیدن به حالت تعادل صورت می‌پذیرد (۲). بر همین اساس نفوذپذیری پلی‌مرها نسبت به محیط آبی اطراف از نکات مهم در پدیده مهاجرت محسوب می‌گردد. این پدیده به نوبه خود در چگونگی بروز خواص ضد میکروبی می‌تواند نقش ایفا نماید. حضور ترکیبات مختلف نظیر آب، کربوهیدرات، چربی، پروتئین، ویتامین، فیبر و مواد معدنی در یک ماده غذایی و برهم کنش‌های احتمالی، ارزیابی مهاجرت ترکیبات فعال در محیط‌های واقعی را با مشکلاتی مواجه ساخته است. از این رو، مطالعات مهاجرت در مدل‌های شبیه‌سازی شده از مواد غذایی نظیر آب، اسید و اتانول توصیه شده است (۹). رهایش ترکیبات فعال از بستر پلی‌مر پروتئین (۱۴)، کیتوزان (۱۶)، آب‌پنیر (۱۹)، زئین (۵) و پلی‌لاکتیک اسید (۹) حاکی از اهمیت نقش ماهیت پلی‌مر بر سینتیک رهایش ترکیبات ضد میکروبی می‌باشد. ترکیبات فعال و رهایش آن‌ها از بسترهای پلی‌مری در مدل‌های شبیه‌سازی شده یکسان نیست، ضمن آن که ماهیت محصولات غذایی، نوع پلی‌مر و دمای انبارداری نیز می‌توانند در عملکرد بسته‌بندی‌های ضد میکروبی نقش مؤثری ایفا کنند. هدف از این پژوهش ضمن تولید و ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین و پاسخ به نگرانی‌های مصرف‌کنندگان و طرفداران محیط زیست، مطالعه رهایش LAE از فیلم تولیدی در دو دما و دو مدل غذایی بود.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل زئین (نیپون، اوساکای ژاپن)، گلیسرول (اسکارلب، اسپانیا)، آر ان لوریل ال-آرژنین اتیل استر مونوهیدروکلراید (LAE) ()، اتانول (اسکارلب، اسپانیا)، اسید استیک (اسکارلب، اسپانیا)، تیو فلورو استیک اسید، استون نیتریل (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی براث (اسکارلب، اسپانیا)، تریپتون سوی براث (اسکارلب، اسپانیا) و آب دیونیزه بودند. سویه‌های باکتریایی در پژوهش حاضر شامل *لیستریا اینوکوا* (ATCC 19114) (CECT 934) از دسته باکتری‌های گرم مثبت و *اشرشیا کلامی* (ATCC 25922) (CECT 434) از دسته باکتری‌های گرم منفی، از مرکز کلکسیون میکروبی اسپانیا تهیه شدند. این پژوهش به روش زیر اجرا گردید:

آماده‌سازی فیلم: محلول ۱۶ درصد زئین در اتانول (۸۰ درصد) تهیه و به مدت یک ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه حرارت داده شد. سپس گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده (۰/۱۵ درصد وزن پلی‌مر) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاملاً همگن شد. محلول حاصل روی صفحه شیشه‌ای پوشیده از ورقه نازک پلی‌پروپیلن پخش و در تونل مجهز به منبع حرارتی به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شد.

فیلم زیست فعال زئین نیز مطابق روش فوق آماده شد، با این تفاوت که پس از افزودن گلیسرول LAE در سطح ۵ و ۱۰ درصد نسبت به وزن پلی‌مر اضافه به مدت ۱۵ دقیقه عمل هم‌زدن صورت گرفت. ارزیابی رهایش ترکیبات فعال از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین در مدل‌های غذایی: رهایش ترکیب فعال از فیلم زیست کامپوزیتی زئین حاوی ۱۰ درصد LAE مطابق قوانین اتحادیه اروپا در مدل غذایی اسیداستیک (۳ درصد حجمی-حجمی) و اتانول (۱۰ درصد حجمی-حجمی) ارزیابی شد. در این تحقیق، فیلم وزن شده در ابعاد ۳ سانتی‌متر مربع در دمای ۴، ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد در لوله‌های استاندارد در تماس با مدل غذایی قرار گرفتند. در ضمن طی آزمون، تیوپ‌ها با استفاده از شیکر (سرعت ۸۰ دور در دقیقه) به آرامی تکان داده شدند. هر یک از فیلم‌ها در فواصل زمانی مشخص غلظت اسانس رها شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تعیین گردید. در این بررسی ستون کروماتوگرافی مورد استفاده C₁₈ معکوس و در ابعاد ۳/۹ × ۱۵۰ (میلی‌متر) و قطر ذرات ۲۰ میکرون بود. فاز متحرک شامل استون‌نیتریل و آب در نسبت ۵۰: ۵۰ (حجمی-حجمی) و حاوی ۰/۱ تیو فلورو استیک اسید بود. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم نمونه تزریقی ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. زمان لازم برای خروج اسانس ۶ دقیقه تعیین گردید و شدت جذب در ۲۰۵ نانومتر خوانده شد می‌شود (۱۱). میانگین ضخامت فیلم‌ها در هر ارزیابی تعیین و هر آزمون در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی شکل‌شناسی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): به منظور ارزیابی تغییرات شکل‌شناسی فیلم زئین در مدل‌های غذایی، فیلم‌های زئین به مدت ۸ ساعت تحت تأثیر شرایط اسیدی (اسیداستیک ۳ درصد) و الکلی (اتانول ۱۰ درصد) قرار داده شدند. پس از اعمال تیمارهای فوق نمونه‌ها در دسیکاتور حاوی پنتا اکسید فسفر خشک و در ادامه با استفاده از ازت مایع برش داده شدند و بر سطح جسم مکعبی شکل مسی پوشانده شده با کربن فعال، به دقت چسبانده شدند و

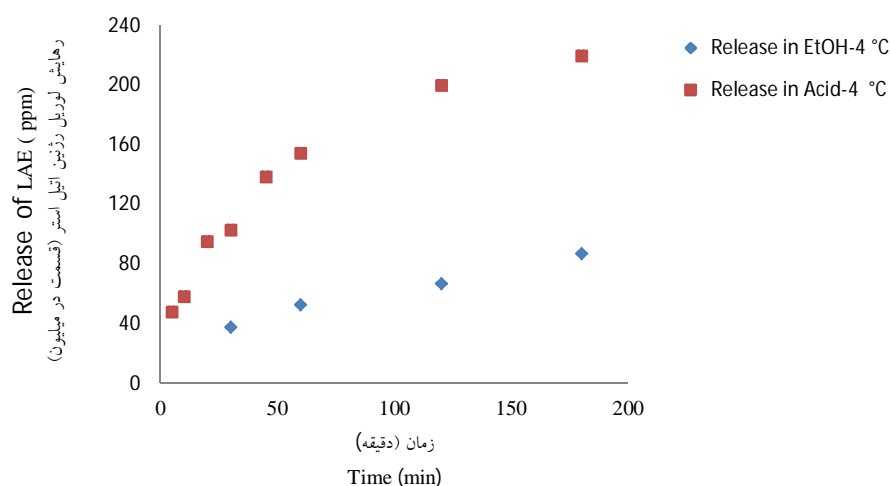
شکل‌شناسی سطح مقطع عرضی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی در مقایسه با نمونه شاهد ارزیابی شدند.

ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست فعال زئین: مقدار ۰/۲۵ گرم از فیلم زیست فعال زئین حاوی LAE در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول تریتون سوی برات قرار داده شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (جمعیت میکروبی تقریبی 10^6 CFU/ml) اضافه و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعداد میکروب‌ها شمارش شدند می‌شود (۱۱).

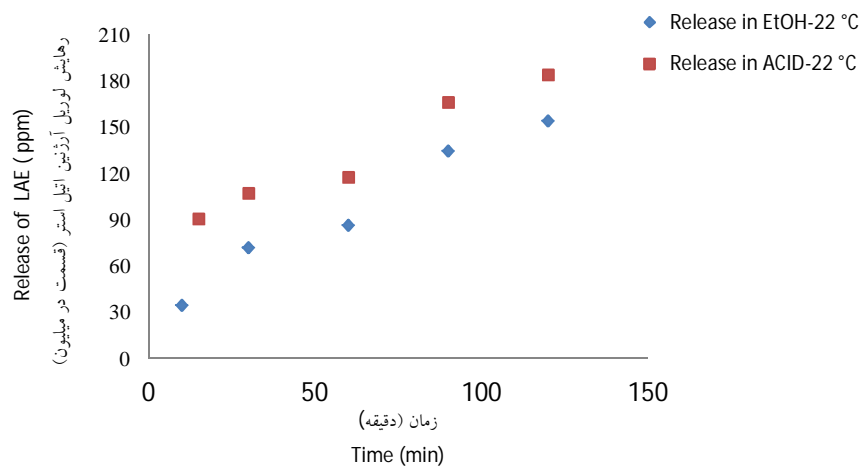
نتایج و بحث

رهایش ترکیبات اسانس از فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین در مدل‌های غذایی: نتایج حاصل از رهایش LAE از فیلم زیست فعال زئین حاوی ۱۰ درصد LAE در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول اسید استیک ۳ درصد در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین LAE قابل‌اندازه‌گیری در محیط اسیدی در ۵ دقیقه نخست آزمون برابر با $47/92 \pm 4/58$ قسمت در میلیون بود (۲۸/۱۸ درصد) بود. با افزایش زمان تماس، مقدار رهایش LAE از فیلم افزایش یافت به طوری که پس از سپری شدن ۱۸۰ دقیقه مقدار رهایش LAE به $219/70 \pm 2/31$ قسمت در میلیون (۹۴/۵۸ درصد) تعیین گردید. هم‌چنین، مقدار رهایش LAE از فیلم زیست فعال زئین در محلول اتانول ۱۰ درصد طی ۳۰ دقیقه نخست آزمون برابر با $52/42 \pm 3/12$ قسمت در میلیون برابر با $19/58$ درصد مقدار اولیه در فیلم زئین بود. مقایسه درصد رهایش این ترکیب فعال در محیط اسیدی ($219/70 \pm 3/12$ قسمت در میلیون) و اتانولی ($86/66 \pm 3/12$ قسمت در میلیون) در زمان ۱۸۰ دقیقه بیانگر تاثیر محیط اسیدی بر سرعت رهایش این ترکیب به محیط اطراف بود. مطالعه چگونگی خروج ترکیبات فعال از بستر پلی‌مر در ارزیابی عملکرد یک سیستم بسته‌بندی فعال می‌تواند نقش به‌سزایی ایفا نماید و تورم پلی‌مر شرط لازم برای رهایش ترکیبات مؤثر از سیستم بسته‌بندی فعال است. رهایش ترکیبات در بستر پلی‌مری براساس پدیده نفوذ آب از محلول آبی به درون بستر پلی‌مری، افزایش فاصله ماکرو مولکول‌های آن و خروج ماده فعال از بستر به درون محیط آبی اطراف تشریح می‌گردد. قدرت نفوذ محلول‌های آبی به درون زنجیره‌ها و تحت تأثیر قرار دادن بستر پلی‌مری، نشات گرفته از ماهیت پلی‌مر گزارش شده است (۱۰)، در این خصوص مقایسه نتایج سرعت رهایش LAE از بستر زئین در تحقیق حاضر نسبت به اتیلن وینیل الکل (۱۱) و کیتوزان (۷) حاکی از افزایش نسبی زمان لازم برای رهایش LAE از فیلم فعال زئین بود. این بدان

مفهوم است که فرایند جذب آب و تورم پلی مری آب‌گریزی نظیر ژئین در مقایسه با سایر پلی مرهای آبدوست کندتر بود. از آنجا که افزایش مقاومت فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر در محیط‌های آبی از حیث کاربردی، عاملی بسیار مثبت تلقی می‌گردد و در مقابل با افزایش آب‌گریزی پلی مرها در سیستم بسته‌بندی فعال ضد میکروبی می‌تواند قدرت جذب آب و رهایش ترکیبات افزودنی نظیر مواد ضد میکروبی به محیط اطراف را محدود و احتمال حبس ترکیبات فعال درون زنجیره پلی مری را نیز افزایش دهد، در نتیجه مطالعه چگونگی عملکرد پلی مرهای فعال در محیط‌های مختلف می‌تواند در رسیدن به اهداف بسته‌بندی که همانا افزایش زمان ماندگاری محصولات و افزایش سلامت مصرف‌کننده می‌باشد، کمک نماید. با مقایسه رهایش ترکیبات زیست پلی مری و بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌ها از حیث کاربردی، فیلم فعال ژئین با رهایش مطلوب در تماس مستقیم با مدل‌های غذایی، از دسته پلی مرهای نویدبخش در سیستم بسته‌بندی فعال محسوب می‌گردد.

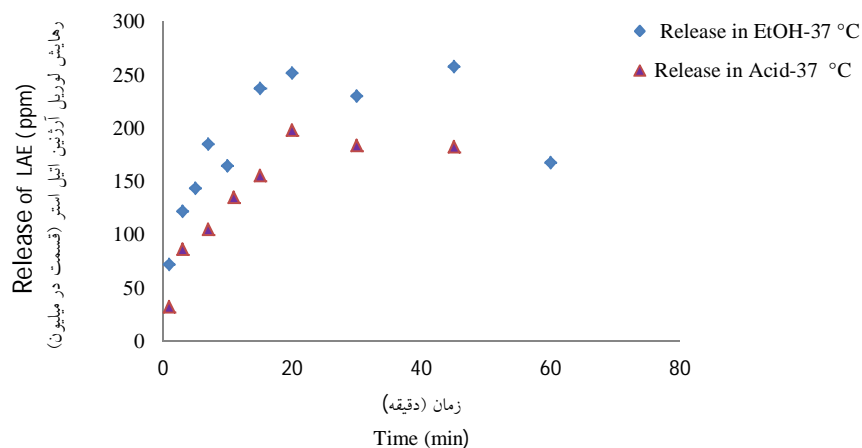


شکل ۱. رهایش LAE از کامپوزیت فعال ژئین در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول اتانول و اسید استیک
Figure 1. Release of LAE from active bio composite into acetic acid and ethanol solution at 4 °C



شکل ۲. رهایش LAE از کامپوزیت فعال زئین در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در محلول اتانول و اسید استیک
 Figure 2. Release of LAE from active bio composite into acetic acid and ethanol solution at 37 °C

مقدار رهایش LAE از فیلم زیست‌فعال زئین در مدل غذایی اسیدی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد بیش از محیط اتانولی بود به طوری که در ۳۰ دقیقه نخست مقدار رهایش ترکیب فعال از فیلم زئین در تماس با محیط اتانولی و محیط اسیدی به ترتیب برابر با $71/71 \pm 4/81$ و $107/24 \pm 8/49$ قسمت در میلیون بود (شکل ۲).

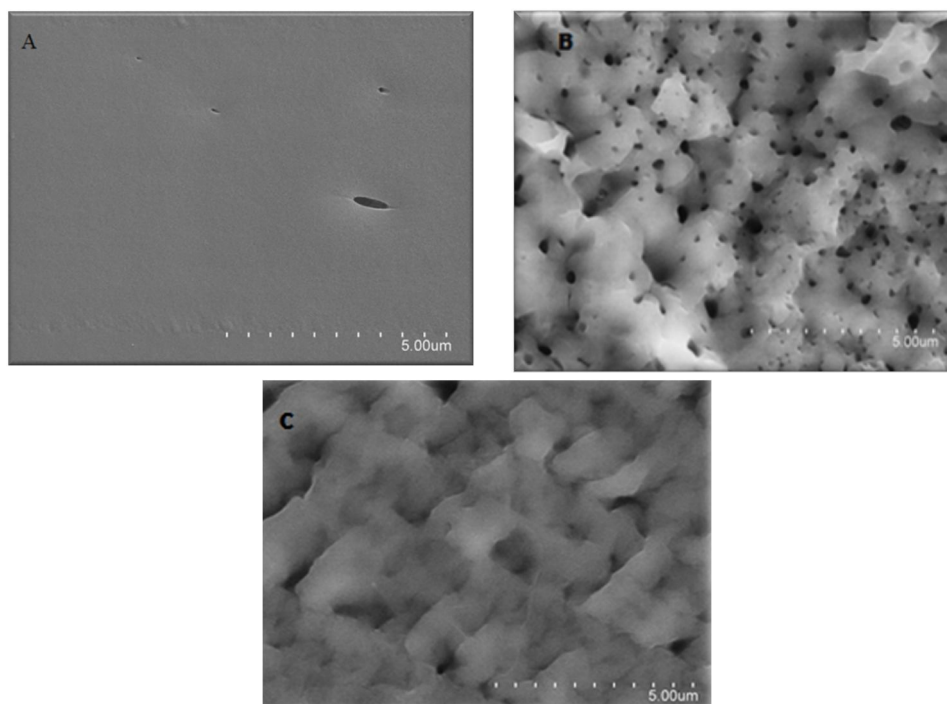


شکل ۳. رهایش LAE از کامپوزیت فعال زئین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول اتانول و اسید استیک
 Figure 3. Release of LAE from active bio composite into acetic acid and ethanol solution at 37°C

سینتیک مقدار رهایش LAE از فیلم زیست‌فعال زئین در مدل غذایی اسیدی و اتانولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شکل ۳ نشان داده شده است. مقدار رهایش LAE قابل‌اندازه‌گیری در محیط اتانولی و اسیدی در ۷ دقیقه نخست به‌ترتیب برابر با $162/99 \pm 29/39$ و $105/07 \pm 0/24$ قسمت در میلیون بود. حداکثر مقدار رهایش LAE تا رسیدن به نقطه تعادل نیز پس از ۶۰ دقیقه به‌ترتیب برابر $207/93 \pm 1/61$ (۹۴/۸ درصد) و $232/30 \pm 0/32$ قسمت در میلیون (۹۳/۳۹ درصد) تعیین شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که افزایش دما سبب افزایش سرعت رهایش LAE و کاهش زمان لازم برای رسیدن به تعادل ترمودینامیکی بود. ضمن آن‌که نقش دما بر رهایش ترکیب فعال در محیط‌های آبی به گونه‌ای بود که تاثیر ماهیت محلول آبی بر سرعت رهایش را تحت شعاع خود قرار داد. مقایسه زمان لازم برای LAE در مدل‌های غذایی در دمای ۴، ۲۲ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاکی از آن بود که کاهش دما سبب تداوم و طولانی‌تر رهایش LAE تا رسیدن به اوج نقطه رهایش گردیده است که این نکته از جنبه کاربردی بسیار مهم می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج موریل گلتو همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر تأثیر دما بر رهایش لوریل آرژنین اسید در بستر اتیلن وینیل الکل در مدل‌های غذایی مطابقت داشت (۱۲).

بررسی اثرات تیمارهای اسیدی و اتانولی بر روند رهایش نشان داد که سینتیک رهایش LAE از فیلم زیست‌فعال زئین در محلول اسید استیک ۳ درصد و محلول اتانول ۱۰ درصد وابسته به زمان بود. سرعت رهایش ترکیبات مؤثر در ابتدا زیاد و پس از سپری شدن زمان مشخص کاهش می‌باید. (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

بررسی شکل‌شناسی فیلم زیست کامپوزیت زئین: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، تأثیر مدل شبیه‌سازی بر تغییرات شکل‌شناسی پلی‌مری زئین را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳(A) مشاهده می‌شود، فیلم زیست کامپوزیت زئین (نمونه شاهد) دارای ساختاری یکنواختی است. مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی شکل ۳(A)، ۳(B) و ۳(C) حاکی از آن است که تیمار اسیدی با افزایش فاصله بین مولکول‌ها و قطر منافذ در بستر زئین سبب تغییرات شگرف در ساختار فیلم زیست کامپوزیت زئین گردیده است (شکل ۳). تأثیر محیط‌های اسیدی در مقایسه با محیط‌های اتانولی بر ساختار فیلم زئین بسیار گسترده‌تر بود که این تغییرات می‌تواند در چگونگی مکانیسم رهایش ترکیبات فعال در محیط‌های مختلف اثر معنی‌داری داشته باشد.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از برش عرضی فیلم زئین شاهد (A)، فیلم زئین تحت تیمار اسیدی (B) و فیلم زئین تحت تیمار اتانولی (C)

Figure 3. Images of SEM from cross section of control zein film (A), zein film under treatment of acidic (B) and zein film under treatment of ethanolic (C)

ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست کامپوزیت فعال زئین: خواص ضد میکروبی فیلم‌های زیست فعال زئین حاوی ۵ و ۱۰ درصد LAE در محیط تلقیح شده با اشرشیاکلاهی و لیستریا اینوکوا پس از ۵ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع ارزیابی شدند (جدول ۲). لگاریتم تعداد کلنی اشرشیاکلاهیو لیستریا اینوکوا قابل شمارش در هر میلی‌لیتر از محیط حاوی فیلم زیست فعال زئین با ۱۰ درصد LAE به ترتیب دارای ۴/۶۸ و ۳/۳۸ بود که با شمارش تعداد باکتری‌های تلقیح شده در نمونه شاهد، اندیس کاهش لگاریتمی اشرشیاکلاهی و لیستریا اینوکوا به ترتیب ۴/۵۱ و ۳/۹۱ محاسبه گردید (جدول ۲).

جدول ۲. ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم زیست کامپوزیتی ژئین حاوی ۵ و ۱۰ درصد LAE در برابر اشرشیاکلاهی و لیستریا اینوکوا در دمای ۳۷ و ۴ درجه سانتی گراد (بیان به صورت لگاریتم تعداد واحد کلنی ((Log(CFU)) و اندیس کاهش لگاریتمی (LRV)).

Table 2. Evaluation of antimicrobial properties zein films with 5%, and 10% LAE against *L. innocua*, and *E. coli*. LAE at 4 °C and 37 °C expressed as logarithm of colony forming units (Log(CFU)) and log reduction value (LRV)

اشرشیاکلاهی				لیستریا اینوکوا				فیلم فعال
۳۷ درجه سانتی گراد		۴ درجه سانتی گراد		۳۷ درجه سانتی گراد		۴ درجه سانتی گراد		ژئین
37 °C		4 °C		37 °C		4 °C		Active zein film
LRV	Log (CFU/mL)	LRV	Log (CFU/mL)	LRV	Log (CFU/mL)	LRV	Log (CFU/mL)	
	9.19±0.05		9.20±0.01		8.46±0.05		7.30±0.03	نمونه شاهد
								control
								فیلم ژئین
								حاوی ۱۰
								درصد
4.16	5.02±0.96	4.51	4.68±1.27	4.99	3.47±0.37	3.91	3.38±0.08	LAE
								zein
								films
								with 5%
								LAE

نتیجه گیری کلی

رهایش ترکیب فعال از فیلم ژئین تحت تاثیر نوع محیط غذایی و شرایط دمایی قرار دارد. محیط غذایی اسیدی در مقایسه با محیط اتانولی سبب تغییر ساختار فیلم ژئین و افزایش سرعت رهایش آرژنیناتیلستر می گردد. کاهش دمای محیط ضمن حفظ پایداری فیلم منجر به رهایش آرام ترکیب فعال فیلم ژئین می گردد. فیلم ژئین حاوی لوریل آرژنیناتیلستر با بروز خواص ضد میکروبی مناسب به عنوان روشی امیدبخش برای پاسخ به نگرانی های مصرف کنندگان و طرفداران محیط زیست پیشنهاد می گردد.

منابع

1. Becerril, R., Manso, S., Nerin, C. and Gómez-Lus, R. 2013. Antimicrobial activity of Lauroyl Arginate Ethyl (LAE), against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 32(2): 404-408.
2. Crank, J. 1975. *The mathematics of diffusion*. Oxford University Press, Oxford, UK
3. Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L. and Panza, O. 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering*, 89(1): 57-63.
4. Gennadios, A. and Weller, Curtis L. 1990. Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*.
5. Güçbilmez, Çiğdem Mecitoğlu, Yemenicioğlu, Ahmet, and Arslanoğlu, Alper. 2007. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food research international*, 40(1): 80-91.
6. Guo, Mingming, Jin, Tony, Z., Wang, Luxin, Scullen, O. Joseph, and Sommers, Christopher H. 2014. Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, 40(0): 64-70.
7. Higuera, Laura, López-Carballo, Gracia, Hernández-Muñoz, Pilar, Gavara, Rafael, and Rollini, Manuela. 2013. Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3): 339-345.
8. Kang, Jihun, Stasiewicz, Matthew J., Murray, Dillon, Boor, Kathryn J., Wiedmann, Martin, and Bergholz, Teresa M. 2014. Optimization of combinations of bactericidal and bacteriostatic treatments to control *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 179(0): 1-9.
9. Manzanarez-López, Francisca, Soto-Valdez, Herlinda, Auras, Rafael, and Peralta, Elizabeth. 2011. (Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 104(4): 508-517.
10. Mastromatteo, M, Barbuzzi, G, Conte, A. and Del Nobile, M.A. 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2): 222-227.
11. Muriel-Galet, Virginia, Cerisuelo, Josep P., López-Carballo, Gracia, Lara, Marta, Gavara, Rafael, and Hernández-Muñoz, Pilar. 2012. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 195-201.
12. Muriel-Galet, Virginia, López-Carballo, Gracia, Gavara, Rafael, and Hernández-Muñoz, Pilar. 2012. Antimicrobial food packaging film based on the

- release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 239-244.
13. Otero, Verónica, Becerril, Raquel, Santos, Jesús A., Rodríguez-Calleja, José M., Nerín, Cristina, and García-López, María-Luisa. 2014. Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*, 42(0): 296-302.
 14. Oussalah, Mounia, Caillet, Stephane, Salmiéri, Stéphane, Saucier, Linda, and Lacroix, Monique. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(18): 5598-5605.
 15. Ozcalik, Onur, and Tihminioglu, Funda. 2013. Barrier properties of corn zein nanocomposite coated polypropylene films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 114(4): 505-513.
 16. Pranoto, Y., Rakshit, S.K., and Salokhe, V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 38(8): 859-865.
 17. Rodriguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X. and Manresa, A. 2004. Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, N α -lauroyl ethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 2004(96): 903–912.
 18. Ruckman, Stephen, A., Rocabayera, Xavier, Borzelleca, Joseph, F. and Sandusky, Chad B. 2004. Toxicological and metabolic investigations of the safety of N- α -Lauroyl-L-arginine ethyl ester monohydrochloride (LAE). *Food and Chemical Toxicology*, 42(2), 245-259.
 19. Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food research international*, 39(5): 639-644.
 20. Soni, K.A., Desai, Monil, Oladunjoye, Ademola, Skrobot, Frederick, and Nannapaneni, Ramakrishna. 2012. Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1–2): 82-88.
 21. Soni, K.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., and Jackson, V. 2010. Bactericidal activity of lauric arginate in milk and Queso Fresco cheese against *Listeria monocytogenes* cold growth. *Journal of Dairy Science*, 93(10), 4518-4525.

Effect of food simulants and temperature condition on releasing of Lauroyl-L-arginine ethyl ester mono hydrochloride and antimicrobial properties of zein-based films

M. Kashiri^{1*}

¹ Assistant Prof., Dept. of Food Technology, Faculty of Food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 2014/04/12 ; Accepted: 2015/01/25

Abstract

Background and objectives: Lauroylarginine ethyl ester monohydrochloride (LAE) has been focused as a new active compound with antimicrobial property for food preservative. Because of environmental concerns, the incorporation of preservatives into biodegradable films is more suitable than their incorporation into plastic films. The aim of this work was to develop antimicrobial including LAE in biozein matrix and evaluation of releasing of lauroylarginine ethyl ester in the food models solutions and also antimicrobial properties produce films.

Materials and methods: Active zein films were made incorporating 10% LAE in the film forming solution by casting method. The kinetics of LAE mass transport from bioactive films zein containing 10% LAE into two food simulants (10% ethanol and 3% acetic acid) were evaluated by using high performance liquid chromatography at 4, 22, and 37 °C. Effect of food simulants on the structure of the zein film was evaluated by SEM. Antimicrobial effect of active zein films with 10% LAE was investigated against *E. coli* and *L. Inocua* at 4 and 37°C.

Results: The extent of LAE released from active zein at 4 and 22°C in acid simulant was more than in ethanol simulant. The SEM observations were confirmed the effecting of food simulants on structure of zein that related to releasing of the LAE into food simulants. Increasing the temperature of food simulants to 37 °C led to destroy the structure of the active zein film and decreased the needed time for releasing of LAE. The logarithm reduction value of active zein film containing 5% LAE at 4 °C against *E. coli* and *L. Inocua* was 3.91 and 4.51 respectively. The

*Corresponding author; kashiri.m@gmail.com

maximum antimicrobial effect of zein film was observed by 10% LAE at 37 °C against *L. Inocua* (4.99 CFU/ml).

Conclusion: Release of LAE as an active compound from zein film is strongly related to food simulant and temperature. Acid simulant was enhanced the rate release of LAE by change the structure of the film more than ethanol simulant. Since temperature of 37 °C led to destroy the structure the film, so refrigerator and room temperature were better condition for stability and release of zein film. The active zein films containing LAE had excellent antimicrobial properties against *E. coli* and *L. Inocua*

Keywords: Release, Antimicrobial properties, Zein, Lauroyl arginine ethyl ester

