بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشکده مهندسی کشاورزی**

**رشته علوم ومهندسی صنایع غذایی گرایش صنایع غذایی**

**پایان نامه کارشناسی ارشد**

# تاثیر نانوژل کیتوزان حاوی اسانس رزماری بر روی کیفیت گوشت گاو

نگارنده : مژگان هادیان

اساتید راهنما :

دکتر احمد رجایی

دکتر میثم طباطبائی

استاد مشاور:

دکتر افشین محسنی فر

آبان ۱۳۹۵

پیوست شماره ۲

## دانشگاه شاهرود

## دانشکده کشاورزی

## گروه : باغبانی و صنایع غذایی

**پایان نامه کارشناسی ارشد خانم** مژگان هادیان به شماره دانشجویی: ۹۳۱۸۲۰۴

**تحت عنوان: تاثیر نانوژل کیتوزان حاوی اسانس رزماری بر کیفیت گوشت گاو**

در تاریخ ۹۵/۸/۲ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد علوم ومهندسی صنایع غذایی/گرایش صنایع غذایی مورد ارزیابی و با درجه .....عالی..... مورد پذیرش قرار گرفت.

| اساتید راهنما | امضاء | اساتید مشاور | امضاء |
|---|---|---|---|
| نام و نام خانوادگی :<br>دکتر احمد رجایی | | نام و نام خانوادگی :<br>دکتر افشین محسنی فر | |
| نام ونام خانوادگی :<br>دکتر میثم طباطبائی | | | |

| اساتید داور | امضاء | نماینده تحصیلات تکمیلی | امضاء |
|---|---|---|---|
| نام و نام خانوادگی :<br>دکترکامبیز جهان بین | | نام و نام خانوادگی :<br>دکتر سید حسین حسینی | |
| نام و نام خانوادگی :<br>دکتر حمیدرضا صمدلوئی | | | |

تقدیم اثر

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به همه آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است

و مهمتر از همه،

به سبزترین نگاه زندگیم، مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت بیکرانش می دانم.

# تشکر و قدردانی

امروز که به همت پروردگار بی همتا و به مدد دعای پدر و مادر عزیز و خانواده مهربانم و لطف و راهنمایی اساتید گرانقدرم برگی دیگر از دفتر بزرگ علم و دانش را ورق زدم خاضعانه دست بوس تمام کسانی هستم که باعث دلگرمی من بودند.

تقدیر و تشکر خالصانه دارم:

* از استاد گرانقدر؛ جناب آقای دکتر احمد رجایی که با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند.

* از اساتید راهنما و مشاور جناب آقای دکتر هشم طباطبائی جناب آقای دکتر افشین محسنی فرکه بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید.

* از اساتید گرانمایه؛ جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین و جناب آقای دکتر حمید صمد لوئی که که راهنمایی های بی چشمداشت ایشان بسیاری از سختیها را برایم آسانتر نمود و زحمت داوری این رساله را متقبل شدند.

* از دوستان و عزیزانی (جناب آقای دکتر علی توانگر و جناب آقای مهندس حمید نیکوبین و سرکار خانم مهندس مرگان میرطالبی) که با کلکها و محبتهای بیدریغشان در انجام مراحل کار یاری رسان من بودند.

آرزو دارم همای سعادت پیوسته بر آسمان زندگیشان پرگشوده باشد. انشاا...

# تعهد نامه

اینجانب **مژگان هادیان** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد **رشته علوم وصنایع غذایی** دانشکده **مهندسی کشاورزی** دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **تاثیر نانوژل کیتوزان حاوی اسانس رزماری بر روی کیفیت گوشت گاو** تحت راهنمائی **دکتر احمد رجایی** متعهد می شوم.

- **تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.**
- **در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.**
- **مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.**
- **کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology» به چاپ خواهد رسید.**
- **حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.**
- **در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده ( یا بافتهای آنها ) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.**
- **در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .**

تاریخ

امضای دانشجو

**مالکیت نتایج و حق نشر**

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه

## چکیده :

در سالهای اخیر، کاربرد ترکیبات طبیعی به دلیل قابلیت خطرآفرینی بالای ترکیبات سنتزی و همچنین معایب فرآیند های حرارتی در نگهداری فرآورده های گوشتی مورد توجه قرارگرفته است. اسانس رزماری از جمله ترکیبات طبیعی است که خاصیت ضد میکروبی آن به اثبات رسیده است. در این مطالعه، درونپوشانی اسانس رزماری با استفاده از نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید به منظور بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و پایداری آن انجام شد. میانگین اندازه ذرات نانوژل تولیدی زیر ۱۰۰ نانومتر بود و همچنین ذرات دارای شکل کروی و توزیع اندازه یکنواخت بودند. نتایج فعالیت حذف رادیکال آزاد نشان داد که نانوژل باعث آزاد شدن آهسته ترکیبات آنتی اکسیدانی شده است. در ادامه فعالیت ضد باکتریایی پوشش اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده بر سطح گوشت گاو در مقابل باکتری *سالمونلا تایفی موریم* بررسی شد. نتایج نشان داد که اسانس رزماری درونپوشانی شده در مقایسه با اسانس رزماری آزاد در کاهش *سالمونلا تایفی موریم* سطح گوشت تحت شرایط نگهداری در یخچال موثرتر بوده است. اسانس درونپوشانی شده با غلظت ۲میلی گرم/گرم گوشت گاو موثرترین غلظت در کاهش بار پاتوژن نمونه ها بود. علاوه براین تیمارهای حاوی اسانس درونپوشانی شده، کمترین اثر را بر افزایش pH داشتند. اسانس درونپوشانی شده در غلظت ۰/۵ میلی گرم/گرم گوشت گاو کمترین اثر را بر رنگ گوشت در طی نگهداری داشت. نتایج به دست آمده نشان داد که به دلیل فراریت و ناپایداری اسانس ها تحت شرایط محیطی، درونپوشانی می تواند کارائی این ترکیبات را بهبود دهد. در نتیجه اسانس رزماری در شکل نانوژل می تواند به عنوان یک وسیله موثر در کاهش پاتوژنهای مواد غذایی همچون *سالمونلا تایفی موریم* و افزایش ماندگاری گوشت استفاده شود.



کلمات کلیدی : *سالمونلا تایفی موریم*، اسانس رزماری، نانوژل، درونپوشانی، گوشت گاو

**لیست مقالات مستخرج از پایان نامه**

- خواص ضدباکتری اسانس رزماری برجمعیت میکروبی گوشت گاو تلقیح شده با سالمونلا تایفی موریم طی دوره نگهداری در یخچال

## فهرست مطالب

---

## فصل اول : کلیات


۱-۱ فساد مواد غذایی ..... ۲

۱-۲ انواع فساد مواد غذایی ..... ۲

۱-۳ نگهداری مواد غذایی ..... ۲

۱-۳-۱ انواع نگهدارنده های مواد غذایی ..... ۳

۱-۴ گیاهان دارویی ..... ۴

۱-۴-۱ اهمیت گیاهان دارویی ..... ۵

۱-۴-۲ دلایل رویکرد به گیاهان دارویی ..... ۵

۱-۴-۳ کاربرد گیاهان دارویی ..... ۶

۱-۵ اسانس ها ..... ۷

۱-۵-۱ ترکیبات اسانس ها ..... ۸

۱-۵-۲ خواص کاربردی اسانس ها. ..... ۸

۱-۵-۳ روش های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت ضد باکتری اسانس ها ..... ۹

۱-۵-۴ خواص ضدباکتری اسانس ها . ..... ۹

۱-۵-۵ حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به اسانس ..... ۱۱

۱-۵-۶ سمیت اسانس ها ..... ۱۱

۱-۵-۷ محدودیت استفاده از اسانس ها و جنبه های قانونی استفاده از آن ..... ۱۲

۱-۵-۸ اثرات ارگانولپتیک ناشی از استفاده از اسانس ها واجزاء آنها در موادغذایی ..... ۱۲

۱-۵-۹ کاربرد اسانس ها در صنایع غذایی ..... ۱۳

۱-۶ گیاه رزماری ..... ۱۴

۱-۶-۱ اسانس رزماری ..... ۱۵

۱-۶-۲ اثرات آنتی اکسیدانی اسانس رزماری ..... ۱۵
۱-۶-۳ ترکیبات عمده موجود در اسانس رزماری ..... ۱۶
۱-۷ اهمیت گوشت ازدیدگاه تغذیه ..... ۱۷
۱-۷-۱ ترکیبات گوشت ..... ۱۷
۱-۷-۲ ماندگاری گوشت ..... ۱۷
۱-۷-۳ میکروبیولوژی گوشت. ..... ۱۸
۱-۸ میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی ..... ۱۸
۱-۸-۱ سالمونلا ..... ۱۹
۱-۹ نانوتکنولوژی ..... ۲۰
۱-۹-۱ نانوذرات ..... ۲۰
۱-۹-۲ نانو انکپسولاسیون ..... ۲۱
۱-۹-۱ مزایای انکپسولاسیون ..... ۲۲
۱-۹-۴ نانوحامل ها ..... ۲۲
۱-۹-۴-۱ نانوحامل های پلیمری ..... ۲۴
۱-۹-۵ نانوژل ..... ۲۴
۱-۹-۵-۱ کیتوزان ..... ۲۵
۱-۹-۵-۲ اثرات ضدباکتری کیتوزان ..... ۲۶
۱-۹-۵-۳ تولید خودبخودی کیتوزان ..... ۲۷
۱-۹-۶ اسید بنزوئیک ..... ۲۸

## فصل دوم : مروری بر پژوهشهای پیشین

.....۳۲

## فصل سوم : مواد و روش ها

۳-۱ مواد مورد استفاده در این تحقیق .....۴۳
۳-۲ تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق .....۴۴
۳-۳ تهیه نانوژل کیتوزان با اسید بنزوئیک .....۴۵
۳-۴ درونپوشانی اسانس رزماری درنانوژل کیتوزان – اسید بنزوئیک.....۴۶
۳-۵ طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه FT-IR .....۴۷
۳-۶ مورفولوژی و سایز نانوژل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM).....۴۷
۳-۷ بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری ، نانوژل و نانوژل حاوی اسانس .....۴۷
۳-۸ تهیه استاندارد نیم مک فارلند .....۴۸
۳-۹ آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی .....۴۸
۳-۱۰ تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC)و حداقل غلظت کشندگی(MBC).....۴۸
۳-۱۱ تهیه نمونه های گوشت گاو جهت نگهداری در دمای یخچال .....۴۹
۳-۱۲ آزمون اندازه گیری بار میکروبی نمونه های گوشت .....۵۰
۳-۱۳ آزمون pH نمونه های گوشت .....۵۰
۳-۱۴ بررسی میزان رنگ نمونه ها در روزهای مختلف .....۵۰
۳-۱۵ آنالیز آماری .....۵۰

## فصل چهارم : نتایج و بحث

۴-۱ ویژگیهای نانوژل کیتوزان- اسید بنزوئیک تولید شده .....۵۲
۴-۲ بررسی کارایی درونپوشانی اسانس رزماری توسط نانوژل کیتوزان –اسید بنزوئیک.....۵۵
۴-۳ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد اسانس رزماری ، نانوژل کیتوزان –اسید بنزوئیک و اسانس درونپوشانی شده .....۵۶

۴-۴ آزمون برون تنی : میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)و حداقل غلظت کشندگی (MBC)اسانس رزماری ، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده ..... ۵۹

۴-۵ آزمون درون تنی : اثر ضد میکروبی اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل ، علیه سالمونلا تایفی موریم در گوشت گاو در طول نگهداری .....۶۱

۴-۶ تغییرات رنگ نمونه های گوشت گاو ..... ۶۵

۴-۷ تغییرات pH نمونه های گوشت در طول نگهداری .....۶۸

۴-۸ نتیجه گیری. .....۷۰

۴-۹ پیشنهادات . ..... ۷۱

منابع . ..... ۷۳

# فهرست جدول ها

**جدول ۱-۱ عمده ترین ترکیبات اسانس رزماری ..... ۱۶**

**جدول۳-۱مشخصات اسانس رزماری استفاده.شده در این تحقیق ..... ۴۴**

**جدول ۴-۱ میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس رزماری ، نانوژل و اسانس درونپوشانی شده در مقابل باکتری *سالمونلا تایفی موریم* ..... ۵۹**

**جدول ۴-۲ شاخص رنگ نمونه های پوشش داده شده با اسانس رزماری آزاد و دروپوشانی شده درنانوژل در درجه حرارت °C ۴ طی روزهای مختلف نگهداری ..... ۶۶**

# فهرست معادلات

معادله۳-۱محاسبه درصدفعالیت آنتی اکسیدانی ..... ۴۸

# فهرست شکل ها


شکل ۱-۱ تصویر سرشاخه های گلدار گیاه رزماری ..... ۱۵

شکل ۱-۲ تصویر شماتیک از ساختار (a) نانوکپسول و(b) نانواسفر .....۲۱

شکل ۱-۳ تشریح شماتیک نانوسیستم برای اسانسهای روغنی .....۲۳

شکل ۱-۴ ساختار مولکولی کیتوزان .....۲۸

شکل ۱-۵ نمایی ازتولید خودبخودی در کیتوزان .....۲۸

شکل ۱-۶ ساختار مولکولی اسید بنزوئیک.....۲۹

شکل ۳-۱ شماتیک واکنش بین بنزوئیک اسید وکیتوزان با حضورEDC .....۴۶

شکل ۳-۲ شماتیک اسانس درونپوشانی شده و موضع گیری زنجیره های کیتوزان .....۴۶

شکل ۳-۳ نمونه های گوشت برش خورده زیر هودمیکروبی .....۴۹

شکل ۴-۱ طیف FT-IT (الف )کیتوزان و(ب )نانوژل کیتوزان –اسید بنزوئیک.....۵۳-۵۲

شکل ۴-۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوژل کیتوزان – بنزوئیک اسید.....۵۴

شکل ۴-۳ میزان جذب نمونه های اسانس رزماری ، نانوژل و اسانس روزماری درونپوشانی شده در زمانهای مختلف نگهداری .....۵۶

شکل ۴-۴ فعالیت حذف رادیکال آزاد نمونه های اسانس روزماری ، نانوژل و اسانس روزماری درونپوشانی شده در زمانهای مختلف نگهداری .....۵۷

شکل ۴-۵ جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* درنمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری درحالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید در روز اول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد..... .....۶۱

شکل ۴-۶ جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* درنمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری درحالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید در روز چهارم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد..... .....۶۲

شکل ۴-۷ جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* درنمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری درحالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید در روز هشتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد..... .....۶۳

**شکل ۴-۸ جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* درنمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری درحالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید در روز دوازدهم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد .....۶۴**

**شکل ۴-۹ میزان تغییرات pH گوشت های تیمار شده با اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده در روزهای مختلف نگهداری دردمای۴درجه سانتی گراد.....۶۸**

## مقدمه

در سالهای اخیر حفظ سلامت و افزایش عمر نگهداری مواد غذایی جایگاه ویژه‌ای در صنایع غذایی به خود اختصاص داده است. گزارشها نشان می‌دهند که مسمومیت های غذایی بسرعت رو به افزایش است (Alzoreky and Nakahara.,2003). درکشورهای صنعتی سالانه حدود ۳۰٪ از مردم از مسمومیت های غذایی رنج می برند . طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)[1] در سال ۲۰۰۰ حدود ۲ میلیون نفر در سرتاسر دنیا در اثر بیماریهای گوارشی ناشی از مسمومیتهای شدید غذایی جان خود را از دست داده اند (WHO.,2002).

گوشت به عنوان منبعی سرشار از پروتئین و مواد مغذی ضروری تلقی می شود . امروزه گوشت یکی از کالاهای استراتژیک محسوب شده و درسبد خانوار جایگاه ویژه‌ای دارد، ولی این دسته ازمواد غذایی می‌توانند حاملی برای انتقال بیماریهای مختلف به انسان باشند. گوشت می‌تواند عامل انتقال انواع آلودگی های عفونی مانند *باسیلوس آنتراسیس* ، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلاها تایفی موریم* و ... باشد (قرشی ابهری وصدرالاشرافی. ،۱۳۸۴ ).

*سالمونلا تایفی موریم* یکی از پاتوژن‌های غذایی شایع در جهان بوده که مسئول ایجاد سم در مواد غذایی است و در محیط های مناسب تشکیل میکروکلونی درسطح داده ، که موضوع مهمی برای صنعت فرآوری غذا شامل : گوشت ، لبنیات ، ماهی و ... می باشد ( مظفریان ،.۱۳۷۵).

با توجه به این مطالب، لزوم تامین امنیت غذایی افراد و تولید مواد غذایی سالم و ایمن یکی از اهداف مهم تولید کنندگان مواد غذایی به شمار می رود. یکی از رو شهای معمول حفظ سلامت مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده هاست، و از آنجا که مصرف نگهدارنده های شیمیایی در مواد غذایی می‌تواند خطراتی را برای سلامتی انسان به همراه دا شته با شد، امروزه ا ستفاده از نگهدارنده های طبیعی مورد توجه محققین قرارگرفته است (Tassou et al ., 1995).

[1] - World Health Organization

از جمله ترکیبات طبیعی که بعنوان نگهدارنده درمواد غذایی بکار می‌روند، میتوان به اسانس‌های گیاهی اشاره کرد. اسانس‌ها میتوانند اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد اکسایشی و ضد سرطانی داشته باشند. در مورد آثار بیولوژیک اسانس‌ها مطالعات زیادی انجام گرفته است (Burt.,2004).

در بین گیاهان دارویی شناخته شده، اسانس‌هایی که ترکیبات فنلی بیشتری دارند، خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی ازخود نشان می‌دهند. تحقیقات نشان داده که اسانس رزماری دارای خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، بهبود ادراک و کاهش سطح گلوکز خون می‌باشد وهمچنین در کاهش سطح لیپید خون نیز مؤثر است (Dorman and Dean.,2000).

یکی از زمینه های کاربرد نانو در صنایع غذایی درونپوشانی کردن ترکیبات حساس به شرایط محیطی و یا ترکیبات فرار از جمله اسانس‌های گیاهی می باشد. روشهای مختلفی به منظور درونپوشانی کردن وجود دارد که یکی از روشهای جدید استفاده از نانوژل کیتوزان می باشد. درونپوشانی ترکیبات ضد میکروبی از جمله اسانس های گیاهی می تواند باعث آزاد شدن تدریجی و همچنین افزایش خاصیت ضدمیکروبی این ترکیبات شود (Rodríguez et al.,2011 ).

با توجه به مطالب فوق، در این تحقیق هدف درونپوشانی اسانس رزماری در نانوژل بر پایه کیتوزان و اسپری کردن آن بر سطح گوشت گوساله آلوده شده به باکتری *سالمونلا تایفی موریم* بمنظور افزایش عمر نگهداری و حفظ کیفیت وتازگی محصول می باشد.

فصل اول

# کلیات

## ۱-۱ فساد مواد غذایی

فساد در رابطه با کیفیت ماده غذایی بوده و دارای درجات مختلفی است . هر ماده غذایی حساس به فساد قبل ازآنکه به مرحله غیر قابل مصرف برسد، از درجات مختلفی از کیفیت عبور می‌کند. فساد می‌تواند بعنوان هر تغییری در طعم تلقی شده، که باعث عدم پذیرش آن توسط مشتری می‌شود. در اکثر حالات، فساد مواد غذایی یک سری تغییرات پیچیده شیمیایی است که ممکن است توسط عوامل خارجی (میکروارگانیسم ها) و یا داخلی ( فیزیولوژیکی یا شیمیایی) رخ دهد. باکتریها ، قارچها ، مخمرها و حشرات علت اصلی فساد مواد غذایی هستند ( Sperber and Doyle.,2009).

## ۱-۲ انواع فساد مواد غذایی

با توجه به گروههای مختلف مواد غذایی و تنوع ترکیبات شیمیایی آنها فساد ممکن است به یکی از صورتهای زیر بروز نماید :

۱- فساد میکروبی

۲- فساد شیمیایی

۳- فساد فیزیکی

محدوده وسیعی از متابولیتها در طول فساد میکروبی ایجاد می‌شود که شامل : الکل ها، ترکیبات سولفور، هیدروکربن ها، رنگدانه های درخشان، اسیدهای ارگانیک، استر، کربونیل و دی آمین ها می‌باشند. فساد شیمیایی بعلت آنزیم های طبیعی موجود در غذا، اتواکسیداسیون، واکنش میلارد و کاراملیزاسیون رخ می‌دهد . فساد فیزیکی بعلت تغییر در ظاهر ماده غذایی که منجر به کاهش کیفیت محصول می‌شود بروز می‌کند (Abdel-Aziz et al., 2016) .

## ۱-۳ نگهداری مواد غذایی

هدف نگهداری مواد غذایی، جلوگیری از تغییرات نامطلوب در غذا، در فاصله زمانی بین تولید تا مصرف می‌باشد. چنین تغییراتی می‌تواند بعلت حمله میکروارگانیسم ها و یا واکنش های شیمیایی باشد.

استفاده از مواد شیمیایی به منظور جلوگیری یا به تاخیر انداختن فساد مواد غذایی تا اندازه‌ای به علت موفقیت قابل ملاحظه کاربرد این ترکیبات در معالجه بیماریهای انسان بوده، لذا نمی توان کلیه ترکیبات مورد استفاده در درمان شیمیایی امراض را به منظور محافظت مواد غذایی بکار برد (یعقوب زاده و صفری ،.۱۳۹۰).

از طرف دیگر بعضی از مواد شیمیایی موثر در نگهداری مواد غذایی از نظر درمانی بی اثر و یا حتی سمی می‌باشند. با اینکه بسیاری از مواد شیمیایی در افزایش زمان نگهداری مواد غذایی موثرند، اما فقط تعداد محدودی برای مصرف در فرآورده های غذایی مجاز شناخته شده اند (Rana et al.,1997 ; Nascimento.,2000) .

### ۱-۳-۱ انواع نگهدارنده های مواد غذایی

مواد نگهدارنده، مواد شیمیایی طبیعی یا مصنوعی هستند که آنها را به مواد غذایی اضافه می‌کنند ، تا این مواد را از فساد ناشی از رشد میکروبها و یا فساد ناشی ازتغییرات شیمیایی محافظت نمایند. استفاده از نگهدارنده های مواد غذایی برای افزایش طول ماندگاری آن:

- به ویژگیها و نوع غذا (pH، فعالیت آبی، محتوی مواد مغذی آن و مواد ضد میکروبی)
- فلور میکروبی اولیه
- شرایط نگهداری وفرآوری (گرما، اسیدی کردن، کاهش فعالیت آبی، بسته بندی دراتمسفر و سرد کردن)

وابسته است. امروزه از مواد نگهدارنده شیمیایی و در برخی از موارد از نگهدارنده های بیولوژیک استفاده می‌گردد. برخی از نگهدارنده های شیمیایی نظیر نیتریت ها دارای عوارض جانبی بوده و مصرف بیش از اندازه آنها باعث بروز سرطان می‌گردد. بنابراین توجه به نگهدارنده های بیولوژیک به لحاظ اثر مهارکننده آنها برانواع میکروبهای عامل فساد و

بیمـاری، عـدم عـوارض جـانبی و همچنـین بهبـود بـو و طعـم مـواد غـذایی، بیشـتر مـورد نظـر قرارگرفته است .

نگهدارنده ها را میتوان به انواع فرار، پایدار، وناپایدار تقسیم کرد :

- فرار نظیر اکسید اتیلن و پروپیلن
- ناپایدار مانند دی اتیل پیروکربنات و هگزامین
- پایدار شامل اسید بنزوئیک، سوربیک و نمکهای آنها

نگهدارنده ها می‌توانند بصورت تنها ویا باهم در غذا بکار برده شوند. برای مثال سیترول یک نگهدارنده ضد میکروبی است، که عمل سینرژیستی دو ترکیب آن باعث مهار کپک ها می شود. سیترول محلول الکلی اسید سیتریک و اسید سوربیک می‌باشد، که در محصولات نانوایی کاربرد دارد. هر روز اثرات زیان آور نگهدارنده های شـیمیایی از جمله عوارض سـرطانزایی و خواص تراتوژنیک [1]و نیز باقیمانده-های سمی بر سلامت انسان به اثبات می‌رسد و تقاضا برای مصرف مواد غذایی که عمر ماندگاری آن ها به صورت طبیعی افزایش یافته، بیشتر می‌شود ( شفافی زنوزیان ،.۱۳۹۳).

در نتیجه می‌توان گفت نگهدارنده های طبیعی (مخصـوصـا عصـاره ها و اسـانس‌های گیاهی) به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی مناسب می توانند به طور کامل جایگزین سطح مورد نیاز نگهدارنده های شـیمیایی شـده و به مراتب اثرات مخرب آنها را به حداقل ممکن برسـانند (Smith- Palmer et al., 2001).

### ۱-۴-گیاهان دارویی

در گیاهان ترکیبات شیمیایی زیادی مانند متابولیتهای ثانویه وجود دارد،که دارای خواص زیست فعالی و بیوشیمیایی بسیاری هستند. این ترکیبات ثانویه در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، آرایشی و

[1]- ناهنجاری مادرزائی

بخصوص صنعت غذا کاربرد دارند (قاسمی پیربلوطی ۱۳۸۸ ; Gourine et Philipson et al ., 1990 ; al.,2010

وجود ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در عصاره و اسانس گیاهان دارویی، در سال های اخیر توجه ویژه‌ای را درتحقیقات بخود جلب کرده است (Madsen and Bertselen.,1995;Sagdic., 2003) . از سوی دیگر نگهداری غذا بصورت سالم و با کیفیت بالا در طول مراحل تولید، انبارداری و مصرف از جمله دغدغه های اصلی متخصصان صنایع غذایی و تغذیه میباشد. بنابراین می‌توان با پیوند دادن گیاهان دارویی و خواص سلامتی بخش آنها با صنعت غذا، نه تنها سلامت مصرف کننده را تضمین کرد، بلکه با وجود ترکیبات معطر در ترکیبات ثانویه گیاه، باعث بهبود عطر و طعم غذا و رضایت مندی مصرف کننده شد.

وجود فلورمیکروبی طبیعی درمواد غذایی مختلف و همچنین آلودگی‌های ثانویه درطی مراحل تولید می توانند سبب مسمومیت های غذایی شود، از این حیث کنترل بار میکروبی مواد غذایی طی مراحل تولید تا مصرف بسیار حائز اهمیت است. وجود ترکیبات ضد میکروبی در اسانس و عصاره گیاهان دارویی خود نقطه عطفی در کاربرد آنها در صنعت غذا می‌باشد (Tenore et al.,2011).

### ۱-۴-۱ اهمیت گیاهان دارویی

در حال حاضر موضوع تولید و مصرف گیاهان دارویی درکشورهای صنعتی و توسعه یافته در حال احیاء است. محاسبه دقیق مقدار مصرف سالیانه گیاهان دارویی درجهان مشکل است، زیرا از گیاهان دارویی به اشکال ناشناخته متفاوتی استفاده می‌شود و اطلاعات جامعی نیز در این مورد وجود ندارد (صمصام شریعت، ۱۳۷۸ ).

### ۱-۴-۲ دلایل رویکرد به گیاهان دارویی

استفاده روز افزون مردم از گیاهان دارویی و همچنین تمایل شرکتهای تولید کننده مواد دارویی به داروهای دارای منشأگیاهی را می‌توان به دلایل زیر دانست :

۱- تهیه برخی از مواد موثر فعال که در صنایع دارویی از اهمیت بسیار برخوردارند، به طور مصنوعی امکان پذیر نبوده و تنها به صورت طبیعی از گیاهان مورد نظر قابل استخراج هستند . این دسته از مواد یا به طور کلی ساختمان شیمیایی ناشناخته‌ای دارند و یا به دلیل داشتن ساختمان شیمیایی بسیار پیچیده، تهیه آنها به صورت مصنوعی در صنایع داروسازی مشکل و مستلزم هزینه بسیار گران است .

۲- برخی از مواد طبیعی گیاهی چون سولانین‌ها به صورت مستقیم قابل استفاده نیستند. یعنی در صورت استفاده مستقیم فاقد ارزش دارویی می‌باشند ولی پس از تأثیر فرآیندهای شیمیایی; از بو، طعم ومزه مطلوب تری برخوردار می‌شوند.

۳- مواد دارویی مصنوعی ( شیمیایی ) سریع الاثر و دارای یک تأثیر مشخص بوده ولی دارای عوارض جانبی نامطلوبی بر بدن انسان می‌باشند، در حالی که مواد دارویی حاصله از گیاهان با آنکه به تدریج تأثیر می‌بخشند دارای اثرات مفید چند جانبه بوده و از این رو فواید جامعی از نظر دوام سلامت بدن دارند.

۴- مواد موثره گیاهان به خصوص عصاره ها و اسانس ها موارد استفاده متعددی در صنایع لوازم آرایشی، صنایع مواد شیمیایی، خانگی و غذایی دارند.

۵- استفاده از مواد موثره گیاهان دارویی از قدیم الایام معمول بوده ولی اکنون در صنایع نوپایی نظیر نوشابه سازی ،کنسرو سازی، شیرینی سازی جهت بهتر شدن طعم، رنگ و بوی محصولات در سطح دقیق‌تر و حساب شده‌تری استفاده می‌گردد.

۶-مواد مؤثره گیاهان دارویی علاوه بر این که مزه و طعم خوبی دارند اشتها آور نیز هستند و سبب هضم مواد غذایی و سلامت کار دستگاه گوارش می‌گردند (فلوک،.۱۳۶۸).

### ۱-۴-۳ کاربرد گیاهان دارویی

گیاهان دارویی کاربردهای متفاوتی دارند که شامل :

۱- از مواد مؤثره به صورت مستقیم یا غیر مستقیم برای اثرات درمانی استفاده می‌شود.

۲- از مواد موثره فعال موجود در این دسته از گیاهان در صنایع نوشابه سازی، کنسرو سازی و... به منظور بهبود در طعم، رنگ و مزه آنها استفاده می‌شود .

مسئله دارویی بودن گیاهان همیشه امری در حال تغییر است. به طوری که گیاهی که تا دیروز به عنوان گیاه غیر دارویی شناخته می‌شده، ممکن است فردا به عنوان یک گیاه مهم و ارزشمند معرفی گردد و به عکس، گیاهی که تا امروز به عنوان گیاه دارویی در بین عوام شهرت داشته و مورد استفاده قرار می‌گرفته ممکن است در بررسی های علمی روز، یک گیاه فاقد ارزش دارویی شناخته شود. تا کنون تنها خصوصیات دارویی حدود سی هزار گونه از ششصد هزار گونه گیاهی جهان شناخته شده است (امید بیگی، ۱۳۷۴).

### ۱-۵ اسانس ها

گیاهان قادر به ساختن دو نوع از روغنها هستند: روغنهای تثبیت شده[1] و روغنهای اسانسی. روغنهای تثبیت شده شامل استرهای گلیسرول و اسید چرب ( تری گلیسرید یا تری گلیسرول ) بوده، در حالیکه روغنهای اسانسی مخلوطی از ترکیبات فرار و ارگانیک مشتق شده از یک منبع گیاهی بوده، که در عطر و طعم آن گیاه دخالت دارند. روغنهای اسانسی باید از یک گونه گیاهی تقطیر شوند و هیچ یک از مواد آن نباید در طول تقطیر حذف شده و یا موادی به آن افزوده شود. اگرچه بیشتر ترکیبات، دست نخورده باقی می‌مانند، ولی مقدار بسیار کمی دستخوش تغییرات شیمیایی می‌شوند.

روغنهای اسانسی از قسمتهای مختلف گیاه بدست می‌آیند، نظیر : گل (رز)، برگ ( نعناع)، میوه ( لیمو) ، دانه (رازیانه) ، ریشه (خس خس)، ریزوم (زنجبیل) ، چوب (سدار)، پوست (دارچین) وجوانه گل (میخک). اسانسها معمولاً در دمای محیط مایع و اغلب آنها بی رنگ هستند. تعداد کمی از آنها رنگهای تیره دارند، مانند کامومایل که آبی رنگ می باشد (Burt., 2004; Gutierrez et al., 2008).

[1] -Fixed oil

روش هـــای مختلفـــی بـــرای تهیـــه اســـانس هـــای گیـــاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. متـداول ترین روش تولید اسانس در صنعت، روش تقطیر است. اسانس گیری بوسیله دی اکسید کربن مایع تحت درجه حرارت پایین و فشار بالا، بازده بیشتری دارد اما بسیارپرهزینه است. تفاوت در خـواص ارگانولپتیک نشان دهنده تفاوت در ترکیب روغـن بدسـت آمده به وسیله روش های مختلف می‌باشد، که می‌تواند خواص ضد میکروبی آن را نیز تحت تأثیر قرار دهـد. مشخص شده اسانس های استخراج شده به وسیله دی اکسیدکربن فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس‌های بدست آمده از روش تقطیر دارند (Lo presti,.2005).

### ۱-۵-۱ ترکیبات اسانس ها

اگرچه روغنهای اسانسی حاوی ترکیبات مختلف زیادی هستند، ولی اغلب یک یا دو ترکیب عمل بیولوژیک را در آنها برجسته می‌کند. معمولاً اسانس ها شامل ۶۰-۲۰ ترکیب هستند که ۳-۲ ترکیب در آنها عمده بوده و غلظت بالاتری (٪۷۰-۲۰ ) در مقایسه با ترکیبات دیگر که در مقدار جزئی هستند دارند. بنابراین ترکیبات عمده اسانس، خواص بیولوژیک آن را تعیین می کند (Turek and ., 2013 Stintzing).

### ۱-۵-۲ خواص کاربردی اسانس ها

اسانس ها وترکیبات آنها خواص کاربردی زیادی دارند و تاثیرخوبی در برابر ارگانیسم‌ها ( قارچها ، باکتریها و ویروسها ) دارند. اثرات سینرژیستی[۱] ترکیبات اسانس زمینه امید بخشی است که میتواند منجر به بهینه سازی خاصیت زیستی آن شود.

اسانس ها مخلوطی از ترکیبات پیچیده هستند که نسبت به ترکیبات خالص فعالیت شیمیایی بالاتری دارند و این بعلت اثر ترکیبات کم مقدار آنهاست (Bassolé and Juliani., 2012). اسانس های روغنی چربی دوست هستند و به این ترتیب میتوانند براحتی وارد سلول شده ، غشای آن را تخریب کرده و یا

[۱]- همیار زیستی

آن را نفوذپذیر کنند. مهمترین علامت نفوذپذیری غشاء، خروج یونها و کاهش پتانسیل، تخریب پمپ پروتون و کاهش ATP است (Bakkali et al., 2008).

### ۱-۵-۳ روش های آزمایشگاهی برای تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌ها

سنجش فعالیت ضد میکروبی می تواند به روش های انتشار، رقیق کردن و ... صورت گیرد، البته به نظر می‌رسد روش استانداردی برای سنجش فعالیت ضد میکروبی علیه میکروارگانسیم‌های مرتبط با غذا ارائه نشده است. با توجه به اینکه نتیجه یک آزمایش می تواند توسط فاکتورهای مختلفی مانند روش استخراج اسانس از گیاه، حجم تلقیح، فاز رشدی، pH محیط مورد استفاده برای رشد، مدت زمان انکوباسیون و دمای انکوباسیون تحت تأثیر قرارگیرد، لذا مقایسه اطلاعات منتشر شده پیچیده و مشکل است.

حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC)[1] توسط اکثر محققین به عنوان معیاری برای تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها ذکر شده است. تعیین MIC در مقالات منتشر شده متفاوت است و این مساله از موانع دیگر مقایسه مطالعات می‌باشد (Burt.,2004; Gutierrez et al., 2008).

### ۱-۵-۴ خواص ضد باکتری اسانس ها

خواص ضد باکتری اسانسها و ترکیبات آنها در گذشته مورد بررسی قرار گرفته است (Shelef.,1983; Nychas.,1995) یکی از خواص مهم اسانس‌ها و ترکیبات آنها، خاصیت آبگریزی است که باعث جداشدن لیپید غشاء سلول باکتری و میتوکندری شده و باعث نشت مواد داخل آنها به بیرون میشود (Knobloch et al.,1986; Sikkema et al.,1994). اگرچه خروج مقدار معینی مواد از غشاء سلول باکتری قابل تحمل بوده، ولی از دست دادن مقدار زیادی از مواد سلولی و خروج مولکولها و یونهای مهم منجر به مرگ سلول خواهد شد (Denyer and Hugo., 1991). بنظر این مکانیسم شامل اختلال در

[1] -Minimum Inhibitory Concentration

غشاء سیتوپلاسم، قطع نیروی محرکه پروتون، جریان الکترون، انتقال فعال وکوآگوله شدن محتویات سلول می باشد (Denyer and Hugo.,1991; Sikkema et al., 1995; Davidson.,1997).

در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی اسانس های گیاهی در تمامی موارد از مکانیسم مشابهی برخوردارنبوده ، با این وجود در اغلب موارد تاثیر اسانس های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی تایید شده است . ویژگی آبگریزی اسانس ها سبب نفوذ آنها در لیپید غشاء سلولی و افزایش نفوذ پذیری آن می گردد، که این امر سبب اختلال در کلیه فعالیت های حیاتی وابسته به غشاء سلولی، خروج یون ها، ترکیبات حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد ( Burt., 2004).

با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی در اسانس گیاهان، نمی‌توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضد باکتریایی آنها در نظر گرفت بلکه آنها هدف های متعددی را در سلول خواهند داشت. این‌مکانیسم ها جداگانه عمل نمی‌کنند، بلکه بعضی از آنها توسط سایرین تحت تأثیر قرار می‌گیرند. مکانیسم اثر این ترکیبات هم مانند ًاحتمالا سایر ترکیبات فنولی شامل موارد زیر می باشد :

« اختلال در غشاء سیتوپلاسمی، بر هم زدن نیروی حرکت پروتونی و جریان الکتریکی، انعقاد محتویات سلولی»ساختار شیمیایی یک اسانس هم بر مکانیسم آن اثرمی‌گذارد .

اهمیت حضور گروه هیدروکسیل در ترکیبات فنولی مانند کارواکرول و تیمول تایید شده است (Burt., 2014 ; Bassole and juliani.,2012; Efferth and Koch.,2011). قویترین خاصیت میکروبی اسانس‌ها بعلت دارا بودن درصد بالایی از ترکیبات فنولیک نظیر کارواکرول ، ائوژینول وتیمول می‌باشد (Farag et al., 1989). اهمیت حضور گروههای هیدروکسیل ترکیبات فنولیک در ایجاد خاصیت ضد میکروبی تایید شده ، ولی موقعیت نسبی گروه هیدروکسیل در حلقه فنولیک چندان تأثیری در میزان اثر ضد باکتریال اسانس ندارد. ترکیبات اسانس‌ها بر روی پروتئین‌های سلول که در غشای سیتوپلاسم قرار دارند اثر می‌گذارند، از جمله آنزیم« ATP آز» که درغشای سیتوپلاسمی واقع شده و بوسیله

مولکولهای لیپیدی احاطه می‌شود. دو مکانیسم ممکن، پیشنهاد شده که بموجب آن هیدروکربن های حلقوی عمل خود را انجام می‌دهند :

- مولکولهای هیدروکربن چربی دوست می‌توانند در لایه لیپیدی انباشته شده و پیوند لیپید – پروتئین را بشکنند.
- واکنش مستقیم ترکیبات چربی دوست با قسمتهای چربی دوست پروتئین‌ها (Juven et al., 1994 ; Sikkema et al., 1995)

### ۱-۵-۵ حساسیت باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به اسانس

اغلب مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس‌های روغنی بر روی ارگانیسم‌های عامل فساد و پاتوژنهای غذایی نشان می‌دهند که ، اثر اسانس‌های گیاهی روی باکتری‌های گرم مثبت قدری بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. به عبارت دیگر گرم مثبت ها نسبت به اثر ضد باکتریال اسانس‌ها حساس‌ترند. علت حساسیت کمتر گرم منفی‌ها شاید به علت وجود غشاء خارجی (لیپوپلی ساکارید) در باکتری‌های گرم منفی باشد که، سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس به این لایه سلول باکتری می‌شود (Burt .,2004).

### ۱-۵-۶ سمیت اسانس ها

سمیت اسانس‌های روغنی بستگی به مقدار، غلظت، تکرار استفاده، قابلیت دسترسی، سمیت داخلی مواد و واکنش با دیگر مواد غیربیولوژیکی و حساسیت فردی دارد. شرایط محیطی مانند اشعه ماورای بنفش (UV) میتواند بسیار مهم باشد. همچنین سمیت اسانس‌های روغنی میتواند به خاصیت سینرژیستی یا آنتاگونیستی[۱] بین ترکیبات آن با هم نیز مرتبط باشد (Schweiggert et al., 2007).

[۱]- ناهمسازی

### ۱-۵-۷ محدودیت استفاده از اسانس ها و جنبه های قانونی استفاده از آن

علاوه بر فراریت بالا، اسانس ها به راحتی می توانند بعلت قرارگرفتن در معرض گرما، رطوبت، نور و اکسیژن تجزیه شوند. تجزیه ا سانس ها میتواند بعلت اکسیدا سیون، ایزومریزا سیون، حلقوی شدن و دهیدروژنه شدن مولکول تحت شرایط فرآیند یا نگهداری ایجاد شود (Schweiggert et al., 2007).

علی رغم همه مطالعاتی که موجب شده تعدادی از اسانس‌ها به عنوان طعم‌دهنده تأیید شوند، ولی برخی مطالعات نشانگر ایجاد تحریک و سمیت آنها می‌باشد، که علت آن شاید قابلیت حل کردن چربی غشاء باشد. برخی از اسانس‌ها و اجزاء آنها سبب درماتیت[۱] آلرژیک در افرادی که با این مواد سروکار دارند می شوند. برخی از اسانس‌های استفاده شده درپزشکی نیز خواص اسپاسمولیتیک[۲] یا اسپاسموژنیک[۳] نشان می‌دهند. لذا پیشنهاد می‌شود قبل از اقدام به مصرف گسترده و یا استفاده از غلظت‌های بالای این مواد در موادغذایی مطالعات سلامت بیشتری انجام گیرد ( Burt.,2004 ) .

### ۱-۵-۸ اثرات ارگانولپتیک ناشی از استفاده اسانس‌ها و اجزاء آنها در مواد غذایی

در استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان مواد ضدباکتریایی درمواد غذایی، اثرات حسی آنها نیز باید مورد توجه قرار گیرد. اگرچه بسیاری از اسانس‌ها و مواد موثره آنها به عنوان GRAS [۴]پذیرفته شده اند، اما به علت طعمی که به مواد غذایی‌می‌بخشند ، استفاده از آنها محدود و در برخی موارد قابل پذیرش نمی باشد. با اینحال برای اینکه بتوان از اثرات مفید این مواد استفاده نمود محققان روش هایی را جهت کاهش اثرات حسی اسانس‌ها و اجزاء متشکله آنها پیشنهاد کرده‌اندکه به شرح زیراست :

---

[۱]- التهاب پوست

[۲]- شل کننده عضله

[۳]-سفت کننده عضله

[4]-Generally Recognized As Safe

۱- استفاده از یک اسانس گیاهی به عنوان طعم دهنده و در عین حال نگهدارنده ماده غذایی در پنیرها و بسیاری از مواد غذایی که از قبل هم بصورت معطر تهیه و مصرف می‌شدند .

۲- استفاده از اسانس در فرآورده هایی‌که خـود دارای طعـم قوی هستند ضمن ایجاد اثر مناسب سـبب پوشـیده شـدن عطر و طعم اسانس می‌گردد.

۳- اسـتفاده از برخـی اجـزاء متشـکله اسـانس کـه دارای بیشترین اثر ممانعت کنندگی هستند بـه جـای اسـتفاده از اسانس کامل، تا ضمن حفـظ اثـر ضد باکتریـال تغییرات حسی به حداقل برسد. گرچه بـه نظـر مـی رسـد کـه فعالیت ضد باکتریال اسانس متاثر از اثر متقابل همه اجـزاء آن است.

۴- استفاده از خواص سینرژیسم بین اسـانس‌هـا و یـا اجـزاء مختلف اسانس‌های باکتریال یا بین اسانس و یک ماده ضد باکتریال .

۵-بررسی و مطالعه روی عوامل پخش‌کننده اسـانس‌درماده غذایی‌تـا بـا پخـش شـدن کـاملتر اسـانس میـزان مصرف اسانس کاهش یابد .

۶-توجه به پتانسیل کاربردی اسانس، شـاید نیاز نباشد اسانس را مستقیما به مـاده غـذایی افـزود . برای مثال شستشوی کاهوی آلوده با محلول حاوی اسانس ریحان نتیجه بهتری نسبت به شستشوی کاهو بـا محلـول کلـرین نشان داده است (Burt.,2004 ;Lambert et al., 2001; Smith-Palmer et al., 2001).

### ۱-۵-۹ کاربرد اسانس ها در صنایع غذایی

اسانس‌ها بعلت دارا بودن خاصیت ضد باکتری و ایمن بودن، یکی از کاندیدهای شناخته شده بعنوان نگهدارنده در صنعت غذا هستند، اگرچه کاربرد آنها، بعلت طعم و بوی قوی مخصوصا در غلظت‌های بالا محدود است (Goni et al .,2009). لازم است که کمترین غلظت آنها با درجه حساسیت قابل قبول بمنظور استفاده در غذاها، بدون هیچ تغییری در بو و طعم غذا تعیین شود (Turgis et al., 2012).

خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها علیه پاتوژن‌های غذایی در محدوده ٪ ۰/۱-۰/۵ مشخص شده است (Tajkarimi et al., 2010). غلظت قابل قبول ارگانولپتیکی[۱] اسانس درغذا بسته به ویژگیهای اسانس،

[۱] - حسی

سیستم غذایی، روش کاربرد و روش فرآوری محصول متفاوت است. ممکن است با افزودن بیش از حد ترکیبات دیگر به غذا تغییر کند . اثر نگهدارندگی اسانس‌ها با استفاده از غلظت کمتر و در ترکیب با سایر روشهای نگهداری مانند بسته بندی در اتمسفراصلاح شده (MAP) [1]افزایش می‌یابد (Mastromatteo et al., 2010 ).

## ۱-۶ گیا ه رزماری

گیاه رزماری گیاهی چند ساله و به فرم بوته‌ای ا ست که در تمامی ف صل‌های سال سر سبز می‌با شد. برگهای باریک آن به صورت متقابل بر روی ساقه قرار می‌گیرند و گل های این گیاه به رنگ آبی مایل به بنفش می‌باشند ( شکل ۱-۱). از خصوصیات این گیاه بوی فراوان برگ ها می‌باشد که آن را به عنوان یک گیاه معطر مشهور نموده است. گیاه رزماری (اکلیل کوهی) از نقطه نظر سطح زیرکشت رتبه سیزدهم را درمیان گیاهان دارویی درایران به خود اختصاص داده است. نام علمی گیاه ***Rosmarinus officinalis*** به معنی "شبنم دریا" می باشد. در میان ترکیبات موجود این گیاه اسید کارنو سیک خاصیت آنتی اکسیدانی قوی دارد. فلاونوئیدها و فنول دی‌ترپن‌های این گیاه خاصیت ضد میکروبی دارند (نصری.، ۱۳۹۰) .

در صنعت به منظور کاهش اک سیدا سیون چربی درگو شت از افزودنی های م صنوعی با خا صیت آنتی اکسیدانی استفاده می‌گردد، از آن میان می توان بوتیل هیدروکسی آنیزول[2] و بوتیل هیدروکسی تولوئن[3] را نام برد که دارای خطر سرطان‌زایی می‌با شند. برای جلوگیری از اک سیدا سیون گو شت می توان از افزودنی های طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی نیز استفاده نمود. اسانس رزماری به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی که دارد در صنایع غذایی بسیار کاربرد دارد (نصری.، ۱۳۹۰).

[1] -Modified Atmosphere
[2] -BHA
[3] -BHT

شکل (۱-۱)- سرشاخه های گلدارگیاه رزماری

### ۱-۶-۱ اسانس رزماری

در بین اسانس‌های روغنی، اسانس رزماری بطور گسترده‌ای برای نگهداری مواد غذایی در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش استخراج ، نوع اندام و مدت زمان اسانس گیری بر میزان اثر بخشی آن تاثیر گذار می‌باشد. بیشترین میزان اسانس مربوط به برگ گیاه و حدود ۱/۸ ٪ میباشد (Arouma etal., 1992 ; Basaga et al ., 1997).

### ۱-۶-۲ اثرات آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس رزماری

مطالعات نشان داده که اسانس رزماری بعنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی در جلوگیری از تخریب رنگ و اکسیداسیون لیپیدها کاملاً موثر بوده است (Aruoma et al., 1992). اسانس رزماری فعالیت آنتی اکسیدانی قوی داشته و بطور گسترده در صنعت غذا مورد استفاده قرار میگیرد(Bassaga et al., 1997). فعالیت آنتی اکسیدانی آن به حضور چندین دی ترپن نظیر اسیدکارنوسیک، کارنومول و رزمانول، رزمارینول و رزماری دی فنل مربوط بوده که با دادن هیدروژن، زنجیره واکنش رادیکال آزاد رامی شکند( Arouma etal., 1992 ; Basaga et al ., 1997). یکی از اصلی ترین فرآیندهایی که منجر به فساد موادغذایی می شود؛ اکسیداسیون چربیها و یا رنگدانه های موجود درغذاست.

از سوی دیگر نگرانی‌ها در مصرف آنتی اکسیدان‌های سنتزی (و اثبات سرطانزا بودن بعضی ازآنها) لزوم یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی قابل مصرف در غذا را افزایش داده است. بنابراین اسانس رزماری بعنوان

یکی از آنتی اکسیدانهای قوی جایگاه ویژه‌ای درصنایع غذایی پیدا کرده است . مطالعات زیادی اثرات اسانس رزماری را روی محصولات گوشتی نظیر همبرگر، سوسیس و... بررسی کرده‌اند .

اکثر این تحقیقات به نتایج مثبتی در این زمینه دست یافته و رزماری را به عنوان آنتی اکسیدان مناسب معرفی کرده‌اند. در بعضی از بررسی ها اثرات رزماری با سایر آنتی اکسیدانهای سنتزی و طبیعی(مانند ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در زیتون) مقایسه گشته و مشاهده شده که اسانس رزماری اثر آنتی اکسیدانی بالاتری دارد (Hammer et al .,1999 ;Smith- plamer et al.,1998).

علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی قوی، اسانس رزماری باعث جلوگیری از رشد انواع پاتوژن های غذایی در آزمایشگاه میشود.خواص ضدباکتری اسانس رزماری علیه ۱۳ باکتری و ۶ قارچ بررسی شده است که شامل کاندیدا آلبیکانس و ۵ درماتومیست میباشد. عمده فعالیت ضد باکتری اسانس رزماری بر روی باکتریهای *اشرشیاکلی ، سالمونلا تایفی موریم ، سالمونلا اینتریتیدیس و شیگلا سونی* به اثبات رسیده است (Bozin et al,.2007).

### ۱-۶-۳ ترکیبات عمده موجود در اسانس روزماری

اسانس رزماری دارای ترکیبات زیاد و متنوعی است که عمده ترین آنها در جدول ذیل آورده شده است.

جدول( ۱-۱) - عمده ترین ترکیبات اسانس روزماری(Socasi et al .,2008)

| نام ترکیب | میزان ٪ موجود |
|---|---|
| ۱و ۸ – سینئول ( 1,8-Cineol) | ٪ ۱۰-۱۲ |
| بورنئول ( Borneol) | ٪ ۶ -۷ |
| کامفر( Campher ) | ٪ ۷ -۸ |
| پی سیمن ( p-cymene) | ٪ ۱ -۲ |
| لیمونن( Limonene ) | ٪ ۴-۶ |
| آلفا پی نن ( α - Pinene ) | ٪ ۲۲-۲۵ |
| بتا پی نن ( β–Pinene ) | ٪ ۱-۲ |

## ۱-۷ اهمیت گوشت از دیدگاه تغذیه

گوشت یکی ازمنابع پروتئینی به شمارمی‌آید. غنی بودن گوشت از پروتئین‌های ارزشمند حاوی اسیدهای آمینه ضروری برای بدن، مواد معدنی مانند آهن و روی، انواع ویتامین‌ها و نیز انرژی کافی سبب می‌شود تا آن را در زمره بهترین و کاملترین مواد غذایی طبقه بندی نمایند (Dave and Ghaly., 2011).

### ۱-۷-۱ ترکیبات گوشت

**پروتئین** -گوشت دارای پروتئینی است که ارزش غذایی آن نسبت به پروتئین گیاهی به مراتب بالاتر می‌باشد، زیرا که در تغذیه انسان علاوه بر کمیت، مسئله کیفیت نیز مطرح است. پروتئین گوشت حاوی مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آمینه ضروری است که به مراتب در بافت ماهیچه بیشتر از بافت پیوندی است .

**چربی** -چربیهای داخل سلولی ماهیچه حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع با طول زنجیره ۲۲-۲۰ اتم کربن بوده که از ارزش غذایی بالایی برخوردار می‌باشد. چربیها به عنوان یک منبع انرژی برای متابولیسم بدن به شمار می‌روند .

**ویتامین** -گوشت یکی از منابع مهم و سرشار از انواع ویتامین B (B Complex) می‌باشد که در اثر حرارت مقداری از آنها از بین می‌روند . انواع ویتامین های محلول درچربی نیز در گوشت یافت می‌گردند.

**.مواد معدنی** -میزان مواد معدنی درگوشت تازه حدود ۱٪ می‌باشد که بیشتر شامل فسفات و سولفات های پتاسیم بوده و علاوه برآن حاوی سدیم، منیزیم، کلسیم، کلر، آهن و روی می‌باشد. آهن اغلب بصورت ترکیبات آلی بوده و دارای قابلیت جذب بسیار خوبی توسط روده ها می‌باشد ( Colmenero et al., 2001).

### ۱-۷-۲ ماندگاری گوشت

افزایش زمان ماندگاری گوشت خام یک هدف بلند مدت در صنعت گوشت بوده (Gill., 1996) و استراتژی‌های جاری برای نگهداری گوشت شامل استفاده از سیستم سرمایش، محافظت با بسته بندی

و نگهدارنده ها می‌باشد. بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده با میزان بالای $O_2/CO_2$ باعث افزایش مدت نگهداری گوشت قرمز می‌شود . بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده به میزان ۳۰-۲۰ ٪ $CO_2$ در جلوگیری از فساد میکروبی موثر بوده است (Gill and Tan., 1980 ; Stiles., 1991). میزان بالای $O_2$ تاخیر تشکیل مت میوگلوبین و قرمزی طولانی مدت گوشت را در پی خواهد داشت ( Mc millin., 2008) . زمان ماندگاری گوشت نگهداری شده در سرما، با بسته بندی دراتمسفر اصلاح شده حدود ۹-۸ روز است . پس از اتمام این مدت گوشت شروع به قهوه‌ای شدن می‌کندکه باعث کاهش پذیرش آن توسط مشتری شده، ولی دراین حالت می تواند از نظر میکروبی کاملا ایمن و مطمئن باشد (Banon et al., 2012; Camo et al., 2008 ; Ripoll et al.,2011).

بنابراین بهبود وضعیت آنتی اکسیدانی گوشت می‌تواند به افزایش زمان ماندگاری آن کمک کند. از سال ۲۰۰۸ افزودن آنتی اکسیدانها به گوشتهای تکه شده توسط اتحادیه اروپا ۲۰۰۸ / ۱۳۳۳ منع گردیده است. بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده ، پذیرش قابل توجهی در میان روشهای جدید برای نگهداری مواد غذایی بدست آورده است ( Ortuno et al.,2015 ).

### ۱-۷-۳ میکروبیولوژی گوشت

میکروبیولوژی گوشت و فرآورده‌های آن دانشی در ارتباط با منابع ، چگونگی و اهمیت آلودگی‌های میکروبی گوشت و بیماریهای ناشی از آن می‌باشد. منبع اصلی آلودگی گوشت دام زنده است. با توجه به بار میکروبی بسیار بالای موجود در روده‌ها، کم توجهی و تماس لاشه‌ها با محتوی روده‌ها موجب آلودگی شدید و فساد زودرس گوشت خواهد شد . در بین دامهای کشتاری، گوشت گوساله بیشترین در صد آلودگی به سالمونلا را دارا می‌باشد (Davies., 1998).

### ۱-۸ میکروارگانیسم ها در صنایع غذایی

گروههای میکروبی مهم در مواد غذایی شامل چندین گونه از باکتریها، مخمرها و کپکها می‌باشند. بیشتر آنها بدلیل رشد در مواد غذایی توانایی ایجاد فساد دارند، و در بین این گروه ها، باکتری‌ها بیشترین گروه موجود در مواد غذایی هستند که بدلیل حضورشان در همه جا و رشد سریع حتی در شرایطی که

مخمرها و کپکها نمی‌توانند رشد کنند، این گروه بیشتر باعث فساد و بیماریهای ناشی از آن در مواد غذایی می‌شوند. برای طبقه بندی باکتری‌ها چندین روش بکار می‌رود ، از جمله : مورفولوژی، رنگ پذیری گرم ، خصوصیات بیوشیمیایی، الگوی پروتئین‌ها، توالی اسیدهای آمینه در یک پروتئین خاص و....(Frazier and Westhoff ., 1989).

### ۱-۸-۱ سالمونلا

در بین باکتریهای میله‌ای گرم منفی، مهمترین ارگانیسم‌های عامل التهاب های روده‌ای حاصل از مواد غذایی، مربوط به اعضای جنس سالمونلا می‌باشد. سالمونلا ازخانواده انتروباکتریاسه، ارگانیسمی ریز، میله ای شکل، گرم منفی و بدون اسپوراست. بطور وسیعی در طبیعت پراکنده، و منشا آن انسان و حیوانات می‌باشد. گلوکز را تخمیر کرده ومعمولا گاز تولید می‌کند ولی قادر به تخمیر لاکتوز یا سوکروز نیست.

اگرچه گونه های سالمونلا بطور معمول از اسیدهای آمینه به عنوان منابع نیتروژن استفاده می‌کنند، ولی در مورد *سالمونلا تایفی موریم* ، نیترات، نیتریت و آمونیاک به عنوان منابع اصلی نیتروژن به شمار می‌روند. این باکتری در محدوده وسیعی از دما و pH رشد می‌کند. در دمای اتاق بخوبی رشد کرده ولی حرارت مناسب برای آن در حدود ۳۷ درجه سانتی گراد است. سالمونلا در مواد غذایی فاسد شدنی با حرارت از بین می‌رود. رشد گونه ها و نژادهای مختلف سالمونلا نسبت به حرارت و شرایط محیطی متفاوت است. احتمال عفونت با مصرف غذای آلوده به سالمونلا بستگی به عوامل زیر دارد:

۱- مقاومت مصرف‌کننده

۲- عفونت‌زایی گونه خاص از سالمونلا

۳- تعداد ارگانیسم‌های خورده شده

ظاهرا سالمونلا می تواند به میزان قابل توجهی در غذا وجود داشته باشد، بدون آنکه تغییرچشمگیری در بو و مزه آن ایجاد کند. البته وجود تعداد زیادی از این پاتوژنها در غذا احتمال عفونت را زیاد و مدت نهفتگی بیماری راکم می‌کند. اغلب انواع مشخصی از سالمونلا مانند *تایفی موریم باعث* بیماریهای

گوارشی در انسان می‌شود. تعداد زیادی از مواد غذایی در شیوع عفونتهای سالمونلایی دخالت دارند. انواعی که معمولا در معرض خطر هستند; انواع گوشتها، مرغ و محصولات آنها می‌باشند. گوشتهای تازه امکان حمل باکتری سالمونلا را دارند. دوره نهفتگی بیماری سالمونلایی حدود ۳۶-۱۲ ساعت است. (Monget et al., 1995).

## ۱-۹ نانوتکنولوژی

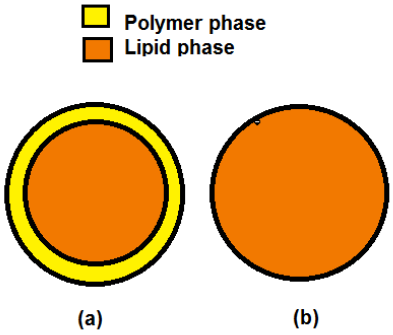
نانوتکنولوژی عرصه بسرعت درحال رشد تکنولوژی و علوم است، که تمایل به ایجاد ذرات ۱۰۰-۱ نانومتر دارد. این تکنولوژی نشان داده که پتانسیل فراوانی درتهیه ساختارهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی از مواد در مقیاس مولکول یا اتم را دارد. در مقایسه با مواد ماکروسایز، ساختارهایی با مقیاس نانو ترکیبات پیشرفته و باشکوه‌تری هستند. به این دلیل آنها در انواع زمینه‌ها از قبیل الکترونیک، کامپیوتر و منسوجات و صنعت داروسازی بسیار قابل توجه هستند. کاربرد نانوتکنولوژی در صنعت غذا بعلت ساختار پیچیده و حساسیت آن، نسبت به سایر زمینه‌ها به آهستگی توسعه یافته است. برخی از کاربردهای آن در صنعت غذا، بهبود جذب و قابلیت دسترسی به مواد مغذی و مکمل ها در بدن، تولید طعم های جدید یا بهبود طعم و بافت غذا، بهبود مواد بسته بندی غذا و توسعه نانوسنسورهایی است که می‌توانند اطلاعاتی در مورد تازگی یا فساد محصولات در هنگام نقل وانتقال بدهند. بر طبق این پارامترها، کاربرد نانوتکنولوژی در صنعت غذا بر پایه فرآیند شیمیایی بین مواد موجود در غذا، مواد بسته بندی غذا و نانو مواد بعنوان مسئول واکنشهای شیمیایی است (Livney., 2015).

### ۱-۹-۱ نانوذرات

ذرات بیوپلیمری در مقیاس نانو توجه زیادی را در توسعه فرمولاسیون جدید برای سیستم کنترل رهایش و افزایش پایداری اسانس‌های روغنی بخود جلب کرده‌اند. نانو ذرات پلیمری به دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند: نانوکپسول و نانواسفر

نانوکپسول دارای دیواره پلیمری است که روغن در مرکز آن قرار می‌گیرد، در حالیکه در نانواسفر روغن می‌تواند با دیواره پلیمری یا ماتریکس کونژوگه شود (شکل ۱-۲ ) .

درنانوکپسول‌ها ترکیبات فعال زیستی در یک حفره با غشاء پلیمری منحصربفرد احاطه می‌شود، در صورتیکه در نانواسفر، سیستم ماتریکسی هستند، که در آن ترکیبات فعال زیستی بصورت یکنواخت پراکنده شده‌اند.




شکل (۱-۲)- تصویر شماتیک از ساختار (a) نانوکپسول (b) نانواسفر

### ۱-۹-۲ نانو انکپسولاسیون

نانوانکپسولاسیون بعنوان یک تکنولوژی که پتانسیل زیادی برای حل مسائل دارد هدفمند شده است. نانو انکپسولاسیون یکی از شاخه های نانوتکنولوژی است، که اخیراً از طرف محققین خصوصاً، در زمینه داروسازی، صنایع غذایی و بیوتکنولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. فرآیندی است که توسط آن ذرات کوچک مواد در هسته قرارگرفته و دیواره‌ای به شکل کپسول آنها را احاطه می‌کند. این روش برای حفاظت ترکیبات فعال زیستی(ریزمغذی‌ها، آنزیم‌ها، آنتی‌اکسیدانها و مواد افزودنی بیولوژیکی فعال )بکار گرفته می‌شود.

از چنین مطالعاتی  برای استفاده کلینیکی در زمینه های تشخیص، تحویل دارو، وسائل پزشکی و تصویر برداری استفاده شده است. نانوکپسولاسیون شامل استفاده از نانو حامل ها برای درونپوشانی کردن مواد یا مولکولهای حساس است، که باعث حفاظت آنها از فاکتورهای محیطی نظیر pH ، اکسیژن، نور و ... می‌شود. همچنین مولکولهای فرار با این روش پایدار مانده و باعث حفاظت آنها از تغییرات اکسیداتیو، نوری و فراریت می‌شود.بنابراین نانوانکپسولاسیون دارای پتانسیل بیشتری به منظور افزایش فراهمی

زیستی ، بهبود کنترل انتشار وهدف قراردادن دقیق ترکیبات زیستی نسبت به میکروانکپسولاسیون می‌باشد (Ezhilarasi et al .,2012).

### ۱-۹-۳ مزایای انکپسولاسیون

مزایای انکپسولاسیون شامل موارد زیر است:

۱-کاهش واکنش پذیری مواد هسته به محیط (نور، گرما و آب )

۲-کاهش تخریب یا تغییر مواد هسته

۳-افزایش فرآیند جابجایی آسان تر

۴-کنترل رهایش مواد فعال

۵-پوشاندن طعم مواد هسته(Ravi et al .,2015)

### ۱-۹-۴ نانو حامل ها

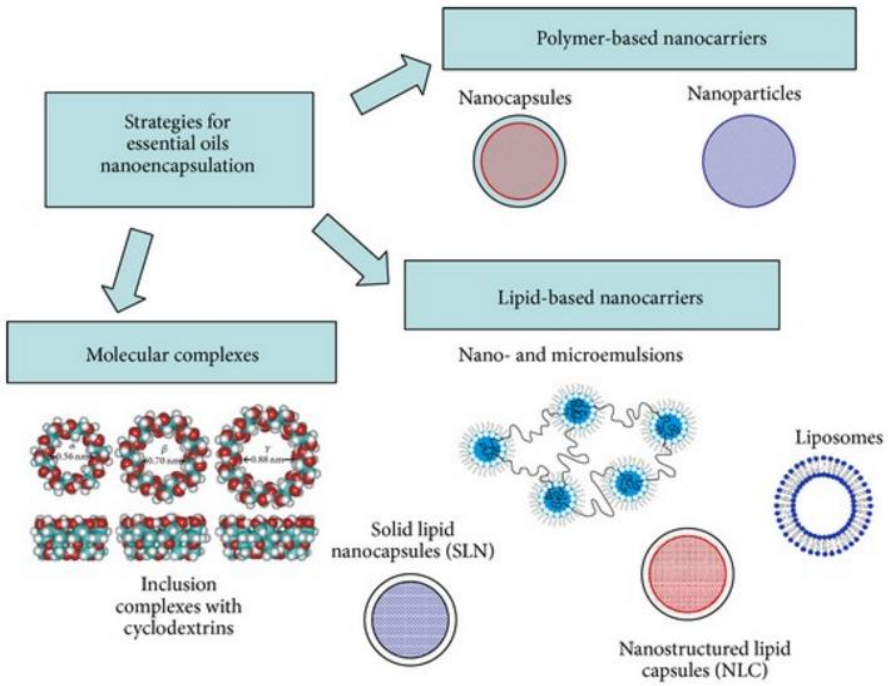
نانوحامل‌ها شامل دوگروه; پلیمریک و لیپیدی( شامل لیپوزومها، نانوذرات لیپیدی جامد ، نانوساختارهای لیپیدی و نانوامولسیون) هستند. نانو حامل ها قادرند پتانسیل ضد باکتریایی ترکیبات زیستی مانند اسانس‌های روغنی را با افزایش واکنشهای سلولی بین آنها و باکتریها افزایش دهند. همچنین سبب افزایش محلولیت در آب، پایداری و قابلیت دسترسی این ترکیبات می‌شوند .نانوذرات را می‌توان با انواع زیادی از مواد و ساختارهایی که تجزیه پذیری بالا و زیست سازگاری دارند، ایجاد کرد . شکل (۱-۳ ) نانوحامل‌های طبقه بندی شده مبتنی بر پلیمر و پایه لیپیدی را نشان می‌دهد . کمپلکس‌های مولکولی شامل سیکلودکسترینها نیز جزء نانوحامل‌ها بحساب می‌آیند (Bilia et al.,2014 ).

- نانوحامل‌های پلیمری شامل نانوکپسول ها ونانو اسفرها هستند .
- نانوحامل‌های لیپیدی شامل نانو و میکروامولسیون‌ها، لیپوزوم‌ها ، نانوحامل‌های لیپیدی جامد (SLN)[1] و حامل‌های لیپیدی نانوساختاری (NLC)[2] هستند .

[1] - Solid Lipid Nanoparticles
[2] - Nanostructured Lipid Carriers

میکروامولسیون‌ها، دیسپرسیون شفاف و یکنواختی بوده که ذرات آن بالاتر از ۵۰۰ نانومتر است و انرژی کمی برای تشکیل نیازدارند. نانوامولسیون‌ها، دیسپرسیون روغن درآب خوبی هستند و تمایل خودبخودی به جدا شدن فازهای تشکیل دهنده دارند واندازه ذرات آنها بین ۵۰۰-۱۰ نانومتر است . SLN و NLC در دمای اتاق و بدن انسان جامد و دارای هسته لیپیدی بوده، که باعث می شود این حامل ها یک رسانه مناسب برای به دام افتادن ترکیبات چربی دوست مانند اسانس های روغنی باشند.

لیپوزوم ها شامل یک فسفولیپد دراطراف یک هسته آبی است که از سال ۱۹۷۰ تا امروز در سیستم تحویل دارو مورد استفاده قرار گرفته است . کمپلکس های مولکولی اشاره به ارتباط فیزیکی بین یک میزبان و یک (ماده موثره) مولکول مهمان دارد که در مورد اسانس های روغنی، میزبان سیکلودکسترین ها میباشند (Bilia et al.,2014).




شکل( ۱-۳ )- تشریح شماتیک نانوسیستم برای اسانسهای روغنی(Bilia et al.,2014).

### ۱-۹-۴-۱ نانو حامل های پلیمری

پلیمرهای زیست سازگار با منشاء مصنوعی شامل پلی α - سیانوآکریلات استرهای آلکیل ، پلی وینیل الکل ، اسید پلی لاکتیک ، اسید پلی گلیکولیک و اسید گلیکول پلی لاکتیک ( شامل پلی ساکاریدها و پروتئین ها ) می‌باشند . پلی ساکاریدها شامل ترکیباتی با:

- منشا گیاهی ( پکتین ، سلولز و مشتقات آن ، نشاسته و مشتقات آن ، صمغ عربی ، کاراگینان وآلژینات )
- منشا میکروبی یا حیوانی ( گزانتان و کیتوزان )

بوده و پروتئین‌ها شاملِ آلبومین ، ژلاتین ، پروتئین سویا وکازئین می‌باشند.

نانوذرات ساخته شده از پلی ساکاریدها، با توجه به خواص منحصر به فرد خود ، حامل‌های خوبی برای ارائه و حفاظت از خواص فیزیولوژیکی مواد آبدوست بوده و با موفقیت به عنوان سیستم‌های دارو رسانی استفاده شده است ( Liu et al., 2008 ). بعنوان مواد زیستی طبیعی، پلی ساکاریدها : پایدار، ایمن، غیر سمی، آبدوست و زیست تجزیه پذیر بوده، منابع فراوانی در طبیعت دارند و فرآوری آنها ارزان می‌باشد. رهایش اسانس‌ها از حامل‌های آنها توسط تجزیه، جداشدن پیوندهای سطحی، جذب عناصر اصلی، انتشار از ماتریکس و یا ترکیبی از این فرآیندها می‌باشد ( Soppimath et al., 2001).

### ۱-۹-۵ نانوژل

نانوژل‌ها اغلب بعنوان ذرات هیدروژلی دراندازه نانو بوده، که توسط پیوندهای شیمیایی یا فیزیکی آبدوست یا شبکه پلیمری آمفی‌فیلیک تعریف میشوند، و بصورت ژل های کلوئیدی در محیط آبی هستند . نانوژل ها ساختار مشابه با هیدروژل هایی نظیر ژل های جاذب آب و انعطاف پذیر شبیه بافت طبیعی دارند. گزارش شده که نانوژل‌ها دارای ظرفیت بارگیری بالا، مقاومت بالا و پاسخ به شرایط محیطی نظیر محیط یونی قوی، pH و حرارت هستند (Kabanov and Vinogrado.,2009; Raemdonck et

(al.,2009. بعلاوه نانوژل ها خواص قابل توجهی دارند که میتوانند به تحریکات محیطی برای رها کردن سیستم تحویل پاسخ دهند.

دو روش برای ساخت نانوژل ها :

۱-تولید خودبخودی

۲-پیوندهای شیمیایی

مکانیسم تولید خودبخودی به دودسته تقسیم می‌شود :

- سیستم تک ترکیبی که از پلی ساکارید و یا مشتقات آن تشکیل شده است، و شامل واکنشهای آب دوست یا باندهای هیدروژنی است .
- سیستم چند ترکیبی که حداقل یک مولکول دیگر در آن شرکت می‌کند و شامل باندهای هیدروژنی بین پلی ساکارید و دیگر مولکول هاست (Yu et al .,2006).

در هر دو مورد نیروهای واندروالسی در فرآیند شرکت می‌کنند ولی نقش مهمی ندارند. نانوژل ها بعنوان یکی از موثرترین نانوحامل ها شناخته شده‌اند. در سال ۲۰۰۰ میلادی لغت نانوژل توسط اتحادیه بین المللی شیمی محض و کاربردی (IUPAC) [1]تعریف شد.

در مقایسه با سایر نانوحامل‌های پلیمری، نانوژل ها میتوانند مقدار زیادی آب و مواد زیستی را با شبکه ۳ بعدی پلیمری خود نگه دارند. نانوژل ساخته شده از کیتوزان بعلت توانایی در درونپوشانی کردن انواع مختلفی از داروها، مولکول های ریز، پپتیدها، پروتئین‌ها و... ، تنظیم سرعت رهایش، افزایش کارایی و بهبود عملکرد انتخابی در سالهای اخیر مورد توجه قرارگرفته است ( Yao et al., 2016) .

### ۱-۹-۵-۱ کیتوزان

کیتوزان فرم دا ستیله شده کیتین بوده که بعنوان یک بیوپلیمر چند منظوره با محدوده و سیع کاربرد در صنایع غذایی شناخته شده است (Shahidi et al.,1999).کیتوزان یک پلی ساکارید کاتیونی است

[1] -International Union of Pure and Applied Chemistry

که بیوپلیمرآن (کیتین) از گلوکز آمینی بنام پلیβ -( ۴ ←۱ )N- ا ستیل گلوکزآمین ت شکیل شده اســـت. این بیوپلیمر غیر ســـمی بوده و قابلیت ســـازش پذیری، قابلیت تغییر پذیری و خواص ضـــد باکتریایی و ضد سرطانی دارد (Fathi., 2014). کیتوزان در محلول اسیدی کم با pH کمتر از ۶/۵ حل شده و می‌تواند با ترکیبات آنیونی نظیر تری پلی ف سفات و نمک سدیم پلی آ سپارتیک ا سید پیوند برقرار کند (Hu et al., 2008).

اثر کیتوزان در ثبات اکسیداتیو گوشت توسط ایزومی موتو و دارمدجی[1] (۱۹۹۴) مشاهده شده که با افزودن ۱٪ از آن منجر به کاهش ٪۷۰ در ۲-تیوباربیتوریک اسید بعد از ۳ روز نگهداری گوشت در ۴°Cشده ، و مکانیسم آن مربوط به شلاته کردن آهن آزاد بوده که از هموپروتئین های گوشت در طول فرایند حرارتی یا نگهداری، آزاد می‌شود . (Kamil et al., 2002).

### ۱-۹-۵-۲ اثرات ضد باکتریایی کیتوزان

کیتوزان در آزمایشگاه، فعالیت ضد میکروبی در برابر محدوده ای از پاتوژن‌های غذایی نشان داده و در پی آن توجه قابل ملاحظه‌ای را بعنوان یک نگهدارنده طبیعی غذا بدست آورده است (Darmadji and Izu-mimoto.,1994 ; Shahidi et al.,1999 ; Kamil et al., 2002 ).

کیتوزان نه تنها باعث کاهش رشد پاتوژن ها می‌شود، بلکه بطور واضحی سبب تغییر در ساختار و شکل مولکول باکتری می‌شود. از سوی دیگر ارتباط گروههای آمینوی کیتوزان با گروههایی نظیر اسیدهای چرب می‌تواند ایجاد مشتقاتی کند که به دو طرف خم شده و این چرخش آنها را قادر می‌سازد که در آب تشکیل نانومیسل داده و چربیها و روغنها نظیر اسانس‌های گیاهی را درونپوشانی کرد.

از سوی دیگر کیتوزان از نظر شیمیایی خنثی است و تهیه آن با قیمت پایین ازکیتین (بدون استفاده از ترکیبات سمی) امکان پذیر است (Crini and Badot., 2008). زنی و کاورکر[2] (۲۰۰۳) نشان دادند

[1] - Izumimoto and Darmadji.
[2] - Zheny and Cawerker.

که کیتوزان اثر ضد باکتریایی روی باکتریهایی نظیر *اشرشیاکلی*، *باسیلوس مگاتریم*، *باسیلوس سرئوس* و *انتروباکتر ناکازاکی* و همچنین اثر ضد قارچی بر روی انواع مختلف قارچها دارد .

خواص ضد باکتری کیتوزان به چند فاکتور بستگی دارد :

- نوع کیتوزان استفاده شده (درجه داستیله شدن و وزن مولکولی)
- pH
- درجه حرارت

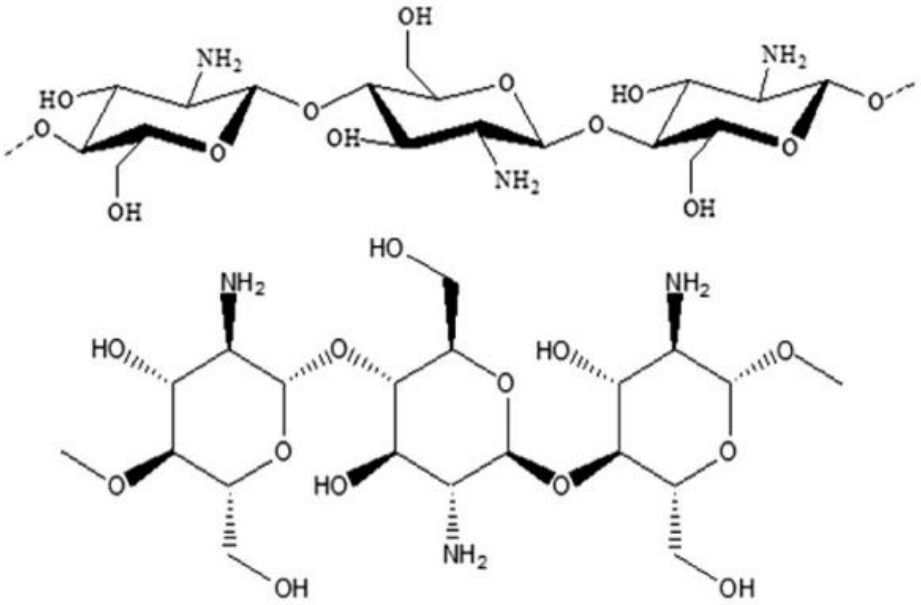
مکانیسم خاصیت ضد باکتری کیتوزان هنوز بدرستی روشن نشده است ولی چند مکانیسم به آن نسبت داده می‌شود ( Khalili et al ., 2015) .

### ۱-۹-۵-۳ تولید خودبخودی کیتوزان

تولید خودبخودی متکی بر تعادل نیروهای جاذبه و دافعه بین یک جفت مولکول به عنوان ساختارهایی برای تشکیل ابر مولکولهای کاربردی است .

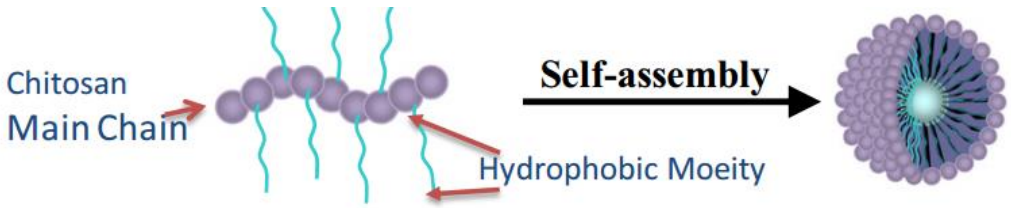
با تغییر دما، غلظت،pH و قدرت یونی ، نیروهای مکانیکی (فشار، برش واولتراسوند) و میدان الکتریکی و مغناطیسی، تنوع زیادی در ساختار بوجود می‌آید ( Sanguansri et al ., 2006 ).

ساختار مولکولی کیتوزان و مشتقات آن نقش مهمی در تولید خودبخودی دارد. شکل(۱-۴).ساختار مولکولی کیتوزان را نشان می‌دهد .




شکل(۱-۴) -ساختار مولکولی کیتوزان (Yang et al., 2014).

ساختار شیمیایی کیتوزان شامل جایگاه کاتیونی و آب‌گریز است. به این ترتیب کیتوزان یک پلی الکترولیت داخلی و آمفی‌فیلیک میباشد. وزن مولکولی و درجه داستیله شدن فاکتورهایی هستند که در تولید خوبخودی نقش مهمی دارند ( Payne .,2007). وزن مولکولی تاثیر مهمی در رفتار فرآیند تولید خودبخودی دارد ( شکل ۱-۵).




شکل(۱-۵ )- نمایی از واکنش تولید خودبخودی در کیتوزان(Yang e al., 2014).

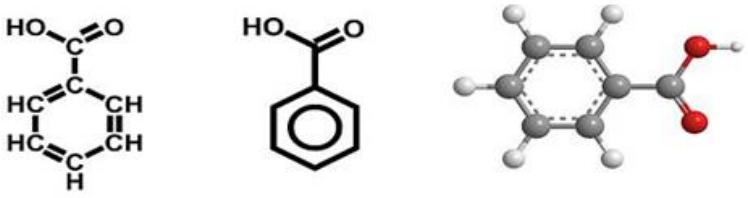
### ۱-۹-۶ اسید بنزوئیک

اسید بنزوئیک، یک ترکیب بلوری بی رنگ (سفید) است. این ترکیب ساده‌ترین اسید کربوکسیلیک آروماتیک نیز می‌باشد (شکل۱-۶) .این ماده یک اسید ضعیف محسوب می‌شود. از

نمک‌های آن به عنوان نگهدارنده‌های غذایی استفاده شده ،و همچنین در ساخت بسیاری از ترکیبات آلی دیگر از بنزوئیک اسید استفاده می‌شود.اسید بنزوئیک و نمک‌هایش به عنوان نگهدارنده غذا مصرف دارند که به نام‌هایE ۲۱۲، ۲۱۱E، ۲۱۰E و۲۱۳ E شناخته می‌شوند.

هر کدام از این نمک‌ها از واکنش مستقیم یا واکنش با نمک‌های سدیم، پتاسیم یا کلسیم تهیه می‌شوند. در اصل اسید بنزوئیک از رشد قارچها، مخمرها و بعضی باکتریها جلوگیری می‌کند. نحوه اثر اینگونه است که در ابتدا اسید بنزوئیک جذب سلول می‌شود، اگر pH درون سلولی به ۵ یا کمتر تغییرکند، تخمیر ناهوازی گلوکز از طریق فسفوفروکتوکیناز به میزان ٪۹۵ کاهش می‌یابد و این خود باعث نابودی آنها می‌شود.

مقدار معمول استفاده از بنزوئیک اسید و نمک‌هایش به عنوان نگه دارنده بین ٪۰/۰۵-۰/۱ می‌باشد. البته در بعضی غذاها باید از سطوح بالاتری از بنزوئیک اسید استفاده شود ، که مقادیر حداکثرآن در قوانین بین المللی غذا موجود است.در اصلاح سطح کیتوزان به منظور تولید نانوژل ترکیبات مختلفی استفاده می‌شود که اسید بنزوئیک در مقایسه با سایر اصلاح کننده‌های شناخته شده نظیر گلوتارآلدئید و گلیکول که سمی بوده و دارای اثرات جانبی نظیر تحریک چشم ، پوست و سیستم تنفسی، ایجاد سردرد، تهوع و آسم هستند، یک اسید ایمن است (Natella et al.,1999 ) .




شکل ۱-۶- ساختار مولکولی اسید بنزوئیک( Silva and lidon ., 2016)

# فصل دوم

# مروری بر پژوهشهای  پیشین

در سالهای اخیر مطالعات زیادی روی اثرات ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و سلامت بخشی اسانسهای روغنی انجام گردیده است.

- پندیت و همکاران[1] (۱۹۹۴) حساسیت باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* را به اسانس رزماری بررسی کردند. نتایج نشان داد، افزودن ٪۱ اسانس رزماری به سوسیس جگر آماده پخت، رشد باکتری را به تاخیر انداخته و ٪۵ از آن بصورت درونپوشانی شده از رشد باکتری جلوگیری کرده است .

- لوپز بوته و همکاران [2](۱۹۹۸) اثر اسانس رزماری را بر اکسیداسیون چربی گوشت بررسی کردند. نتایج نشان داد که پس از ۹ روز نگهداری در دمای یخچال، میزان مالون آلدئید کاهش یافته و مقدار آن به ۰/۲۵ گرم مالون آلدئید /کیلوگرم گوشت رسیده است .

-ناتلا و همکاران [3] (۱۹۹۹) اثر اسید بنزوئیک را بعنوان آنتی اکسیدان مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که فنلیک های مشتق شده از اسید بنزوئیک باعث کاهش فریل میوگلوبولین شده و اکسیداسیون چربیها را که ناشی از کاتالیستهای فلزی است کاهش می‌دهد .

-شهیدی و همکاران[4] (۱۹۹۹) کاربرد کیتوزان را در مواد غذایی بررسی کرده و خاصیت غیر معمول ضد میکروبی کیتوزان را علیه گروه های مختلف میکروارگانیسم ها مطالعه کردند. آنها دریافتند بعلت وجود بار مثبت روی کربن شماره ۲ مونومر گلوکزآمین ، در pH برابر۶ ، کیتوزان قابلیت حل پذیری بیشتری داشته و خاصیت ضد میکروبی آن نیز نسبت به کیتین افزایش می‌یابد. همچنین کیتوزان می‌تواند به عنوان شلاته کننده فلزات در غذا و جلوگیری از رشد توکسین در غذاها بکار رود .

[1] -Pandit et al .
[2] - Lopez-bote et al.
[3] -Natella et al.
[4] -Shahidi et al

-پینتوره و همکاران [1] (۲۰۰۲) اثر ضد میکروبی اسانس رزماری را بر لیستریا منوسیتوژنز بررسی کردند و دریافتند که با کاهش pH اثر مهارکنندگی اسانس بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

-سانچز و همکاران [2] (۲۰۰۳) اسانس رزماری و ویتامین C رابر روی گوشت اسپری کرده و تحت اشعه UV بمیزان کمی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده از مخلوطی از آنتی اکسیدانها و حضور UV سرعت تشکیل مت میوگلوبین و اکسیداسیون چربیها را کاهش داده و به همان اندازه باعث کاهش رشد باکتریها و افزایش ماندگاری گوشت از ۱۰ تا ۲۰ روز شده است .

-برت و همکاران [3] (۲۰۰۴) خواص ضد باکتری و کاربرد اسانسهای روغنی را بررسی کردند. آنها اثر چندین اسانس را بر باکتریهای *لیستریا مونوسینوژنز، سالمونلا تایفی موریم، اشرشیا کلی، شیگلا سونی* ، *باسیلوس سرئوس و استاف اورئوس* مورد مطالعه قراردادند. نتایج نشان داد که اسانس ها در pH ، حرارت و اکسیژن پایین، ثرات قویتری دارند. ضمنا در بررسی کارواکرول و پی سیمین، اثرات سینرژیستی آنها تایید شد.

-دولی قره[4] (۲۰۰۴) خواص ضد باکتری کیتوزان و برهم کنش آن با ترکیبات مواد غذایی و استفاده از آن برای پوشش مواد غذایی را بررسی کردند. آنها اثر موادی مانند نشاسته، پروتئین، نمک و روغن را روی خاصیت ضد میکروبی کیتوزان مطالعه کردند. نتایج نشان داد که نشاسته، نمک و پروتئین اثر منفی داشته و روغن هیچ تاثیری نداشته است. ضمناً اثر پوشانندگی کیتوزان را برای جلوگیری از فساد در توت فرنگی و کاهو بررسی کردند. نتایج حاصله حاکی از این بود که، خواص ضد باکتری در کاهو پس از ۴ روز ناپدید شده، ولی برای توت فرنگی تا ۱۲ روز باقی مانده است .

[1] -Pintore et al.
[2] - Sanchez et al.
[3] - Burt.
[4] - Devlieghere et al.

-بالنتین و همکاران [1] (۲۰۰۶) کاربرد اسانس رزماری را بر اکسیداسیون و رنگ در طول نگهداری گوشت بررسی کردند. یافته ها نشان داد با افزودن اسانس بالاترین میزان شاخص قرمزی بدست آمد. محتوی اکسی میوگلوبین بالا و پایین ترین میزان TBARS [2] در۱۴۴ ساعت بدست آمد.

-کوویلو و همکاران [3] (۲۰۰۷) هیدروژل های پلی ساکاریدی را برای رهایش کنترل شده اسانس استفاده کردند. هیدروژل ها خاصیت هیدروفیلیک ، شبکه پلیمری و پیوندهای شیمیایی و فیزیکی داشته که قادر به جذب مقدار زیادی آب یا مواد بیولوژیکال بوده و تکنیکهای مختلفی برای تولید آن وجود دارد. آنها از آلژینات، کاراگینان، دکستران، ژلان، پولولان، گزانتان و ... به منظور تهیه هیدروژل استفاده کردند .

-ارکان و همکاران [4] (۲۰۰۸ ) اثر آنتی اکسیدانی اسید کارنوسیک و اسید رزمارینیک موجود در اسانس رزماری را همراه با سزامول از اسانس سیاه دانه با روشهای DPPH [5]، ABTS [6] و تیوسیانات فریک بررسی کردند و دریافتند که در همه روشها، فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری بالاتر بوده است که علت این نتیجه را به ترکیبات فنولیک بیشتر در رزماری نسبت دادند.

-اوگرادی [7] (۲۰۰۹) از آنتی اکسیدانهای طبیعی چای سبز، عصاره انگور، اسانس اورگانو و اسانس رزماری برای بهبود کیفیت گوشت تازه استفاده کرد. نتیجه نشان داد که این مواد باعث افزایش ماندگاری گوشت قرمزو طیور می شود.

---

1 - Balentin et al.
2 - Thiobarbituric acid reactive substances
3 - Coviello et al.
4 - Erkan et al .
5 - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
6 - 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)
7 - O Grady et al .

-صدیق آرا و همکاران [1] (۲۰۱۰) اثرات اسانس رزماری ( ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی) را بررسی کردند و دریافتند که در بهبود ادراک و کاهش سطح گلوکز خون بسیار موثر میباشد.

- بویلاکوآ و همکاران[2] (۲۰۱۱) اثر اسانس های روغنی را در افزایش ماندگاری آبمیوه‌ها بررسی کرده و دریافتند که اسانس ها با ترکیبات فعالشان باعث جلوگیری از فساد و غیر فعال شدن میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. اثرات آنها متکی به برخی از عناصر اصلی موجود، pH محصولات، نوع و غلظت اسانس و همچنین نوع میکروارگانیسم بود .

-جیانگ و همکاران [3] (۲۰۱۱) ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی رزماری را مورد بررسی قرار دادند. ۲۲ ترکیب شناسایی شده با GC-MS روی باکتریهای گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس*) وگرم منفی (*پروتئوس ولگاریس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی*) و قارچها (*کاندیدا آلبیکانس و آسپرژیلوس نایجر*) بررسی شد و نتیجه بدست آمده مهمترین اثر ضد میکروبی را به دو ترکیب ۸و۱-سینئول و آلفا پینن نسبت داد.

-فرییرا و همکاران [4] (۲۰۱۱) نانوژل تولید شده از پولولان با مکانیسم خودبخودی که روشی ارزان و ساده است را مورد بررسی قرار دادند. پولولان اصلاح شده، با هیدروکسی متیل آکریلات یا وینیل متاآکریلات واکنش داده، سپس با هگزا دکانتیول منجر به تولید یک ماده آمفی فیلیک شده ، درنتیجه با تولید خودبخودی در آب و واکنش های زنجیره های آلکیل ، نانوژل بدست آمد.

-بیکی و همکاران [5](۲۰۱۴) اثر نانوژل کیتوزان -اسید سینامیک با اسانس نعنا را بر *آسپرژیلوس فلاووس* در گوجه فرنگی مطالعه کردند. نتایج نشان داد که با درونپوشانی اسانس نعنا در نانوژل کیتوزان-اسید سینامیک خاصیت ضد قارچی اسانس افزایش یافت .

[1] - Sedighara et al .
[2] - Bevilacqua et al.
[3] - Jiang et al.
[4] -Ferreira et al.
[5] -Baiki et al

-فتحی و همکاران[1] (۲۰۱۴) نانوکپسولاسیون مواد غذایی را با استفاده از هیدروکربن ها مطالعه کردند. آنها سرنوشت بیولوژیک چربیهای نانوحامل هیدروکربنی را طی هضم، جذب، متابولیسم و دفع مواد غذایی بررسی نمودند .

-گلشنی و همکاران[2] (۲۰۱۴) اثر ضد میکروبی اسانس رزماری را علیه پاتوژن های بیماریزا بررسی کردند و دریافتند که این اسانس بر روی *سودوموناس آئوژینوزا* و *اشرشیاکلی* موثر است. میزان MIC حدود ۶/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم /میلی لیتر و MBC[3] بین ۱۲/۵ تا ۲۰۰ میلی گرم /میلی لیتر تعیین گردید .

-بلانکو و همکاران[4] (۲۰۱۴) نانوحامل‌های ضد باکتریال را در سیستم‌های غذایی بررسی کردند. آنتی بیوتیکهای مواد غذایی ترکیبات زیست فعالی هستند که از رشد میکروارگانیسم‌ها و یا فساد و بیماری های منتقل شده از غذا جلوگیری می‌کنند. نتایج نشان داد نانوکپسولاسیون این مواد باعث محافظت عوامل ضد میکروبی از شرایط ناخواسته محیطی و ناسازگار شده است.

-ژاوه و همکاران[5](۲۰۱۵) اثرنانوژل اسید کافئیک و اسانس روغنی زیره را بر روی رشد *آسپرژیلوس نایجر* مطالعه کردند. بازدهی انکپسولاسیون حدود ٪۸۵ و میزان اسانس آزاد شده در طول یک هفته ٪۷۸ بود. نتایج نشان داد بعلت فراریت و ناپایداری اسانس زیره، درونپوشانی آن می تواند باعث بهبود و افزایش اثر آن شود.

[1] -Fathi et al
[2] -Golshani et al
[3] -Minimum Bactericidal Concentration
[4]- Blanco et al.
[5] -Zhaveh et al

-خلیلی و همکاران [1](۲۰۱۵) اثر نانوژل کیتوزان -اسید بنزوئیک حاوی اسانس آویشن را بر *آسپرژیلوس نایجر* در گوجه فرنگی بررسی کردند. نتایج، خواص ضد قارچی و افزایش عمر نگهداری گوجه فرنگی را تایید کرد.

-راوی و همکاران [2] (۲۰۱۵) نانوژل هیبریدی کیتوزان – گلیکولیپید را برای کپسوله کردن فوکوگزانتین بکار بردند و به این نتیجه رسیدند که پایداری و دسترسی زیستی فوکوگزانتین درونپوشانی شده نسبت به زمان بکار برده شده بدون نانوژل (فوکوگزانتین آزاد) افزایش قابل توجهی نشان داده است .

-نات راجان و همکاران [3] (۲۰۱۵) کیتوزان را به همراه نانو آلژینات و اسانس زردچوبه و علف لیمو استفاده کردند. نتایج نشان داد ، بدلیل ناپایداری و فرار بودن و نامحلول بودن در آب ، وقتی اندازه ذرات آن به زیر ۳۰۰ نانومتر رسید، پایداری افزایش قابل توجهی نشان داد .

-بازرگانی و همکاران[4] (۲۰۱۵) اثر آب انار بر گوشت سینه مرغ همراه با کیتوزان و اسانس را در طول مدت نگهداری بررسی کردند. پس از غوطه ورکردن گوشت در آب انار آن را با کیتوزان و اسانس پوشش داده و به مدت ۲۰ روز نگهداری کردند. بررسی‌ها نشان داد بار میکروبی (*سودوموناس، انتروباکتر، لاکتیک اسید باکتریها و باکتریهای سایکروتروفیک و همچنین قارچها* ) میزانTBA و اکسیداسیون پروتئین ها بسیار پایین‌تر از نمونه کنترل بود .

-هو و همکاران [5] (۲۰۱۵) اثر نانوذرات کیتوزان را همراه با اسانس دارچین بر روی کیفیت گوشت خوک بررسی کردند . گوشتها در بسته بندی LDPE [6] و فیلم ها با غلظت هایی از

[1] -Khalili et al
[2] - Ravi et al.
[3] -Natrajan et al.
[4] -Bazargani et al
[5] - Hu et al.
[6] -Low Density poly Ethylene

کیتوزان و اسانس پوشش داده شده بود . نگهداری در دمای ۴ °C سانتی گراد و بمدت ۱۵ روز بود. نتایج بیشترین میزان شاخص قرمزی را برای همه تیمارها نشان داد .

-پارابهاران [1] (۲۰۱۵) فعالیت زیستی کیتوزان و مشتقات آن را بررسی کرد. مشتقات کیتوزان در وزن مولکولی کم ، متوسط و زیاد ساخته شد. نتایج تحقیق خواصی نظیر تغییر پذیری زیستی ، ضد میکروبی ،ضد التهابی و ترمیم بافت را در کیتوزان و هر سه مشتق آن تایید کرد .

- کارامان و همکاران [2] (۲۰۱۵) اثر اسانس رزماری و بسته بندی در اتمسفر اصلاح شده را روی کیفیت گوشت طیور بررسی کردند. نتایج حاصله نشان داد که افزودن ٪۱۲ اسانس رزماری به فیله های گوشت باعث کاهش کلونی های *سالمونلا تایفی موریم و لیستریا مونوسینوژنز* شده ولی اندازه کلونی ها را کاهش نداده، همچنین باعث کاهش روشنایی و افزایش قرمزی گردید. اضافه کردن اسانس همراه با MAP کاهش میزان اکسیداسیون چربی را در پی داشت .

- آرانزو همکاران (۲۰۱۵) [3] بهبود دسترسی زیستی اسانس رزماری کپسوله شده را در سیستم های مختلف بررسی کرده و دریافتند که ٪ ۹۷-۸۱ باعث حفظ اسید کارنوسیک و افزایش دسترسی زیستی آن شده که کارایی آن را در فرمولاسیون مواد غذایی قابل توجه نموده است.

- پساونتو و همکاران [4] (۲۰۱۵) خاصیت ضد باکتری اسانس رزماری، اورگانو و آویشن را بر روی باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز* در گوشت قرمز بررسی

[1] - Parabaharan.
[2] - Kahraman et al.
[3]- Arranz et al.
[4]-Pesanento et al.

کردند. مدت نگهداری ۱۴ روز و درجه حرارت $4\ ^{\circ}C$ بود. بعد از پختن، گوشت حاوی ٪ ۰/۵ اسانس دارای طعم قابل قبول بود و باعث کاهش بار میکروبی ($10^{2}$ CFU /g) شده بود.

-هو و همکاران[1] (۲۰۱۵) اثرات نانو ذرات کیتوزان همراه با اسانس دارچین را بر کیفیت گوشت خوک بررسی کرد. سه نانوذره از کیتوزان با اندازه های ۱۱۲ ، ۲۱۵ و ۵۲۷ نانومتر تهیه شد. نتایج حاصله بالاترین کیفیت را در شاخص قرمزی گوشت با نانو ذره ۵۲۷ نانومتری نشان داد.

-مریم و همکاران[2] (۲۰۱۵) اثر نانوکپسولاسیون اسانس آویشن را بر فعالیت ضد میکروبی آن بررسی کردند. آنها اثر نانوژل کیتوزان – بنزوئیک حاوی اسانس آویشن را بر باکتریهای *سالمونلا تایفی موریم* ، *یرسینیا پستیس*، *شیگلاسونی*، *لیستریامونوسیتوژنز* و *آسپرژیلوس نایجر* بررسی کردند که نتایج حاکی از افزایش خواص ضد باکتری و قارچی نانوژل مربوطه بود .

-مازارینو و همکاران[3] (۲۰۱۵) اثر اسانس‌های روغنی را بر غیر فعال شدن *سالمونلا انتریکا* و *لیستریا مونوسینوژنز* بررسی کردند. آنها از ۲۰ اسانس مختلف استفاده کرده ودریافتند که اسانس-ها اثر باکتری‌کشی خوبی دارند و در غلظت‌های پایین باکتریواستاتیک هستند . همچنین بعنوان یک نگهدارنده دو کاره: آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان محسوب میشوند .

-محمدی و همکاران[4](۲۰۱۵) اثر اسانس آویشن درونپوشانی شده همراه با کیتوزان را بر روی کپک *بوتریتیس سینرا* در توت فرنگی بررسی کردند . نتایج نشان داد که شدت و میزان این کپک کاهش و ماندگاری توت فرنگی در$4\ ^{\circ}C$ از ۷ روز به ۱۰ روز افزایش یافت.

[1] -Hu et al.
[2] - Maryam et al.
[3] - Mazzarion et al.
[4] -Mohammadi et al

- لکجینک[1] (۲۰۱۶) اثر کیتوزان را با اسانس میخک و بدون اسانس بر روی سوسیس در طول مدت نگهداری بررسی کردند. طول مدت آزمایش ۲۵ روز بود. نتایج نشان داد ، شمارش کلی باکتریها، شاخص روشنایی، شاخص پراکسید و اسید تیوباربیتوریک افزایش و شاخص قرمزی، زردی، و pH کاهش یافته بود. این تغییرات برای کیتوزان همراه با اسانس آهسته تر بود.

-آلیک و همکاران [2](۲۰۱۶) اثر نانوژل‌های پلی ساکاریدی را در سیستم تحویل دارو بررسی کردند که نتایج خوبی در درمان سرطان بدست آوردند .

-اولیویرا و همکاران [3](۲۰۱۶) روش استخراج را بر ویژگیهای دو ماده مهم اسانس رزماری (اسید کارنوسیک و رزمارینیک ) بررسی کردند . با زمان ۵۵/۲-۴/۸ دقیقه و حلال اتانول، نمونه ها HPLC [4] شدند و نتایج بدست آمده نشان داد که میزان ٪۷۰ حلال و زمان ۵۵ دقیقه باعث افزایش خواص آنتی اکسیدانی اسانس به میزان ٪۸۹/۸ شد. این مقدار ۴/۷۵ برابر بیشتر از سایر روش میزان آنتی اکسیدان را افزایش داد .

-باربوساو همکاران [5](۲۰۱۶) اثر اسانس رزماری و اورگانو را در کنترل باکتری *اشرشیا کلی* و *لیستریا* در سبزیجات برگی بررسی نمودند. نتایج نشان داد که اسانس‌ها هر کدام به تنهایی و یا در ترکیب با هم ، شمارش کلی باکتری و باکتریهای مزوفیل، انتروباکتر و قارچها را کاهش داده و باعث افزایش عمر ماندگاری سبزیجات شده است .

-قبرایی و همکاران [6](۲۰۱۶ ) اثرات ضد میکروبی اسانس دارچین در برابر ۵ باکتری و اثر آن روی کیفیت حسی گوشت را مطالعه نمودند. نتیجه اثر ضد میکروبی اسانس را بر

[1] -Lekjing .
[2]- Alhaique et al.
[3]-Oliveira et al.
[4] -High Performance Liquid Chromatography
[5] -Barbosa et al.
[6] -Ghabraie et al

باکتریهـای بیمـاریزا ( *اشرشـیا کلـی، لیسـتریا مونوسـیتوژنز، اسـتافیلوکوکوس اورئـوس، سـالمونلا تـایفی مـوریم*) و بـاکتری عامـل فسـاد ( *سـودوموناس آئروژینـوزا* ) تاییـد کـرد. ضـمناً در ارزیـابی حسی میزان ٪۰/۰۵ اسانس در گوشت پخته شده بالاترین میزان پذیرش را داشت.

- سیلوا و همکاران [1](۲۰۱۶) کاربرد اثرات نگهدارنده‌ها را بررسی کردند. آنها دریافتند که اسید بنزوئیک بعنوان نگهدارنده و آنتی اکسیدان، در غشاء سلول فعالیت کرده و باعث جلوگیری از عمل آنزیم‌های چرخه اسید سیتریک و فسفوریلاسیون اکسیداتیو میشود .همچنین نمکهای فلزی آن در آبمیوه‌ها مورد استفاده قرار می گیرد.

[1] - silva et al.

فصل سوم

# مواد و روش ها

در این فصل، مواد مورد استفاده، تجهیزات و دستگاه ها و روشهای انجام شده درتولید نانوژل و اثرضد باکتریایی اسانس خالص و درونپوشانی شده درماندگاری گوشت قرمز طی دوره نگهداری دریخچال بررسی خواهد شد.اکثر مراحل انجام این تحقیق در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گردیده است .

## ۳-۱ مواد مورد استفاده در این تحقیق

- اسانس رزماری (شرکت باریج اسانس، ایران)
- گوشت گاو تازه ( خریداری شده از فروشگاه محلی )
- سرم فیزیولوژی استریل، محیط کشت مولر هینتون آگار و آبگوشت مغذی ( شرکت Biolife، ایتالیا )؛
- محیط کشت ائوزین متیلن بلو( EMB)، توین ۸۰، اتانول، گلیسرول، اسید استیک و اسید بنزوئیک (شرکت مرک، آلمان)
- متانول (شرکت کیان کاوه آزما )
- سوش باکتریایی *سالمونلا تایفی موریم* ( موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی اراک )
- ۱و۲- دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل ( DPPH)
- کیتوزان و ۱-اتیل-۳- ( ۳- دی متیل آمینو پروپیل) کربو دی ایمید (EDC ) ( شرکت سیگما-آلدریچ، آلمان)

در جدول (۳-۱) مشخصات اسانس رزماری استفاده شده در این تحقیق نشان داده شده است.

جدول( ۳-۱) مشخصات اسانس رزماری استفاده شده در این تحقیق

| ردیف | آزمایشات | | مقدار قابل قبول | نتایج |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | رنگ | | بی رنگ متمایل به زرد کم رنگ | زرد |
| ۲ | شفافیت | | روشن | روشن |
| ۳ | بو | | مخصوص رزماری | مخصوص رزماری |
| ۴ | وزن مخصوص (گرم/میلی لیتر) | | ۰/۸۹۵-۰/۹۲۰ | ۰/۸۹۶ |
| ۵ | ضریب شکست | | ۱/۴۶۴-۱/۴۷۳ | ۱/۴۶۶۹ |
| ۶ | چرخش نوری | | ۸ - +۵- | ۸/۶۴ |
| ۷ | ترکیبات | آلفا پینن (٪) | ۱۸-۲۶ | ۲۳/۶۷ |
| | | بتا پینن (٪) | ۲-۶ | ۱/۱۴ |
| | | بورنئول (٪) | ۲-۴/۵ | ۶/۵۰ |
| | | پی سیمن (٪) | ۱-۲/۲ | ۱/۴۷ |
| | | لیمونن (٪) | ۲/۵-۵ | ۴/۲۸ |
| | | سینول (٪) | ۱۶-۲۵ | ۱۱/۰۴ |
| | | کامفور (٪) | ۱۳-۲۱ | ۷/۶۸ |

## ۳-۲ تجهیزات مورد استفاده در این تحقیق

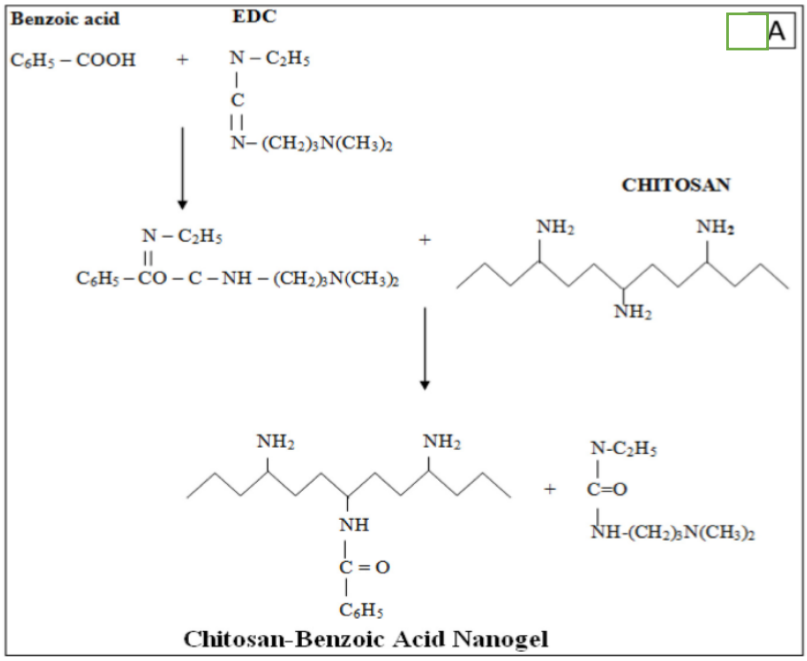
- ترازوی دیجیتال ، مدل AT261 با دقت ۰۰۱ /۰ گرم (شرکت Mettler، سوئیس )
- ترازوی دیجیتال ، مدل PG603-S بادقت ۰/۰۰۰۱ گرم (شرکت Mettler، سوئیس )
- دستگاه هموژنایزر T 18- BASIC (شرکت IKA ، آلمان )
- دستگاه اسپکتروفتومتر مدل 2100 (شرکت Unico، آمریکا )
- همزن مغناطیسی (شرکت AEG، آلمان)
- اتوکلاو مدلST3028 (شرکت Dixons ,ایتالیا)
- انکوباتور INB 400 (شرکت Memmert ، آلمان)

- هود میکروبی
- دستگاه سونیکاتور پروبی ( Qsonica ،آمریکا )
- دستگاه سونیکاتور حمامی ( Elma ،آلمان )
- دستگاه اسپکتروفتومتر ( Shimatzu ،ژاپن )
- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) (مدل XL30) ( Philips ،سوئیس)
- سانتریفوژ مدل 3-16 L (شرکت Sigma ، آمریکا)
- دستگاه FT-IR مدل ۴۳۰ ( Jascow ، ژاپن )
- pH متر مدل ۲۳۰( Testo، آلمان )

## ۳-۳ تهیه نانوژل کیتوزان با اسید بنزوئیک

برای تهیه نانوژل، مقدار ۳/۱۲۵ مول کیتوزان به ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک (۰/۰۱ نرمال ) افزوده شد. مخلوطی از ۱/۵۶۲ مول پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و۴/۶۸۶ مول EDC در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل شده و به آهستگی به محلول کیتوزان اضافه گردید. مخلوط آماده شده بمدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگه داشته شد. pH لازم برای این کار ۹-۸/۵ بود که با افزودن سود (۰/۱ نرمال) بدست آمد. پس از ۲۴ ساعت رسوب سفید نانوژل با اتانول ۳ مرتبه شسته شد و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. ذرات نانوژل تشکیل شده در اسید استیک، با فیلتراسیون (اندازه مش ۰/۲ نانومتر) جدا شدند (Khalili et al., 2015).

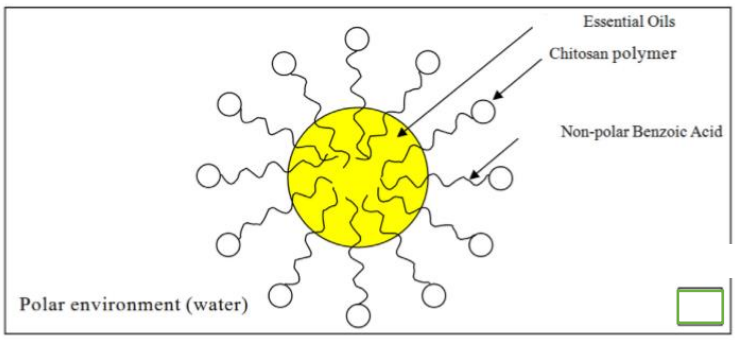
در شکل (۳-۲) مراحل واکنش بین بنزوئیک اسید و پلیمر کیتوزان نشان داده شده است.




شکل (۳-۱)- شکل شماتیک واکنش بین بنزوئیک اسید و کیتوزان با حضورEDC

## ۳-۴ درونپوشانی اسانس رزماری در نانوژل کیتوزان –اسید بنزوئیک

ابتدا اسانس رزماری در اتانول به نسبت حجمی/حجمی (۱:۱) حل شده و سپس با نانوژل مخلوط گردید. برای تهیه اسانس درونپوشانی شده نسبت ۱۰۰۰۰ میلی گرم/لیتر نانوژل و ۵۰۰۰ میلی گرم/لیتر اسانس استفاده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه تحت اولتراسوند پروبی ( ۷۰KHZ) قرارگرفت. در شکل (۳-۳) تصویر شماتیکی از اسانس درونپوشانی شده و موضع گیری زنجیرهای کیتوزان نشان داده شده است.




شکل (۳-۲) - شماتیک اسانس درونپوشانی شده و موضع گیری زنجیرهای کیتوزان

تعیین کارائی درون پوشانی با تعیین میزان اسانس رزماری درونپوشانی نشده توسط ثبت طیف جذبی حداکثر رزماری (۲۴۰ نانومتر) با استفاده از طیف سنج (Shimadzu، ژاپن) انجام شد. قرائت طیف محلول پس از رسوب نانوژل توسط سانتریفیوژ (g× ۱۰۰۰۰ ، ۱۵ دقیقه) انجام شد.

### ۳-۵ طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)[1]

برای تأیید اتصال کووالانسی گروه های کربوکسیل اسید چرب به گروه های آمین آزاد کیتوزان از FT-IR استفاده شد. برای این منظور از کیتوزان و نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید طیف FT-IR تهیه شد. برای تهیه طیف ابتدا از هردو ترکیب فیلم های خشک شده تهیه شد و سپس با ۱۰۰ میلی گرم برمید پتاسیم مخلوط و به صورت قرص تبدیل شد. سپس طیف مواد با استفاده از اسپکترومتر FT-IR-430 (Jasco,Tokyo, Japon) در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد و در محدوده $cm^{-1}$ ۴۰۰۰-۵۰۰ ثبت گردید(Khalili et al., 2015).

### ۳-۶ مورفولوژی و سایز نانوژل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)[2]

مورفولوژی نانوژل کیتوزان – اسید بنزوئیک با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی فیلیپس XL30 مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور یک قطره از نانوژل تازه رقیق شده روی برچسب کربن ریخته شد، و سپس در معرض هوا خشک و در ادامه نمونه با طلا پوشش داده شد. سپس ویژگی های مورفولوژی نانوژل کیتوزان- اسید بنزوئیک توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی با ولتاژ ۱۰ کیلو وات مورد بررسی قرار گرفت (Khalili et al ., 2015)

### ۳-۷ بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری، نانوژل و نانوژل حاوی اسانس

تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق آزمون DPPH و بوسیله معرف ۲و۲ – دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل انجام شد. شرایط کار به این صورت بود که غلظتهای متفاوتی از اسانس و نانوژل و نانوژل حاوی اسانس با ۳ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار معرف مخلوط و در تاریکی نگهداری شد. پس از

[1] - Fourier Transform Infrared Spectroscopy
[2] -Scanning Electron Microscope

۳۰ دقیقه اولین جذب نوری آن در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. سپس در ساعتهای متوالی چندین بار جذب خوانده شد و روند تغییر رنگ نمونه ها بررسی گردید. در ادامه درصد فعالیت آنتی اکسیدانی از رابطه زیر محاسبه شد (Hataminia et al., 2014).

معادله (۳-۱)- محاسبه درصد فعالیت آنتی اکسیدانی

$$\text{درصد فعالیت آنتی اکسیدانی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} * 100$$

### ۳-۸ تهیه استاندارد نیم مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون باکتری با رقت مناسب، ازاستاندارد نیم مک فارلند استفاده شد. به منظور تهیه استاندارد نیم مک فارلند، ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۰۴۸ مولار کلرید باریم به ۹۹/۵ میلی لیتر اسید سولفوریک۰/۳۶ نرمال اضافه و تا به دست آمدن محلول همگن، بطور مداوم همزده شد. سپس دانسیته نوری محلول در ۶۲۵ نانومتر بررسی گردید که معادل ۰/۱۳-۰/۰۸ باشد. از این محلول۶-۴ میلی لیتر در لوله های درپوش دار ریخته شد و در جای تاریک نگهداری گردید (Mahon and Manuselis.,1995).

### ۳-۹ آماده سازی سوسپانسیون باکتریایی

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری در حد CFU /ml $۱۰^{۸}$ ×۱/۵برای تلقیح روی سطح گوشت، ۱ میلی لیتر از سوش میکروبی یک شبه را به لوله حاوی ۹ میلی لیتر آبگوشت مغذی منتقل کرده و کدورت آن پس از ۲۴ ساعت با استاندارد نیم مک فارلند مقایسه گردید (Mahon and Manuselis.,1995).

### ۳-۱۰ تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MBC)

در تعدادی لوله آزمایش محیط کشت نوترینت براث به میزان ۹ میلی لیتر ریخته و۱میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری آماده شده به آن اضافه شد. غلظتهای متفاوتی از اسانس رزماری، نانوژل و اسانس درونپوشانی شده در نانوژل تهیه وبه محتوی لوله ها افزوده شد. به همراه تیماره ها یک لوله کنترل

مثبت و یک لوله کنترل منفی هم تهیه شد. کنترل مثبت شامل (عصاره همراه با محیط کشت ) و کنترل منفی شامل (میکروب و محیط کشت ) بود. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کدورت لوله ها مورد بررسی قرارگرفت. در لوله ای که هیچ کدورتی مشاهده نشد، آن غلظت بعنوان MIC تعیین گردید. از غلظتهایی که در لوله مربوط به آن کدورت باکتریایی مشاهده نشد، روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده و سپس دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. چنانچه تا ۵ روز در پلیتی هیچ باکتری رشد نکرد، غلظت مربوطه بعنوان MBC معرفی خواهد شد (Mahon and Manuselis., 1995) .

### ۳-۱۱ تهیه نمونه های گوشت گاو جهت نگهداری در دمای یخچال

پس از تهیه گوشت تازه گاو، نمونه ها در اندازه های ۱۰ گرمی برش داده شد. برای نابودی میکروبهای سطحی، نمونه ها بمدت ۲۰ دقیقه تحت اشعه ماورای بنفش زیر هود میکروبی قرارگرفتند (شکل ۳-۳).

شکل(۳-۳ )- نمونه های گوشت برش داده شده زیر هود میکروبی

پس از اتمام مدت زمان قرارگیری نمونه ها تحت اشعه ماورای بنفش، تمامی نمونه ها توسط ۱میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند. سپس نمونه ها بترتیب توسط اسانس رزماری با غلظت ۰/۱ درصد و نانوژل حاوی اسانس رزماری در سه غلظت ۰/۰۵ ، ۰/۱ و ۰/۲ پوشش داده شد. در پایان تیمارها به همراه نمونه شاهد در بسته های استریل قرار داده و در دمای۴°C( یخچال)، تا زمان انجام آزمون نگهداری شدند. روزهای آزمون شامل روز یکم، چهارم، هشتم و دوازدهم بود (Mazhar et al .,2014) .

### ۳-۱۲-آزمون اندازه گیری بار میکروبی نمونه های گوشت

پس از باز کردن بسته های استریل در روز مورد نظر، نمونه ها با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شسته و سپس توسط هموژنیزاتور بمدت ۳-۲ دقیقه همگن شد. در لوله های آزمایش حدود ۹ سی سی سرم فیزیولوژی استریل ریخته و ۱ سی سی از این محلولها به هریک ازلوله ها افزوده شد. از هر نمونه رقتهای ۱ تا ۱۰ تهیه و چند رقت آخر برروی محیط جامد مولر هینتون آگار و ائوزین متیلن بلو کشت داده شد. پلیتهای کشت داده شده بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و سپس شمارش کلونی انجام شد (Ortuno et al., 2014) .

### ۳-۱۳ آزمون pH نمونه های گوشت

پس از باز کردن بسته های استریل در روز مورد نظر، نمونه ها با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شسته شد و سپس توسط هموژنیزاتور بمدت ۳-۲ دقیقه همگن شد. سپس pH محلول همگن توسط pH متر(مدل Testo 230) اندازه گیری شد ( Ortuno et al., 2014) .

### ۳-۱۴ بررسی میزان رنگ نمونه ها در روزهای مختلف

با استفاده از دستگاه رنگ سنج (ساخته شده در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود)، رنگ نمونه ها در روزهای مورد نظر بررسی شد. ابتدا توسط دوربین دیجیتال از نمونه ها و کارت استاندارد عکس گرفته شد. سپس شاخص زردی(b*)، روشنایی(L*) و قرمزی (a*) نمونه ها با استفاده از نرم افراز فتوشاپ تعیین شد.

### ۳-۱۵ آنالیز آماری

تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد. میانگین و انحراف استاندارد (SD) با استفاده از نرم افزار مایکروسافت اکسل محاسبه شد. آزمون چند دامنه دانکن برای مقایسه اختلاف در سطح ۵ درصد با نرم افزار SPSS 16.0 انجام شد.

فصل چهارم

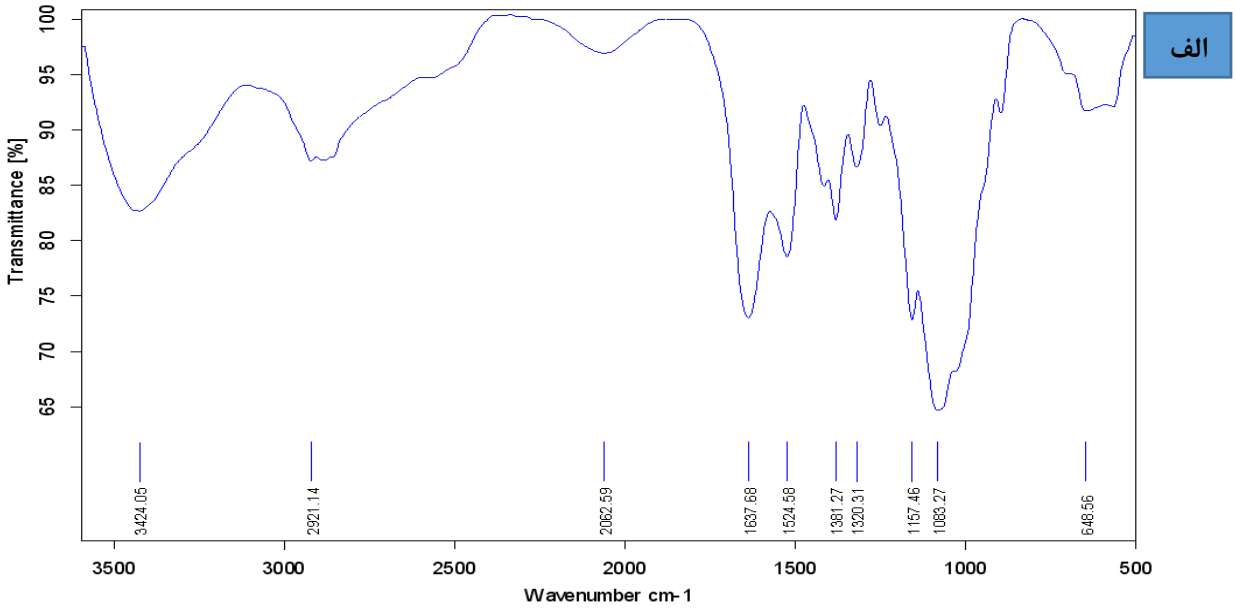
# نتایج و بحث

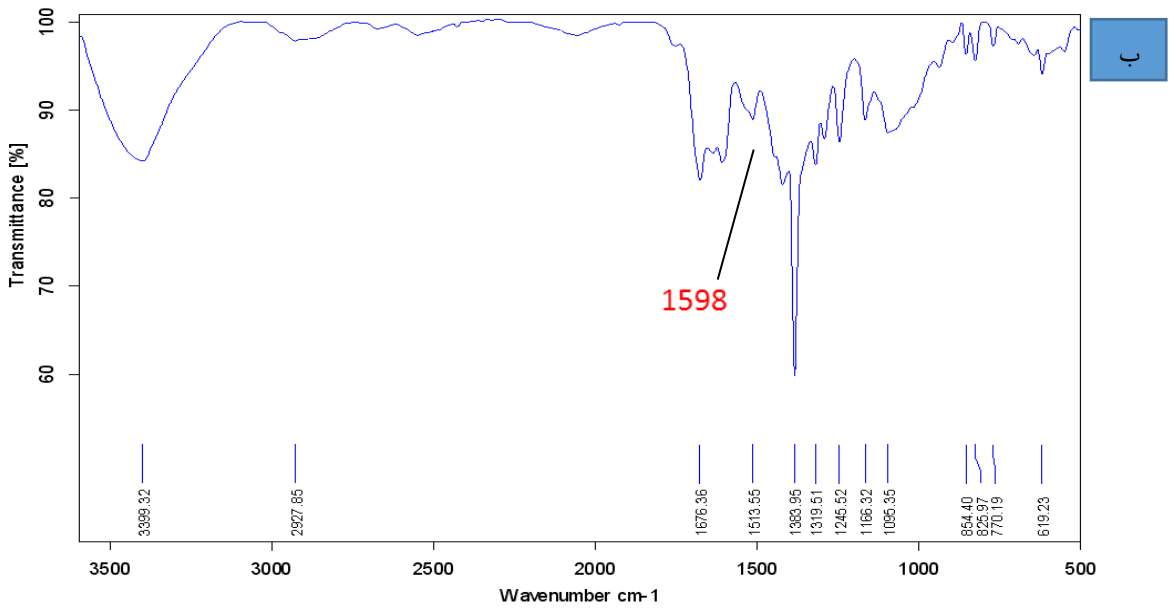
## نتایج و بحث

### ۴-۱ ویژگیهای نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید تولید شده

در مرحله اول این تحقیق نانوژل با مکانیسم خود تجمعی، با استفاده از کیتوزان اصلاح شده تهیه گردید. به منظور اصلاح کیتوزان، قسمتی از گروههای آمینوی آزاد کیتوزان به گروه های کربوکسیل بنزوئیک اسید با استفاده از حد واسط EDC متصل شدند. به منظور تایید باند ایجاد شده بین گروه آمین کیتوزان و کربوکسیل بنزوئیک اسید طیف سنج FT-IR استفاده شد.

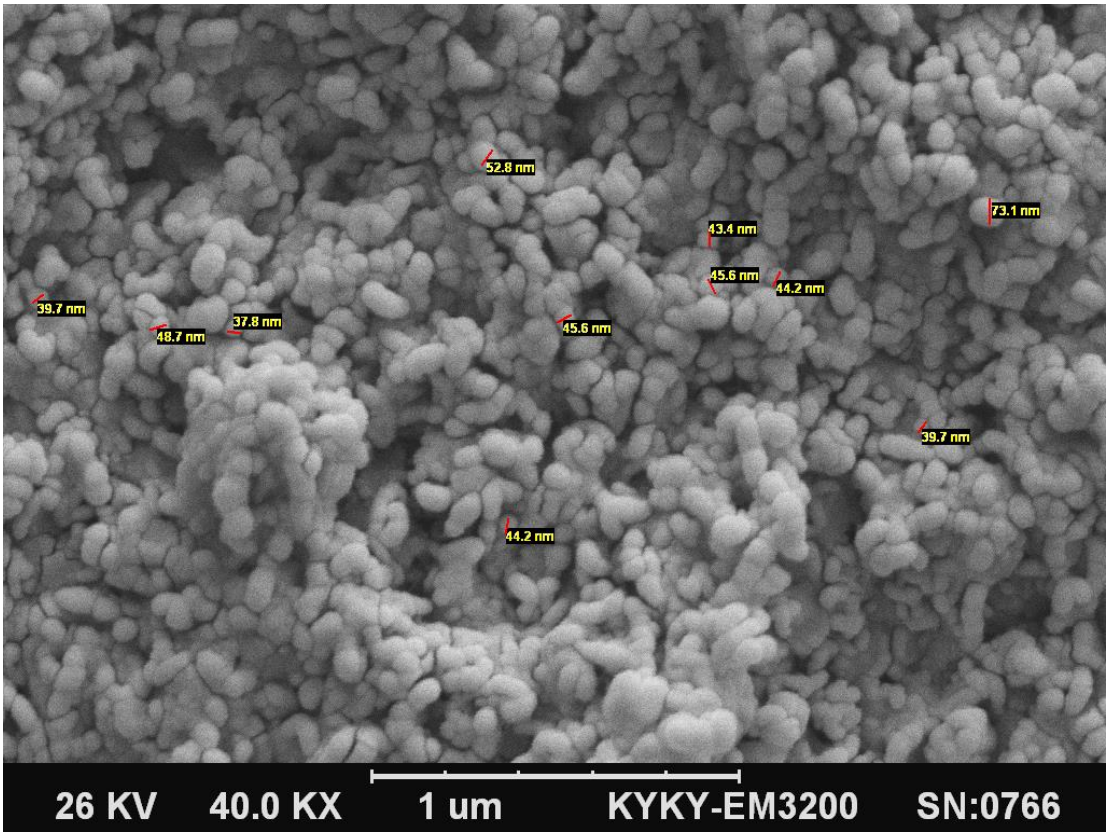
در شکل (۴-۱) الف - طیف FT-IR کیتوزان و ب- طیف FT-IR نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید نشان داده شده است. در طیف کیتوزان- بنزوئیک اسید، پیک کششی مشاهده شده در حدود $cm^{-1}$ ۱۵۹۸تشکیل پیوند آمید را تأیید می کند.






شکل( ۴-۱)( الف ) طیف FT-IR کیتوزان - (ب) نانوژل کیتوزان - بنزوئیک اسید

عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی(SEM) نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید در شکل (۴-۲) نشان داده شده است. عکس SEM نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید نشان می‌دهد که مورفولوژی نانوژل ها تقریباً کروی و اندازه این ذرات حدود ۵۰ نانومتر است. اتصال اسید چرب پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید غیرقطبی به پلیمر کیتوزان قطبی و قرار گرفتن کمپلکس در یک محیط قطبی باعث تجمع سرهای غیرقطبی به داخل و سرهای قطبی به خارج و تشکیل یک ساختار مجتمع تقریباً کروی شکل گردید. این تصویر همچنین یکنواختی نانوساختارهای ایجاد شده را نشان می‌دهد.




شکل (۴-۲)- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید

کیتوزان یک پلیمر سازگار بیولوژیکی است که هیچ واکنش آلرژی‌زایی ندارد. بعلاوه از متابولیسم آن مواد غیر سمی نظیر قندهای آمینی تولید میشود، که کاملاً توسط بدن قابل جذب میباشند. مطالعات زیادی در مورد فرمولاسیون نانو/میکروژل کیتوزان با استفاده از پیوند دهنده های عرضی مختلف گزارش شده است(Lee et al., 2012 ; Nasti et al., 2009).

برای مثال نستی و همکاران[1]( ۲۰۰۹ ) از پلیمر کیتوزان نانو ذراتی در مقیاس۱۶۰ و۲۶۰ نانومتر با استفاده از اتصالات جانبی تری پلی فسفات ساختند. همچنین گزارش آنها مبین یونی بودن پیوندهای عرضی بین این نانوذرات بود. در مطالعه دیگری توسط لی و همکاران[2]( ۲۰۱۲) از پلیمر کیتوزان و آلژینات، با استفاده از اتصال دهنده جنیپین، هیدروژلی در مقیاس ۲ میکرومتر تولید گردید.

[1] - Nasti et al.
[2] -Lee et al.

در مطالعه پوجانا و همکاران[1] (۲۰۱۳) از پلیمر کیتوزان و گلیکول با استفاده از روش تولید خودبخودی نانوژلی در ابعاد ۲۰۰ نانومتر تهیه شد. این محققین بیان داشتند که اثرات آب گریزی/آب دوستی در تشکیل میسل ها بسیار مهم بوده و مناسبت ترین مکانیسم برای شکل گیری میسل ها می باشد.

با مقایسه اندازه ذرات حاصل از این تحقیق با کارهای قبلی (Lee et al., 1998 ; Kwon., 2003 ; Barka et al., 2004 ; Nasti et al.,) اندازه ذرات نانو ژل کیتوزان- اسید بنزوئیک حاصل در این مطالعه کوچکتر و یکنواختر بود که مزیت این روش را نسبت به تحقیق‌های انجام شده تا کنون نشان میدهد و این تفاوت می- تواند به چندین عامل نسبت داده شود؛

- اول، فراصوت اولیه زنجیره طولانی کیتوزان را به قطعات کوچکتر تبدیل کرد که مانع از شکل گیری نانوژل بلند زنجیر شد.
- عامل دوم می توان به نقش مهم فراصوت مجدد در کاهش اندازه ذرات اشاره کرد .
- عامل سوم نیز عبور نانوژل از درون فیلتر بود.

## ۴-۲ بررسی کارایی درونپوشانی اسانس رزماری توسط نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید

نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید تولید شده حاوی یک لایه آب دوست و یک هسته آب‌گریز بود که برای درونپو شانی ا سانس رزماری (آب‌گریز) و بد ست آوردن رهایش کنترل شده ا سانس بکار رفت. بازدهی درونپوشانی توسط دانسیته نوری اسانس رزماری اندازه گیری شده که نتایج راندمان درونپوشانی حدود٪۸۰ را نشان داد.

خلیلی و همکاران (۲۰۱۵) میزان کارائی درونپوشانی اسانس آویشن در نانوژل کیتوزان را ٪۸۷ گزارش نمودند. در تحقیق ژاوه و همکاران (۲۰۱۵) میزان کارائی درون پوشانی اسانس زیره سبز در نانوژل

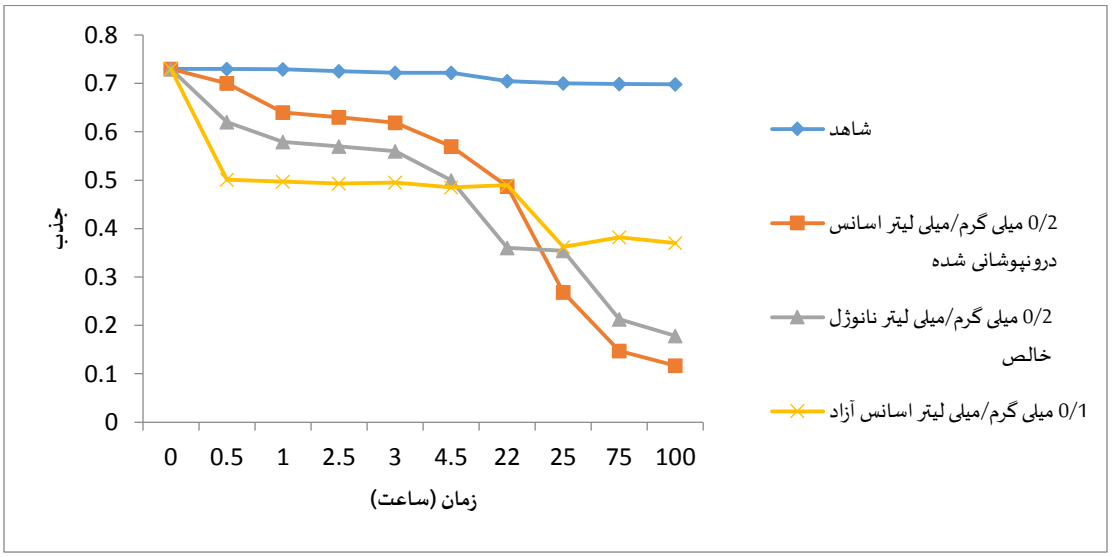
[1] -Pujana et al.

کیتوزان ٪۸۵ گزارش شـد. اختلاف ناشـی در میزان کارائی درونپوشـانی در تحقیقات مختلف میتواند ناشی از تفاوت در اسانس‌های مورد استفاده و همچنین نوع نانوژل و شرایط درونپوشانی باشد.

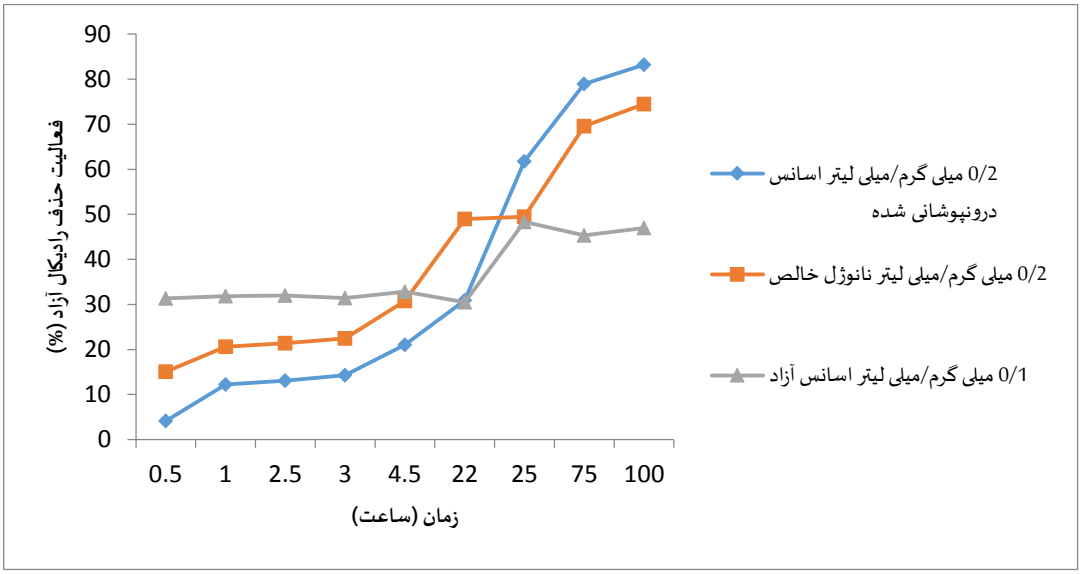
## ۴-۳ فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد اسانس رزماری، نانوژل کیتوزان –بنزوئیک اسید و اسانس رزماری درونپوشانی شده

۲و۲- دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک رادیکال پایدار است، که حداکثر جذب آن در ۵۱۵ نانومتر است و می تواند بسرعت با یک آنتی اکسیدان احیاء شود. این روش استفاده گسترده ای در اندازه گیری میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد ترکیبات مختلف دارد (Roby et al.,2013 ; Hatamnia et al., 2014; Moo-Huchin et al., 2015)

ناپدید شدن پیک جذب نوری رادیکال DPPH در ۵۱۵ نانومتر، نتیجه عمل آنتی اکسیدانی ترکیبات موجود در محلول است. کاهش میزان جذب به عنوان معیاری از فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مورد آزمایش در نظر گرفته می‌شود. در شکل (۴-۳) میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر نمونه های اسانس رزماری، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده در زمانهای مختلف نگهداری نشان داده شده است.




شکل (۴-۳)- میزان جذب نمونه های اسانس رزماری، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده در زمانهای مختلف نگهداری




شکل(۴-۴)- فعالیت حذف رادیکال آزاد نمونه های اسانس رزماری، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده در زمانهای مختلف نگهداری

با توجه به شکل (۴-۳)، میزان جذب نمونه های مختلف در طول زمان نگهداری کاهش پیدا کرده است، اما جذب نمونه شاهد که فقط حاوی رادیکال آزاد DPPH است تقریباً در طول مدت نگهداری در تاریکی ثابت باقی مانده است. نتایج شکل (۴-۳) نشان می‌دهدکه کاهش جذب در نمونه‌های مختلف در طول زمان نگهداری مربوط به ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در محلول است و اگر محلول DPPH در شرایط مناسب نگهداری شود تا چند روز تغییری در جذب آن بوجود نمی‌آید.

در شـــکل (۴-۴) فعالیت حذف رادیکال آزاد نمونه ها که در واقع معیاری از فعالیت آنتی اکســـیدانی ترکیبات است در زمانهای مختلف نگهداری نشان داده شده است. لازم به ذکر است که در بسیاری از مطالعات، در روش DPPH فعالیت آنتی اکسیدانی تنها پس از ۳۰ دقیقه گزارش شده، ولی با توجه به روند اکسیداسیون پیچیده برخی از ترکیبات، واکنش‌ها باید بیشتر از آنچه گزارش شده ادامه یابد.

به عنوان مثال اوزگن و همکاران[1] (۲۰۰۶) اســـتدلال کردند که زمان واکنش ۶۰ دقیقه ممکن اســـت تنها متوسط فعالیت مهارکنندگی یک آنتی اکسیدان را ارائه کند و ظرفیت مطلق آن را نشان نمی‌دهد.

[1] -Ozgen et al

این مساله براحتی در مورد اسید آسکوربیک قابل تشخیص است. واکنش این آنتی اکسیدان در گزارش های مختلف و در سنجش-های متفاوت پس از ۱ دقیقه به تعادل رسیده و جای تعجب نیست که این امر بعلت داشتن تنها یک گروه هیدروکسیل می‌باشد.

در حالیکه برای ترکیباتی با چندین گروه هیدروکسیل و یا مخلوط پیچیده‌ای از آنتی اکسیدانها زمان واکنش طولانی‌تری به منظور تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی آنها مورد نیاز است. در استاندارد سازی روشهای اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی، از آنتی اکسیدان‌های ساده مانند ترولکس و آسکوربیک اسید که بسرعت به نقطه پایان واکنش می‌رسند استفاده می‌شود.

بعضی از ترکیبات سینتیک پیچیده‌ای دارند و پس از چندین ساعت یا روز به نقطه پایان می‌رسند. با این وجود اکثر آنتی اکسیدانها پس از ۱۲۰ ساعت به نقطه تعادل رسیده و در نزدیکی این نقطه ظرفیت آنتی اکسیدانی آنها ظاهر میشود (Erel., 2004).

با توجه به شکل (۴-۴) در زمان اولیه نگهداری، فعالیت مهارکنندگی اسانس خالص رزماری بالاتر از نانوژل و نانوژل درونپوشانی شده بود. پس از ادامه واکنشها، اسانس بعد از ۲۵ ساعت به حالت پایدار رسید ولی در مورد تیمار نانوژل و اسانس درونپوشانی شده حتی پس از ۱۰۰ ساعت هم حالت پایدار مشاهده نشد. در پایان دوره نگهداری فعالیت نانوژل درونپوشانی شده بالاتر از بقیه تیمارها بود، که این تفاوت می‌تواند بعلت آزاد شدن آهسته اسانس رزماری از نانوژل به محیط اطراف آن و خاصیت سینرژیستی کیتوزان با اسانس باشد .

قابل ذکر است که غلظت اسانس مورد استفاده در حالت آزاد و درونپوشانی شده یکسان بود و این نتایج نشان داد که نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید باعث شد که فعالیت آنتی اکسیدانی اسانس رزماری به صورت تدریجی ظهور پیدا کند.

## ۴-۴- آزمون برون تنی[1]: میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس رزماری، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده

میزان MIC و MBC برای اسانس، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده در جدول (۴-۱) نشان داده شده است.

جدول(۴-۱)- میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس رزماری، نانوژل و اسانس رزماری درونپوشانی شده در مقابل باکتری *سالمونلا تایفی موریم*

| | MIC (میکروگرم/میلی لیتر) | MBC (میکروگرم/میلی لیتر) |
|---|---|---|
| اسانس رزماری | ۱۰۰ | ۲۰۰ |
| نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید | ۱۰ | ۲۰ |
| اسانس رزماری درونپوشانی شده | ۵ | ۱۰ |

با توجه به جدول (۴-۱) MIC وMBC اسانس رزماری در مقابل باکتری *سالمونلا تایفی موریم* بترتیب ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم /میلی لیتر بدست آمد.

بسیاری از مطالعات قبلی خاصیت ضد باکتری اسانس رزماری را در برابر باکتریهای بیماریزایی چون *اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و سالمونلا تایفی موریم* تایید کرده است (Nair et al., 2015; Clemente et al., 2016; Bhargava et al., 2015) ; این فعالیت ضد باکتری به عوامل فعال اسانس نظیر ترپن‌ها، فنل ها و آلدئیدها نسبت داده می‌شود، که بعلت طبیعت آب‌گریز این ترکیبات و تاثیر بر اسیدهای چرب غیر اشباع غشاء باکتری منجر به تغییر شکل غشاء می‌شوند (Severino et al., 2015). ترکیبات فنلی بعنوان یک ناقل پروتون در لایه های لیپیدی عمل می‌کنند که این باعث از دست رفتن نیروی محرکه پروتون غشاء می‌شود (Ultee et al.,2002). ترپن‌ها باعث از دست‌رفتن یکپارچگی غشاء باکتری و اتلاف نیروی محرکه پروتون می‌شوند. درحالیکه مکانیسم عمل آلدئیدها از دست رفتن

[1] -In vitro

نیروی محرکه پروتون بعلت نشت یونهای کوچک می‌باشد (Severino et al.,2014). همچنین شایان ذکر است که کامفور یافت شده در اسانس رزماری دارای اکسیژن است که باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی ترپنوئیدها می‌شود (Naigre et al., 1996).

نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید بر باکتری *سالمونلا تایفی موریم* نشان داد که مقدار این دو شاخص به ترتیب برابر ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. مکانیسم فعالیت ضد میکروبی کیتوزان کاملاً توضیح داده نشده اما چندین فرضیه در این زمینه بیان شده است. یکی از محتمل ترین فرضیه ها در مورد فعالیت ضد میکروبی کیتوزان به تغییرات نفوذپذیری سلول به دلیل اثرات متقابل میان گروه $NH_2$ کیتوزان و بار الکتریکی روی سطح سلول باکتری مربوط است. این تعامل می‌تواند به نشت الکترولیت داخل سلولی منجرشود (Severino et al., 2014).

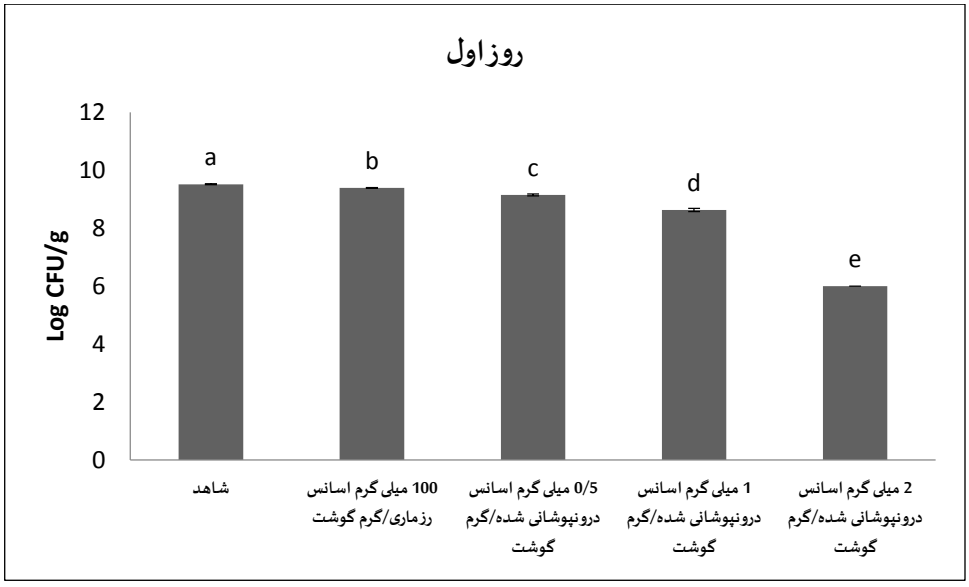
فعالیت ضد باکتریایی کیتوزان در pH پایین ممکن است از ساختار پلی‌کاتیونی آن به دلیل پروتونه شدن آمین در موقعیت C-2 واحد D- گلوکوز آمین نتیجه شود. کیتوزان دارای بار مثبت بوده، می‌تواند به سطح سلول باکتری که دارای بار منفی است، متصل شده وعملکرد معمول غشاء را به عنوان مثال، با افزایش نشت ترکیبات داخل سلولی یا با جلوگیری از انتقال مواد مغذی به سلول مختل نماید (Du et al., 2009).

مطالعات قبلی نشان داد که نانوذرات کیتوزان فعالیت ضد باکتری بالاتری در برابر باکتریهای گرم منفی یا گرم مثبت در مقایسه با پلیمر کیتوزان دارند. اثر مهاری بهتر نانوذرات کیتوزان می‌تواند با توجه به سطح بزرگتر نانو ذرات برای واکنش با دیواره سلولی باکتری توضیح داده شود. این نانوذرات می‌توانند بصورتی پایدار و محکم بر روی سطح دیواره سلولی باکتری جذب و در نتیجه باعث تخریب غشاء سلول و ازبین رفتن باکتری شوند (Qi et al., 2004).

علاوه بر این، نتایج جدول (۴-۱) نشان داد که با درونپوشانی اسانس رزماری در نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسیدMIC و MBC به ترتیب به ۵ و ۱۰ میکروگرم / میلی لیتر کاهش یافت.

## ۴-۵ آزمون درون تنی[1]: اثر ضد میکروبی اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل علیه *سالمونلا تایفی موریم* در گوشت گاو در طول نگهداری

اثر اسانس آزاد و درونپوشانی شده بر فعالیت باکتری *سالمونلا تایفی موریم* تلقیح شده بر سطح گوشت گاو در مدت ۱۲ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. به همین منظور در بازه های زمانی مختلف تغییرات بار میکروبی سطح نمونه ها اندازه‌گیری شد. در شکل (۴-۵) جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های مختلف در روز اول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است.



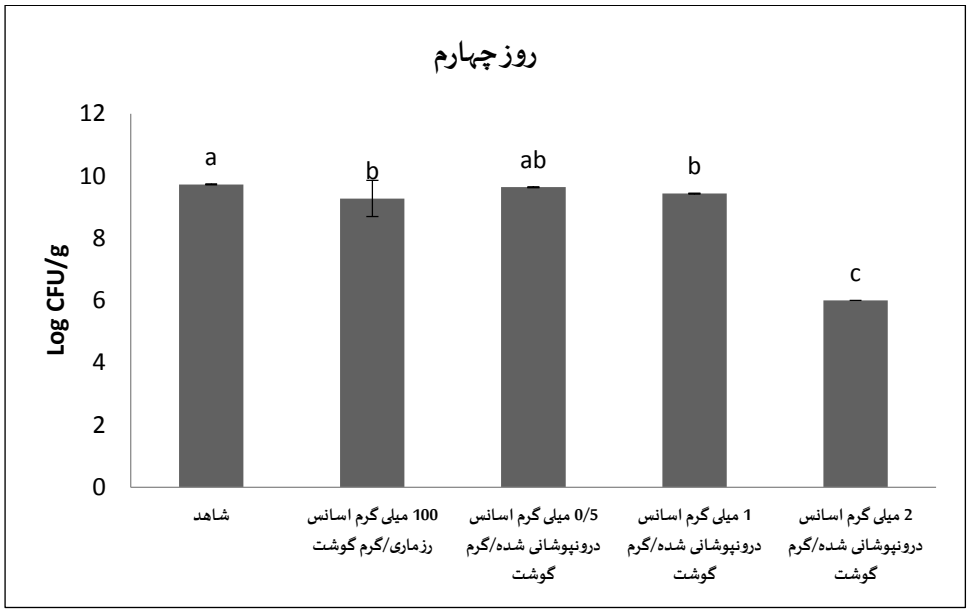

شکل(۴-۵ )- جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری در حالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید در روز اول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

نتایج جمعیت میکروبی در روز اول نشان داد که تمام تیمارها نسبت به نمونه شاهد باعث کاهش معنی‌دار ( $P < 0.05$) جمعیت میکربی در سطح نمونه‌ها شده‌اند. در روز اول نگهداری، بیشترین کاهش بار

[1] - In vivo

میکروبی مربوط به نمونه پوشش داده شده با ۲ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده بود که این کاهش در حد ۳/۵ لگاریتم CFU/گرم نمونه بود.

در شکل (۴-۶) جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه‌های مختلف در روز چهارم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد نشان داده شده است.

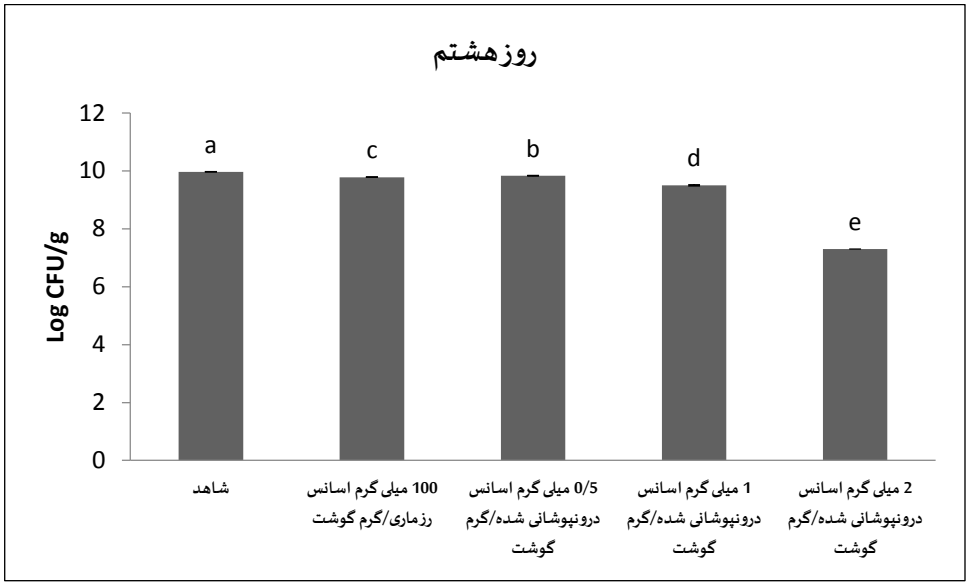



شکل(۴-۶ )- جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری در حالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید در روز چهارم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

نتایج روز چهارم نگهداری تیمارهای مختلف در دمای ۴ درجه سانتی گراد نشان داد، که نمونه پوشش داده شده با ۲ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده همانند نتایج روز اول بیشترین کاهش بار میکروبی را داشته است، که اختلاف مشاهده شده در سطح ۵ درصد معنی دار بود. در روز چهارم نمونه های پوشش داده شده با ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری آزاد، ۰/۵ میلی گرم و ۱ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده نسبت به نمونه شاهد دارای بار میکروبی کمتری بودند ، به جز تیمار ۰/۵ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) را با نمونه شاهد نشان داد، اما نکته قابل توجه اختلاف درونی

این تیمارها در روز اول و چهارم بود. در روز چهارم نگهداری بر خلاف روز اول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد اختلاف بین سه تیمار ذکر شده در سطح ۵ درصد معنی دار نبود.

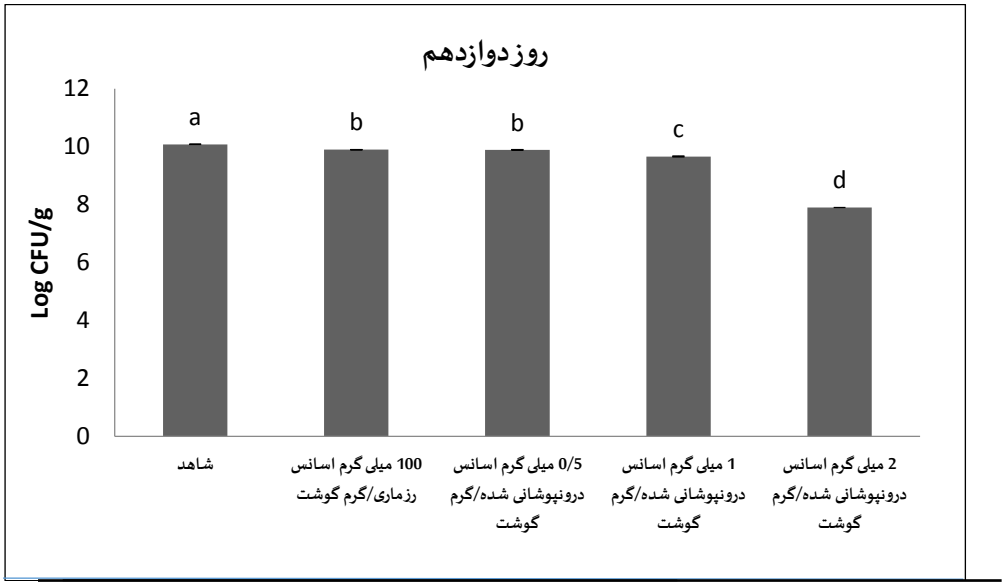
در شکل (۴-۷) جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های مختلف در روز هشتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد نشان داده شده است.




شکل(۴-۷ )- جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری در حالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید در روز هشتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

تغییرات بار میکروبی نمونه‌های مختلف در روز هشتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تقریباً مشابه روزهای اول و چهارم بود. در روز هشتم بازهم نمونه پوشش داده شده با ۲ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده بیشترین اثر را در کاهش بار میکروبی داشت.

در شکل (۴-۸) جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های مختلف در روز دوازدهم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است.




شکل(۴-۸)- جمعیت میکروبی *سالمونلا تایفی موریم* در نمونه های گوشت شاهد و تیمار شده با اسانس رزماری در حالت آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید در روز دوازدهم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

نتایج ارزیابی بار میکروبی پس از ۱۲ روز نگهداری نمونه ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد که جمعیت *سالمونلا تایفی موریم* تلقیح شده در نمونه شاهد از ۹/۵ به ۱۰/۱ لگاریتم CFU بر گرم نمونه افزایش یافته است. در روز دوازدهم تیمارهای حاوی ۲، ۱ و ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده و همچنین ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری آزاد به ترتیب بیشترین اثر بازدارندگی از رشد باکتری *سالمونلا تایفی موریم* را نشان دادند. البته اختلاف مشاهده شده بین تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده و ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری آزاد در سطح ۵ درصد معنی دار نبود.

نمونه پوشش داده شده با ۲ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده در روز دوازدهم نگهداری باعث بیشترین کاهش جمعیت *سالمونلا تایفی موریم* در حدود ۲/۲ لگاریتم CFU بر گرم شد.

به طور کلی، نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد باکتری اسانس رزماری درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید نشان داد که نانوژل حاوی اسانس رزماری اثر بیشتری در کنترل پاتوژن مورد

بررسی نسبت به اسانس خالص داشته است. در تحقیقی، دونسی و همکاران[1] (۲۰۱۲) استدلال کردند که با درونپوشانی مواد زیست فعال ممکن است فعالیت های ضد میکروبی در اثر افزایش پراکندگی عوامل ضد میکروبی در فاز آبی و فعال سازی مکانیسم جذب سلول افزایش یابد.

در واقع، استفاده از سیستم های درونپوشانی در مقیاس نانو، نه تنها قادر به بهبود ثبات فیزیکی و شیمیایی مواد فعال زیستی درونپوشانی شده در مواد غذایی هستند، بلکه در صورت درونپوشانی نبودن مواد فعال زیستی، غلظت های بالاتری از این مواد برای دستیابی به نتایج مورد نظر نیاز است.

در مورد اسانس‌های گیاهی یکی از محدودیت‌های اصلی استفاده از آنها در سامانه‌های غذایی در غلظت‌های بالا اثرات منفی بر کیفیت حسی و بافتی غذا و یا فعل و انفعالات اسانس با ترکیبات غذایی است که کاربرد آنها را در غلظت‌های موثر از نظر فعالیت ضد باکتریایی یا آنتی اکسیدانی محدود کرده است (Gutierrez et al.,2008).

نتایج بررسی اثر ضدمیکروبی در حالت درون شیشه‌ای و درون‌تنی نشان داد که درونپوشانی اسانس‌ها در پلیمرهای زیست سازگار می‌تواند یک راه حل بسیار کارآمد برای غلبه بر این چالش برای کاربرد عملی اسانس‌ها باشد.

### ۴-۶ تغییرات رنگ نمونه های گوشت گاو

در جدول (۴-۲) تغییرات شاخص های رنگ (روشنایی، قرمزی و زردی) نمونه های پوشش داده شده با اسانس روزماری آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید در طی روزهای مختلف نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد نشان داده شده است.

[1] -Donsi et al.

جدول( ۴-۲ )- شاخص رنگ نمونه های پوشش داده شده با اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده در نانوژل در درجه حرارت ۴ °C طی روزهای مختلف نگهداری

| شاخص رنگ | تیمار | روز اول | روزچهارم | روز هشتم | روز دوازدهم |
|---|---|---|---|---|---|
| L* | شاهد | ۱۰/۰±۲$^{a,C}$ | ۲۲/۷±۳/۸$^{a,B}$ | ۴۹/۶±۴/۱$^{a,A}$ | ۴۹/۰±۱/۷$^{a,A}$ |
| | ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری | ۱۲/۰±۱/۷$^{a,C}$ | ۱۲/۳±۱/۵$^{b,C}$ | ۴۵/۳±۳/۲$^{a,B}$ | ۵۱/۳±۳/۵$^{a,A}$ |
| | ۰/۵ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۱۰/۷±۳/۵$^{a,C}$ | ۲۰/۰±۱$^{a,B}$ | ۳۳/۷±۴/۰$^{b,A}$ | ۱۷/۷±۴/۰$^{b,B}$ |
| | ۱ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۹ /۰±۳/۶$^{a,B}$ | ۱۴/۰±۳$^{b,B}$ | ۴۷/۳±۲/۵$^{a,A}$ | ۱۱/۰±۲/۶$^{c,B}$ |
| | ۲ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۸/۰±۱/۱$^{a,D}$ | ۱۹/۷±۲/۲۹$^{a,C}$ | ۳۱/۰±۲/۶$^{b,B}$ | ۵۰/۷±۲/۳$^{a,A}$ |
| | | | | | |
| a* | شاهد | ۱۴/۷±۱/۵$^{a,A}$ | ۹/۰±۱$^{b,B}$ | ۳/۰±۱$^{b,C}$ | ۴/۰±۱/۷$^{a,C}$ |
| | ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری | ۱۶/۰±۱$^{a,A}$ | ۱۲/۷±۱/۵$^{a,A}$ | ۸/۳±۱/۱$^{a,B}$ | ۰/۰±۰$^{b,C}$ |
| | ۰/۵ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۱۴/۷±۱/۵$^{a,A}$ | ۱۱/۳±۱/۵$^{ab,A}$ | ۶/۶±۱/۱$^{ab,B}$ | ۱۰/۷±۰/۵۸$^{a,A}$ |
| | ۱ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۱۵±۱$^{a,A}$ | ۱۰/۷±۱/۵$^{abc,B}$ | ۳/۷±۱/۱$^{cd,C}$ | ۹/۰±۱/۷$^{a,B}$ |
| | ۲ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۱۴/۷±۱/۱$^{a,A}$ | ۸/۷±۱/۱$^{c,B}$ | ۵/۳±۰/۵۷$^{bc,C}$ | ۱/۷±۰/۵۸$^{b,D}$ |
| | | | | | |
| b* | شاهد | ۴/۳±۰/۵۸$^{a,B}$ | ۵/۷±۰/۵۷$^{a,A}$ | ۳/۰±۰$^{b,C}$ | ۳/۳±۰/۵۸$^{ab,C}$ |
| | ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری | ۶/۳±۰/۵۸$^{b,A}$ | ۶/۳±۲/۳$^{a,A}$ | ۴/۰±۰$^{a,A}$ | ۱/۷±۰/۵۸$^{b,B}$ |
| | ۰/۵ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۴/۷±۰/۵۸$^{a,A}$ | ۴/۶±۲/۹$^{a,A}$ | ۵/۳±۱/۱$^{a,A}$ | ۳/۷±۱/۱$^{a,A}$ |
| | ۱ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۴/۷±۱/۱$^{a,B}$ | ۸±۱$^{a,A}$ | ۲/۰ ±۰$^{c,C}$ | ۲/۳±۱/۱$^{ab,C}$ |
| | ۲ میلی گرم اسانس درونپوشانی شده | ۴/۰±۰$^{a,AB}$ | ۴/۶±۱/۵$^{a,AB}$ | ۵/۷±۰/۵۷$^{a,A}$ | ۳/۳±۰/۵۸$^{ab,B}$ |

حروف غیر مشابه در یک ستون (a-d) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P< 0.05$) است.

حروف غیر مشابه در یک ردیف (A-D) نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P<0.05$) است .

با توجه به نتایج جدول (۴-۲) در روز اول نگهداری اختلاف معنی‌داری ( $P > 0.05$) بین نمونه های مختلف برای شاخص روشنایی (L*) مشاهده نشد. اما در روزهای چهارم، هشتم ودوازدهم نگهداری اختلاف قابل توجهی در میزان این شاخص دیده شد. در بیشتر تیمارها شاخص روشنایی با افزایش زمان نگهداری افزایش یافت. این افزایش شاخص روشنایی احتمالاً به رنگ پریدگی گوشت برمی‌گردد،که می‌تواند در اثر اکسیداسیون ایجاد شده باشد (Nair et al., 2015). با توجه به جدول (۴-۲)، بهترین مقدار L*، یعنی کمترین مقدار ۳۳/۷ مربوط به نمونه پوشش داده شده با ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده بود.

شاخص a* نشان دهنده میزان قرمزی گوشت است (Choi et al., 2010). با توجه به نتایج جدول (۴-۲) شاخص قرمزی در طی نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای تمام تیمارها کاهش یافته است. مشابه شاخص L*، بهترین نتیجه برای شاخص a* یعنی بیشترین مقدار (۱۰/۷) در مورد نمونه پوشش داده شده با ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده حاصل شد که اختلاف معنی‌داری را با تیمارهای دیگردر سطح ۵ درصد در روز دوازدهم نگهداری نشان داد.

شاخص b* نشانگر میزان زردی گوشت است. نتایج جدول (۴-۲) نشان می‌دهد که با افزایش طول مدت نگهداری شاخص زردی در نمونه‌های مختلف کاهش معنی‌داری در سطح ۵ درصد داشته است. بیشترین کاهش زردی در روز دوازدهم نگهداری مربوط به نمونه گوشت پوشش داده شده با ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری آزاد بود. البته در روز دوازدهم نمونه حاوی ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری آزاد تنها با تیمار حاوی ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان داد. کوکامنرد وهمکاران [1](۲۰۰۸ ) اثر اسانس رزماری را برگوشت بسته‌بندی شده در اکسیژن بالا طی مدت ۱۲ روز بررسی کردند . نتایج نشان داد، a* در روز سوم در مقایسه با روز صفر به میانگین بالاترین حد و در ادامه این شاخص در روز۹ کمتر و در روز۱۲ به پایین‌ترین حد خود رسید . افزایش a* در فاصله روز صفر تا ۳ بعلت اکسیژن زایی میوگلوبین در اتمسفر با اکسیژن بالا می‌باشد. اگرچه

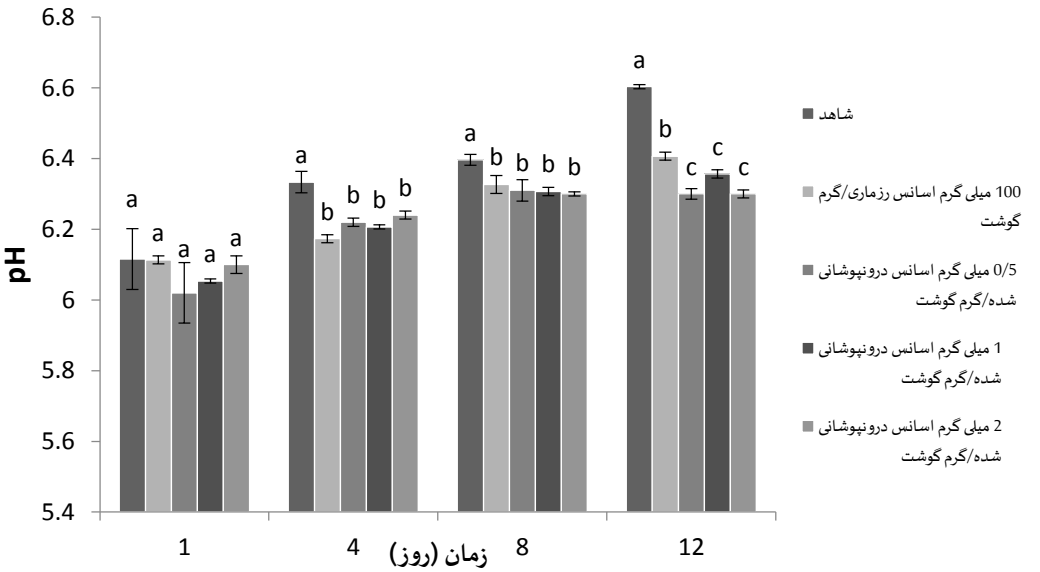
[1] -keokamnerd et al.

شاخص قرمزی پس از ۶ روز در همه نمونه‌ها کاهش یافت ولی این کاهش برای نمونه شاهد از همه قابل توجه‌تر بود.جورگانتلیس وهمکاران[1] (۲۰۰۷) اثر کیتوزان همراه با اسانس روزماری را بر روی گوشت قرمز مورد مطالعه قرار دادند. یافته ها نشان داد که a* و b* در تمام نمونه ها، طی مدت نگهداری کاهش یافت که می‌تواند بعلت تغییرات اکسیداتیو ناشی از افزایش پراکسید و اسید تیوباربیتوریک باشد.

### ۴-۷-تغییرات pH نمونه های گوشت در طی نگهداری

خصوصیات عملکردی پروتئین‌های گوشت به pH آن بستگی دارد. کاهش pH گوشت میتواند منجر به کاهش ظرفیت نگهداری آب پروتئین‌های ماهیچه شده، در حالیکه افزایش pH باعث کاهش کیفیت گوشت وکاهش زمان ماندگاری آن می‌شود (Chan et al., 2011).

شکل (۴-۹) میزان تغییرات pH نمونه های گوشت تیمار شده با اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده را در روز های مختلف نشان می‌دهد.




شکل(۴-۹) - میزان تغییرات pH گوشت های تیمار شده با اسانس رزماری آزاد و درونپوشانی شده در روز های مختلف نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد

[1] -Georgantelis et al.

با توجه به شکل (۴-۹) pH همه نمونه‌ها در طول مدت نگهداری افزایش یافته است. بیشترین افزایش pH پس از دوازده روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مورد نمونه شاهد مشاهده شد. این افزایش pH می‌تواند بعلت عوامل درونی و یا فعالیت آنزیم‌های میکروبی نظیر پروتئاز و یا لیپاز در طول مدت نگهداری باشد که باعث افزایش pH می‌شوند (Chaijan et al., 2005).

در روز دوازدهم نگهداری، کمترین افزایش pH در مورد نمونه گوشت پوشش داده شده با ۲ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی مشاهده شد. البته بین میزان pH تیمارهای ۲، ۱ و ۰/۵ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده در روز دوازدهم اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد مشاهد نشد. اما در روز دوازدهم بین تیمارهای حاوی نانوژل، اسانس آزاد و شاهد اختلاف معنی داری ( $P < 0.05$) مشاهده شد. زوهو و همکاران[1](۲۰۱۰) اثر کیتوزان و اسانس آویشن را برگوشت قرمز بررسی کردند . در طول مدت نگهداری، pH نمونه کنترل بعلت آنزیم های میکروبی بالاتر از نمونه های دیگر بود . بعلت خاصیت ضد میکروبی کیتوزان و آویشن افزایش pH نسبت به نمونه کنترل بطور محسوسی پایین تر بود.

کوکامنرد و همکاران (۲۰۰۸) اثر اسانس آویشن را بر روی تغییرات pH گوشتهای بسته‌بندی در اکسیژن بالا طی ۱۴ روز بررسی کردند. سرعت تغییر pH در نمونه کنترل و نمونه با اسانس در طول مدت نگهداری متفاوت نبود ولی میزان آن در نمونه کنترل بالاتر بود. قادری و همکاران[2](۲۰۱۶ ) اثر کیتوزان را همراه با اسانس آویشن درونپوشانی شده را بر روی گوشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج افزایش مختصر pH در نمونه‌های با اسانس و اسانس درونپوشانی شده را نشان داد، که میتواند بعلت خاصیت ضد میکروبی اسانس ویا خاصیت سینرژیستی آن با کیتوزان باشد.

[1] -Zhou et al.
[2] -Ghaderi et al

## ۴-۸- نتیجه گیری

اصــلاح پلیمر کیتوزان با ایجاد پیوند کووالانســی بین گروههای آمین کیتوزان و گروه کربوکســیلیک اســید بنزوئیک انجام شــد. در ادامه با روش خود تجمعی ذرات نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اســید ایجاد شــد. نتایج طیف FT-IR اتصــال موفقیت آمیز بین کیتوزان و بنزوئیک اســید را نشــان داد. همچنین عکس SEM میانگین قطر ذرات تولیدی کمتر از ۱۰۰ نانومتر با توزیع اندازه یکنواخت و شــکل کروی را نشــان داد. ســپس نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اســید به عنوان یک ماده درونپوشــانی کننده اســانس رزماری به منظور بهبود فعالیت آنتی اکســیدانی و ضــد میکروبی اســانس روزماری مورد اســتفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که درونپوشانی اسانس رزماری باعث فعالیت آنتی اکسیدانی تدریجی اسانس نسبت به حالت آزاد شد. همچنین نتایج فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری *سالمونلا تایفی موریم* در حالت برون‌تنی و درون‌تنی نشــان داد، که با درونپوشــانی اســانس رزماری در نانوژل کیتوزان-بنزوئیک اسید فعالیت ضد باکتریایی افزایش یافت. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی درحالت درون تنی (نمونه های گوشت) مربوط به نمونه حاوی ۲ میلی گرم اسانس رزماری درونپوشانی شده بود. نمونه گوشــت تیمار شــده با ۰/۵ میلی گرم اســانس درونپوشــانی شــده پس از ۱۲ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد بیشترین شاخص قرمزی را داشت. همچنین پس از دوازده روز نگهداری تیمارهای حاول نانوژل کیتوزان- بنزوئیک اسید کمترین تغییرات pH را نشان دادند.

در نتیجه، اسانس رزماری درونپوشانی شده می‌تواند به عنوان یک ابزار موثر برای کاهش پاتوژن های مواد غذایی مانند سالمونلا و افزایش مدت زمان نگهداری گوشت استفاده شود. با این حال مطالعات حسی بیشتر، برای به کار کردن چنین ترکیباتی در مواد غذایی مختلف ضروری می‌باشد.

**پیشنهادات:**

۱- استفاده از اسانس های دیگری با خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی مناسب به منظور درونپوشانی با استفاده از نانوژل

۲- استفاده از اسانس درونپوشانی به صورت پوشش در محصولات غذایی دیگر

۳- بررسی تغییرات ترکیبات گوشت تیمار شده با نانوژل در طول نگهداری در دماهای مختلف

# منابع

## منابع


۱-امید بیگی ، ر ،۱۳۷۴ ،رهیافتهای تولید و فراوری گیاهان دارویی ،انشارات فکر روز

۲-قرشی ابهری، س.ج.، س.م.صدرالاشرافی ،۱۳۸۴، برآورد تقاضای انواع گوشت در ایران با استفاده از سیستم تقاضای تقریبا ایده آل. مجله علمی – پژوهشی علوم کشاورزی ،شماره ۳ ، صفحه : ۱۴۳-۱۳۳

۳- شفافی زنوزیان, م سعود؛ پا سدار، ن سیم ; حاتمی کیا، مع صومه، ۱۳۹۳، جایگزینی نگهدارنده های طبیعی و بیولوژیک با نگهدارنده های شـــیمیایی در مواد غذایی، اولین همایش ملی میان وعده های غذایی، مشهد، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاددانشگاهی مشهد

۴- صم صام شریعت ، هـــــ ، ۱۳۷۸، ع صاره گیری و ا ستخراج مواد موثر و گیاهان داروئی و رو شهای شناسایی و ارزشیابی آنها ،انتشارات مانی

۵-فلوک، ه، ۱۳۶۸ ،گیاهان دارویی ،چاپخانه گلشن تهران

۶-مظفریان، و ، ۱۳۷۵، فرهنگ نامهای گیاهان ایران. انتشارات فرهنگ معاصر، ۵۹۴

۷-نصری, زرین، ۱۳۹۰، بررسی کاربرد و روش های تولید عصاره گیاه رزماری و آنتی اکسیدان های آن به عنوان افزودنی فرآورده های گوشـتی، بیسـتمین کنگره ملی علوم و صـنایع غذایی، تهران، دانشـگاه صنعتی شریف،

۸-یعقوب زاده, زهرا; صفری،ر ضا، ۱۳۹۰، نگهدارنده های بیولوژیکی مح صولات غذایی، اولین سمینار ملی امنیت غذایی، سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه

1-Abdel-Aziz, S.M., Asker, M.M., Keera, A.A. and Mahmoud, M.G., (2016)." Microbial Food Spoilage: Control Strategies for Shelf Life Extension. InMicrobes in Food and Health" . Springer International Publishing. pp. 239-264

2-Alhaique, F., Casadei, M.A., Cencetti, C., Coviello, T., Di Meo, C., Matricardi, P., Montanari, E., Pacelli, S. and Paolicelli, P.(2016). "From macro to nano polysaccharide hydrogels: An opportunity for the delivery of drugs." Journal of Drug Delivery Science and Technology, 32, pp.88-99.

3-Alzoreky, N.S. and Nakahara, K.,( 2003). "Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia". International journal of food microbiology, 80(3), pp.223-230.

4-Arranz, E., et al. (2015). "Improved Bioavailability of Supercritical Rosemary Extract Through Encapsulation in Different Delivery Systems After In Vitro Digestion."Food Digestion: Research and Current Opinion 6.1-3 ,pp 30-37.

5-Aruoma, O.I., Halliwell, B., Aeschbach, R. and Löligers, J., (1992). "Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid". Xenobiotica, 22(2), pp.257-268.

6-Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., (2008). "Biological effects of essential oils–a review". Food and chemical toxicology, *46*(2), pp.446-475.

7-Balentine, C. W., et al. (2006). "The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef."Meat science 73.3, pp. 413-421.

8-Bañón, S., Méndez, L., & Almela, E. (2012)." Effects of dietary rosemary extract on lamb spoilage under retail display conditions. Meat Science, 90, pp. 979–983.

9-Barka, E.A., Eullaffroy, P., Clément, C. and Vernet, G.,( 2004)." Chitosan improves development, and protects Vitis vinifera L. against Botrytis cinerea".Plant Cell *Reports*, *22*(8), pp.608-614.

10-Basaga, H., Tekkaya, C. and Acikel, F., (1997)." Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract". LWT-Food Science and Technology, *30*(1), pp.105-108.

11-Bassolé, I.H.N. and Juliani, H.R., (2012). "Essential oils in combination and their antimicrobial properties". Molecules, 17(4), pp.3989-4006.

12-Barbosa, I., da Costa Medeiros, J.A., de Oliveira, K.Á.R., Gomes-Neto, N.J., Tavares, J.F., Magnani, M. and de Souza, E.L., (2016)." Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella Enteritidis in leafy vegetables*". Food control*, *59*, pp.468-477.

13-Bazargani-Gilani, B., Aliakbarlu, J. and Tajik, H., (2015)." Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with Zataria multiflora Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage".Innovative Food Science & Emerging Technologies, 29, pp.280-287.

14-Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Campaniello, D., D'Amato, D., Gallo, M., Speranza, B. and Sinigaglia, M., (2011)." Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: a review" Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, 3, pp.1157-1166.

15-Beyki, M., Zhaveh, S., Khalili, S.T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., Tabatabaei, M. and Mohsenifar, A., (2014). " Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus". Industrial Crops and Products, 54, pp.310-319.

16-Bhargava, K., Conti, D.S., da Rocha, S.R.P., Zhang, Y., (2015)." Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce". Food Microbiol. 47, pp.69–73

17-Bilia, A.R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F. and Bergonzi, M.C.,( 2014)." Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach". Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. PP.1-14.

18-Blanco-Padilla, A., Soto, K.M., Hernández Iturriaga, M. and Mendoza, S.,( 2014)." Food antimicrobials nanocarriers" The Scientific World Journal.pp.1-11.

19-Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E., (2007)"Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (Rosmarinus officinalis L. and Salvia officinalis L., Lamiaceae) essential oils". Journal of agricultural and food chemistry, 55(19), pp.7879-7885.

20-Burt, S.,( 2004)." Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review". International journal of food microbiology,94(3), pp.223-253.

21-Camo, J., Beltrán, J. A., & Roncalés, P. (2008). "Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging". Meat Science, 80(4), pp.1086–1091.

22-Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M.A. and Pérez-Coello, M.S.,( 2009) "Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis". Food Chemistry, 112(4), pp.1022-1030.

23-Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W., Faustman, C.,( 2005)." Changes of pigments and color in sardine (Sardinella gibbosa) and mackerel (Rastrelliger kanagurta) muscle during iced storage". Food Chem. 93,pp. 607–617

24-Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M.A. and Azizi, M.H., (2016). "Nanoencapsulation Approach to Improve Antimicrobial and Antioxidant Activity of Thyme Essential Oil in Beef Burgers During Refrigerated Storage".Food and Bioprocess Technology, pp.1-15.

25-Chan, J.T.Y., Omana, D.A., Betti, M.,( 2011)." Effect of ultimate pH and freezing on the biochemical properties of proteins in turkey breast meat". Food Chem. 127, pp.109–117.

26-Choi, Y.-S., Choi, J.-H., Han, D.-J., Kim, H.-Y., Lee, M.-A., Kim, H.-W., Lee, J.-W., Chung, H.-J., Kim, C.-J.,( 2010)." Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems". Meat Sci. 84,pp. 212–218.

27-Clemente, I., Aznar, M., Silva, F., Nerín, C., (2016)." Antimicrobial properties and mode of action of mustard and cinnamon essential oils and their combination against foodborne bacteria. Innov". Food Sci. Emerg. Technol. 36, pp.26–33

28-Colmenero, F., Carballo, J. and Cofrades, S.,(2001). "Healthier meat and meat products: their role as functional foods". Meat science, *59*(1), pp.5-13.

29-Coviello, T., Matricardi, P., Marianecci, C. and Alhaique, F.,( 2007)."Polysaccharide hydrogels for modified release formulations". Journal of controlled release, 119(1), pp.5-24.

30-Crini, G. and Badot, P.M., (2008). "Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature". Progress in polymer science, 33(4), pp.399-447.

31-Darmadji, P. and Izumimoto, M., (1994). "Effects of chitosan and nitrite on the poperties of fermented meat". Animal Science and Technology (Japan*)*.

32-Dave, D. and Ghaly, A.E., (2011)." Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review". American Journal of Agricultural and Biological Science.

33-Davidson, P.M., (1997)." Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds." In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM, Washington, pp. 520–556.

34-Davies, A.R., Board, R.J. and Board, R.G.,( 1998). "*Microbiology of meat and poultry*". Springer Science & Business Media.

35-Denyer, S.P., Hugo, W.B., (1991)." Mechanisms of antibacterial action—A summary". In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), Mechanisms of Action of Chemical Biocides. Blackwell, Oxford, pp. 331–334.

36-Denyer, S.P., Hugo, W.B., (1991)." Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane". In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), Mechanisms of Action of Chemical Biocides. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 171–188.

37-Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J.,( 2004). "Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables". Food microbiology, 21(6), pp.703-714.

38-Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M., Ferrari, G., (2012)." Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier." J. Biotechnol. 159, pp.342–350

39-Dorman, H.J.D., Deans, S.G., (2000). "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils" Journal of Applied Microbiology 88, 308–316.

40-Du, W.-L., Niu, S.-S., Xu, Y.-L., Xu, Z.-R., Fan, C.-L., (2009). "Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions". Carbohydr. Polym. 75, 385–389.

41-Efferth, T. and Koch, E., (2011). "Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy".Current drug targets, 12(1), pp.122-132.

42-Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N. and Anandharamakrishnan, C., (2013). "Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review". Food and Bioprocess Technology, 6(3), pp.628-647.

43-Erel, O., (2004)." A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation". Clin. Biochem. 37, 277–285.

44-Erkan, Naciye, Guler Ayranci, and Erol Ayranci. (2008). "Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol." Food Chemistry110.1,pp. 76-82.

45-Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A.,( 1989). ."Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection 52 (9), 665–667.

46-Fathi, M., Martin, A. and McClements, D.J., (2014)." Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems". Trends in Food Science & Technology, 39(1), pp.18-39.

47-Ferreira, S.A., Coutinho, P.J. and Gama, F.M., (2011). "Synthesis and characterization of self-assembled nanogels made of pullulan". Materials,4(4), pp.601-620.

48-Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.,( 1958). "*Food microbiology*". Toronto: Mc.

49-Ghabraie, M., Vu, K.D., Tata, L., Salmieri, S. and Lacroix, M., (2016)." Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat". *LWT-Food Science and Technology*, *66*, pp.332-339.

50-Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G. and Georgakis, S.A., (2007) "Effect of rosemary extract, chitosan and α-tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C". Meat science, 76(1), pp.172-181.

51-Gill, C.O. (1996)." Extending the storage life of raw chilled meats". Meat Science, 43(96), PP.99–109.

52-Gourine, N., Yousfi, M. and Bombarda, I. 2010. Antioxidant activities chemical composition of essential oil of pistacia atlantica from Algeria. Industerial crops and products., 31: pp. 203-208.

53- Gill, C.O., & Tan, K.H. (1980)." Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 39(2),PP. 317.

54-Golshani, Z. and Sharifzadeh, A., 2014. Evaluation of antibacterial activity of alcoholic extract of rosemary leaves against pathogenic strains,Journal of research in medical sciences. *16*(3), pp.12-15.

55-Goni, P., Lopez, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. and Nerín,C., (2009) ."Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils". Food Chemistry, 116(4), pp.982-989.

56-Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P.,(2008). "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients".International journal of food microbiology, 124(1), pp.91-97.

57-Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., (1999). " Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts". Journal of Applied Microbiology 86,pp. 985–990.

58-Hatamnia, A.A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R., (2014)." Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits". Food Chem. 145, 306–311

59-Hu, J., Wang, X., Xiao, Z. and Bi, W., (2015). "Effect of chitosan nanoparticles loaded with cinnamon essential oil on the quality of chilled pork". LWT-Food Science and technology, 63(1), pp.519-526.

60-Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.J., Zu, Y.G. and Liu, X.L., (2011). "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary". *Environmental toxicology and pharmacology*, *32*(1), pp.63-68.

61-Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H., 1994. "Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents". Journal of applied bacteriology, 76(6), pp.626-631.

61-Kabanov, A.V. and Vinogradov, S.V., (2009). "Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities". Angewandte Chemie International Edition, 48(30), pp.5418-5429.

62-Kahraman, T., Issa, G., Bingol, E.B., Kahraman, B.B. and Dumen, E.,( 2015). "Effect of rosemary essential oil and modified-atmosphere packaging (MAP) on meat quality and survival of pathogens in poultry fillets". Brazilian Journal of Microbiology, 46(2), pp.591-599.

63- Kamil, J.Y., Jeon, Y.J. and Shahidi, F., (2002). "Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (Clupea harengus)". Food chemistry,

79(1), pp.69-77.

64-Keokamnerd, T., Acton, J.C., Han, I.Y. and Dawson, P.L.,( 2008)." Effect of commercial rosemary oleoresin preparations on ground chicken thigh meat quality packaged in a high-oxygen atmosphere". Poultry Science, 87(1), pp.170-179.

65-Khalili, S.T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhaveh, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M. and Tabatabaei, M., (2015) ."Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus". LWT-Food Science and Technology, 60(1), pp.502-508.

64-Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. and Weis, N., (1989). "Antibacterial and antifungal properties of essential oil components". Journal of Essential Oil Research, 1(3), pp.119-128.

65-Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, H.-M., Vigenschow, H., (1986)."Action of terpenoids on energy metabolism". In: Brunke, E.J. (Ed.), Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils. De Gruyter, Berlin, pp. 429–445.

66-Kwon, S. S., Nam, Y. S., Lee, J. S., Ku, B. S., Han, S. H., Lee, J. Y., et al. (2002). "Preparation and characterisation of coenzyme Q10-loaded PMMA nanoparticles bay a new emulsification process based on microfluidisation. Colloids and Surfaces"A: Physicochemical and Engineering Aspects, 210,pp. 95-104

67-Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.-J.E., (2001). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol". Journal of Applied Microbiology 91, pp. 453–462.

68-Lee, J., Lee, C., Kim, T.H., Lee, E.S., Shin, B.S., Chi, S.-C., Park, E.-S., Lee, K.C., Youn, Y.S., (2012). "Self-assembled glycol chitosan nanogels containing palmityl-acylated exendin-4 peptide as a long-acting anti-diabetic inhalation system." J. Control. Release 161, 728–734.

69-Lee, K.Y., Kwon, I.C., Kim, Y.H., Jo, W.H. and Jeong, S.Y.,( 1998)." Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system". Journal of Controlled Release, 51(2), pp.213-220.

70-Lekjing, S., (2016)." A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage". Meat science,*111*, pp.192-197.

71-Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. and Zhang, Z., (2008)." Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems". Advanced drug delivery reviews, 60(15), pp.1650-1662.

72-Livney, Y.D., (2015)." Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions". Current Opinion in Food Science, 3, pp.125-135.

73-Lo Presti, M., Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., Dugo, G. and Mondello, L., (2005)." A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil". Journal of separation science, 28(3), pp.273-280.

74-Lopez-Bote, C. J., et al. (1998)."Effect of dietary administration of oil extracts from rosemary and sage on lipid oxidation in broiler meat." British poultry science39.2, pp. 235-240.

75-Madsen, H.L. and Bertelsen, G., (1995)." Spices as antioxidants."Trends in Food Science & Technology, 6(8), pp.271-277.

76-Mahon, C.R. and Manuselis, G.,(1995)." Enterobacteriaceae." *Textbook of Diagnostic Microbiology, 2*, pp.463-511.

77-Maryam, I., Huzaifa, U., Hindatu, H. and Zubaida, S., (2015). "Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance". Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 4(3), pp.165-170.

78-Mastromatteo, M., Conte, A. and Del Nobile, M.A., (2010). "Combined use of modified atmosphere packaging and natural compounds for food preservation". Food Engineering Reviews, 2(1), pp.28-38.

79-Mazhar, S.F., Aliakbari, F., Karami-Osboo, R., Morshedi, D., Shariati, P. and Farajzadeh, D., (2014)"Inhibitory Effects of Several Essential Oils towards Salmonella typhimurium, Salmonella paratyphi A and Salmonella paratyphi B".Applied Food Biotechnology, 1(1), pp.45-54.

80-Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C., Compagnone, D. and Serio, A., (2015). "Salmonella enterica and Listeria monocytogenes inactivation dynamics after treatment with selected essential oils". Food Control, *50*, pp.794-803.

81-McMillin, K. W. (2008)." Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat". Meat Science, 80, pp.43–65.

82- Mohammadi, A., Hashemi, M. and Hosseini, S.M., (2015)." Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling Botrytis cinerea, the causal agent of gray mould disease". Innovative Food Science & Emerging Technologies,28, pp.73-80.

83-Monget, D. and Villeval, F., Bio Merieux,(1995)." Method of bacteriological analysis, and medium for the detection of bacteria of the Salmonella genus ". U.S. Patent 5,pp.434,056.

84-Moo-Huchin, V.M., Moo-Huchin, M.I., Estrada-León, R.J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I.A., Ortiz-Vázquez, E., Betancur-Ancona, D., Sauri-Duch, E., (2015). "Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico". Food Chem. 166, pp.17–22.

85-Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I., Michel, G., (1996). "Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products". Planta Med. 62, pp.275–277.

86-Nair, D.V.T., Kiess, A., Nannapaneni, R., Schilling, W., Sharma, C.S., (2015). "The combined efficacy of carvacrol and modified atmosphere packaging on the survival of Salmonella, Campylobacter jejuni and lactic acid bacteria on Turkey breast cutlets". Food Microbiol. 49, pp.134–141

87-Nascimento, G.G. (2000)."Antibacterial activity of extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria". brazilian microbiology, 31(4): pp.245-256.

88-Nasti, A., Zaki, N.M., de Leonardis, P., Ungphaiboon, S., Sansongsak, P., Rimoli, M.G., Tirelli, N.,(2009). "Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation". Pharm. Res. 26, pp.1918–1930

89-Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M. and Scaccini, C., (1999). "Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation". Journal of agricultural and food chemistry, 47(4), pp.1453-1459.

90-Natrajan, D., Srinivasan, S., Sundar, K. and Ravindran, A., (2015). "Formulation of essential oil-loaded chitosan–alginate nanocapsules". journal of food and drug analysis, 23(3), pp.560-568.

91-Nychas, G.J.E., (1995)." Natural antimicrobials from plants". In: Gould, G.W. (Ed.), New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Professional, London, pp. 58–89.

92-O'Grady, M.N., Kerry, J.P. and Ledward, D.,( 2009). "Using antioxidants and nutraceuticals as dietary supplements to improve the quality and shelf-life of fresh meat". Improving the Sensory and Nutritional Quality of Fresh Meat; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK, pp.356-386.

93-Oliveira, G., de Oliveira, A.E., da Conceição, E.C. and Leles, M.I., (2016)."Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary". Food Chemistry, 211, pp.465-473.

94-Oliveira, C.E.V., Stamford, T.L.M., Neto, N.J.G. and de Souza, E.L.,( 2010). "Inhibition of Staphylococcus aureus in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids". International journal of food microbiology,137(2), pp.312-316.

95-Ortuño, J., Serrano, R., Jordán, M.J. and Bañón, S., (2014). "Shelf life of meat from lambs given essential oil-free rosemary extract containing carnosic acid plus carnosol at 200 or 400mgkg− 1". Meat science, 96(4), pp.1452-1459.

96-Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J.C., Miller, A.R., (2006)." Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods." J. Agric. Food Chem. 54, pp.1151–1157.

97-Pandit, V.A. and Shelef, L.A., (1994)." Sensitivity of Listeria monocytogenes to rosemary (Rosmarinus officinalis L.)". *Food Microbiology*, *11*(1), pp.57-63.

98-Payne, G.F., (2007)."Biopolymer-based materials: the nanoscale components and their hierarchical assembly". Current opinion in chemical biology, 11(2), pp.214-219.

99-Philipson, J. D. 1990. Plants as a source of valuable products. In: Charlwood, B. V., Rhodes, M. J., Secondary products from plants tissue culture. Clarendon press, Oxford, pp. 1-22

100-Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C. and Nostro, A.L., (2015). "Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in beef meatballs". *Food Control*, *54*, pp.188-199.

101-Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. and Casanova, J., (2002). "Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica". Flavour and Fragrance Journal, 17(1), pp.15-19.

102-Prabaharan, Mani. (2015). "Bioactivity of Chitosan Derivatives." Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology ,pp. 1609-1625.

103-Pujana, M.A., Pérez-Álvarez, L., Iturbe, L.C.C. and Katime, I., (2013). "Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin". Carbohydrate polymers, 94(2), pp.836-842.

104-Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., Zou, X., (2004). "Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles". Carbohydr. Res. 339,pp. 2693–2700.

105-Raemdonck, K., Demeester, J. and De Smedt, S., (2009)." Advanced nanogel engineering for drug delivery". Soft Matter, 5(4), pp.707-715.

106-Rana, B.K., Singh, U.P. and Taneja, V. (1997). "Antifungal and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of aegle marmelos". Journal Ethnopharmacology, 57(1), pp. 29-34.

107-Ravi, H., & Baskaran, V. (2015). "Biodegradable chitosan-glycolipid hybrid nanogels: A novel approach to encapsulate fucoxanthin for improved stability and bioavailability". Food hydrocolloids, 43, 717-725.

108-Ripoll, G., Joy, M., & Muñoz, F. J. (2011). "Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat". Meat Science, 87, 88–93.

109-Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I.,(2013). "Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (Thymus vulgaris L.), sage (Salvia officinalis L.), and marjoram (Origanum majorana L.) extracts". Ind. Crops Prod. 43, pp.827–831.

110-Rodríguez, F. P., Campos, D., Ryser, E. T., Buchholz, A. L., Posada-Izquierdo, G. D., Marks, B. P., & Todd, E. (2011). "A mathematical risk model for Escherichia coli O157: H7 cross-contamination of lettuce during processing". Food microbiology, 28,pp. 694-701

.

111-Sagdic, O., Karahan, A.G., Ozcan, M. and Ozkan, G.,( 2003). "Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition". Food Science and Technology International, *9*(5), pp.353-358.

112-Sanguansri, P. and Augustin, M.A.,( 2006). "Nanoscale materials development–a food industry perspective". Trends in Food Science & Technology, *17*(10), pp.547-556.

113-Sánchez-Escalante, A., Djenane, D., Torrescano, G., Beltrán, J.A. and Roncales, P., (2003). "Antioxidant action of borage, rosemary, oregano, and ascorbic acid in beef patties packaged in modified atmosphere". Journal of Food Science, 68(1), pp.339-344.

114-Schweiggert, U., Carle, R. and Schieber, A., (2007). "Conventional and alternative processes for spice production–a review". Trends in Food Science & Technology, *18*(5), pp.260-268.

-Sedighara.P, Barin.A ,( 2010). Journal of Herbal Drugs, 3: pp.43-47

115-Severino, R., Vu, K.D., Dons\`\i, F., Salmieri, S., Ferrari, G., Lacroix, M., (2014)." Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against Listeria monocytogenes in broccoli florets. J. Food Eng. 124, 1–10.

116-Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J., (1999)." Food applications of chitin and chitosans". Trends in food science & technology, 10(2), pp.37-51.

117-Shelef, L.A., (1983). "Antimicrobial effects of spices." Journal of Food Safety 6,pp. 29–44.

118-Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B.,( 1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons". Microbiological Reviews 59 (2), pp.201–222.

119-Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B.,( 1994). "Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes". Journal of Biological Chemistry 269 (11),pp. 8022–8028.

120-Silva, M.M. and Lidon, F.C.,( 2016)." Food preservatives-An overview on applications and side effects". Emirates Journal of Food and Agriculture,28(6), pp.366.

121-Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L., (2001). "The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese". Food Microbiology, *18*(4), pp.463-470.

122-Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., (1998). "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens". Letters in Food Microbiology 26,pp. 118–122.

123-Socaci, S.A. and Socaciu, C., (2008) "GC-MS analysis of rosemary essential oil". Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 65(2).

124-Soppimath, K.S., Aminabhavi,T.M., Kulkarni,A.R. and Rudzinski, W.E., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices".Journal of controlled release, 70(1), pp.1-20.

125-Sperber, W.H. and Doyle, M.P., (2009). "*Compendium of the microbiological spoilage of food and beverages".* New York: Springer.

126-Stiles, M.E. (1991)." Modified atmosphere packaging of meat, poultry and their products." In B. Ooraikul, & M.E. Stiles (Eds.), Modified atmosphere packaging of food (pp. 118–147). Chichester, UK: Ellis Horwood Limited

127-Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., (2010)." Antimicrobial herb and spice compounds in food". Food control, 21(9), pp.1199-1218.

128-Tassou, C., J.E, N.G., (1995)." Antimicrobial activity of essential oil of mastic gum (pistacia lentiscus var. chia)" on gram positive and gram negative bacteria in brith and in model food biodeterioration and biodegradation, 12: 411-420

129-Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D. and Senatore, F.,( 2011). "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of Salvia lanigera from Cyprus". Food and Chemical Toxicology,49(1), pp.238-243.

130-Turek, C. and Stintzing, F.C.,( 2013). "Stability of essential oils: a review".Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(1), pp.40-53.

131-Turgis, M., Vu, K.D., Dupont, C. and Lacroix, M., (2012). "Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria". Food Research International, 48(2), pp.696-702.

132-Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., (2002). "The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus." Appl. Environ. Microbiol. 68, 1561–1568.

133-WHO, (2002). "Food safety and foodborne illness". World Health Organization Fact sheet 237, revised January 2002. Geneva.

134-Yang, Y., Wang, S., Wang, Y., Wang, X., Wang, Q. and Chen, M., (2014). Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery.*Biotechnology advances*, *32*(7), pp.1301-1316.

135-Yao, Y., Xia, M., Wang, H., Li, G., Shen, H., Ji, G., Meng, Q. and Xie, Y., (2016). "Preparation and evaluation of chitosan-based nanogels/gels for oral delivery of myricetin". European Journal of Pharmaceutical Sciences, 91, pp.144-153.

136-Yu, S., and Zhang, G., (2006). "Nanogels prepared by self-assembly of oppositely charged globular proteins". Biopolymers, 83(2), pp.148-158.

137-Zhaveh, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S.T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T. and Tabatabaei, M., (2015). "Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus". Industrial Crops and Products, 69, pp.251-256.

138-Zhou, G. H., X. L. Xu, and Yuan Liu. (2010). "Preservation technologies for fresh meat–A review." Meat science 86.1,pp. 119-128.

**Abstract:**

In the present study, encapsulation by chitosan (CS) and benzoic acid (BA) nanogel was used to improve antioxidant and antimicrobial activity and stability of the *Rosmarinus officinalis* essential oils (REOs). The mean diameter of the gel nanoparticles was under 100 nm that had uniform size with spherical shape. The Results of radical scavenging activity of the nanogels revealed that antioxidant compounds of nano-encapsulated were slowly released. Subsequently, the antibacterial activity of the coatings that have free REOs and CS–BA nanogel-encapsulated REOs against *Salmonella typhimurium* was evaluated on inoculated beef samples. The results showed that the CS–BA nanogel-encapsulated REOs coating was more effective than the free REOs in reduction of *Salmonella typhimurium* population on beef under cold storage. Nano-encapsulation at 2 mg/g beef had the most promising effect on reduction of the pathogens population. Moreover, nano-encapsulation caused the least effect on increasing of pH of beef samples. CS–BA nanogel-encapsulated REOs at 0.5 mg/g beef had minimum effects on the color values during the storage. The results indicated that due to the volatility and instability of the EOs when it exposed to the environmental factors, their encapsulation caused considerably to improve physico- chemical characteristic. In conclusion, REOs in form of nanogel can be used as an effective method to reduce food borne pathogens like *S. typhimurium* and improved of the meat shelf life.

**Key words:** *Salmonella typhimurium ;* Rosmary essential oil; Nanogel; Encapsulation; Beef

**Shahrood University of Technology**

**Faculty of Agriculture**

**MSc Thesis in Food Science and Technology**

# Effect of nanogel containing rosemary essential oil on quality of beef

By: Mojgan Hadian

Supervisors:
Dr.Ahmad Rajaei
Dr.Meisam Tabatabaei

Advisor:
Dr.Afshin Mohsenifar

October 2016