Archive of SID

ساخت بیوفیلم جدید بر پایه نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر و بررسی خواص ضدمیکروبی آن به منظور استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی

فائزه حشمدار راوری[a]، سید علی یاسینی اردکانی[b]*، سید حسین حکمتی مقدم[c]

[a] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد یزد، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
[c] دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۸/۲۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۶/۶

چکیده

مقدمه: در میان انواع فناوری‌های بسته‌بندی فعال موجود، بسته‌بندی ضدمیکروبی زمینه‌ای است که به‌تازگی روی آن تحقیقات بیشتری متمرکز شده است. استفاده همزمان از نانوذرات و مواد ضدمیکروب در بسته‌بندی غذا راهکاری جدید است. این تحقیق با هدف ساخت یک بیوفیلم بر پایه نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر انجام گرفت که هم ویژگی‌های تجزیه‌پذیری و هم خاصیت ضدمیکروبی داشته باشد.

مواد و روش‌ها: عصاره سیر از سیر تازه تهیه و بعد نانوذرات سلولز و نشاسته به روش شیمیایی سنتز گردید. برای تعیین ویژگی‌های نانوذرات نشاسته و سلولز، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی به کار رفت. با افزودن مخلوط سه ماده فوق بر روی پلیمر پلی اتیلن یک بیوفیلم تهیه شد که از نظر خاصیت ضدمیکروبی بر علیه دو باکتری، یک مخمر و یک کپک به تنهایی و در حضور شیر تا ۶ هفته بررسی شد. داده‌ها با تست آماری t-test مقایسه شدند. معیار $p<۰/۰۵$ برای تعیین معنی‌داری اختلاف داده ها بکار رفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

یافته‌ها: بیوفیلم تهیه‌شده بر روی اشریشیا کلای بالاترین خاصیت ضدمیکروبی را داشت (با قطر هاله عدم رشد حدود ۸/۵ سانتی‌متر اطراف بیوفیلم). اثر ضدمیکروبی بیوفیلم سنتز شده در حضور شیر آلوده (بعنوان مدل بسته بندی شیر) به‌طور معنی‌داری نسبت به کنترل، که حاوی هیچ‌گونه بیوفیلمی نبود، بالاتر بود.

نتیجه‌گیری: با نانوذرات نشاسته، سلولز و عصاره سیر که روی یک پلیمر قرار می‌گیرند می‌توان بیوفیلم ضدمیکروبی مناسبی تهیه نمود. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند رویکرد جدیدی به‌سوی استفاده از بسته‌بندی‌های فعال ضدمیکروبی در صنایع غذایی جهت بهبود کیفیت، ایمنی و کاهش زباله‌های حاصل از غذا بحساب آید.

واژه‌های کلیدی: *آلیسین، بیوفیلم، پلیمر، شیر، نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: a.yasini@iauyazd.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

به‌تازگی افزایش نگرانی‌های عمومی جهانی به علت اثرات زیست‌محیطی ضایعات بسته‌بندی پلاستیکی باعث شده که تقاضا برای مواد بسته‌بندی تجزیه‌پذیر به‌جای استفاده از مواد بسته‌بندی پلاستیکی غیرقابل تجزیه افزایش یابد تا هم زیست تجزیه‌پذیر باشند و هم ایمنی ماده غذایی را تضمین کنند (Bordes *et al*., 2009). از طرف دیگر فرآوری نامناسب و آلودگی میکروبی ماندگاری ماده غذایی را کاهش می‌دهد و منجر به افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های ناشی از مصرف غذا می‌گردد (Coma, 2008). بنابراین نوآوری‌های بسته‌بندی مواد غذایی نه‌تنها باید وظایف اصلی بسته‌بندی سنتی را برآورده سازد، بلکه در ایجاد جهانی پایدارتر که در آن تأثیر مضرات زباله‌های بسته‌بندی و اتلاف غذا در محیط زیست ما کاهش می‌یابد، کمک کند (EC, 2009). به همین دلیل پژوهش‌های گسترده‌ای در زمینه ساخت بسته‌بندی‌های فعال و دارای عوامل ضدمیکروب صورت گرفته است (Coma, 2008). استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی در مواد بسته‌بندی بسیار مورد توجه است. فیلم‌های با فعالیت ضدمیکروبی به جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن و عامل فساد کمک می‌کنند (Rhim and Ng, 2007). Emiroghlu و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک بسته‌بندی با دیواره حاوی سویا و روغن‌های آویشن و پونه کوهی تهیه کردند و نشان دادند که این سطح علیه باکتری‌های شایع عامل فساد غذا نظیر اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس به‌خوبی خواص ضدمیکروبی دارد. عملکرد ضدمیکروبی برخی نانوذرات و یا مواد نانوکامپوزیتی در زمینه صنایع مختلف به علت فعالیت ضدمیکروبی آنها به عنوان مهارکننده‌های رشد (Cioffi *et al*., 2005)، عوامل ضدمیکروبی (Hong and Rhim, 2008)، حامل‌های ضدمیکروبی[1] (Bi L *et al*., 2011) و یا فیلم‌های بسته‌بندی ضدمیکروبی (Wang *et al*., 2006; Rhim *et al*., 2006) از یک دهه پیش شناخته شده است (Pandey *et al*., 2005; Hong and Rhim, 2008). خواص ضدمیکروبی یک فیلم نانوکامپوزیتی ضدمیکروبی مطلوب به علت عوامل ضدمیکروبی طبیعی درون آن است (Rhim and Ng, 2007). نانوکامپوزیت‌های ضدمیکروبی دارای نسبت سطح به حجم بالا و افزایش واکنش‌پذیری عوامل ضدمیکروبی نانوذره هستند که آنها را قادر به غیرفعال کردن مؤثرتر میکروارگانیسم‌ها نسبت به مقیاس میکرو یا ماکرو همان مواد می‌سازد (Damm *et al*., 2008).

Moran و همکاران در سال ۲۰۱۳ با به دست آوردن فیلم نانوبیوکامپوزیت جدید نشاسته و سلولز نشان دادند خواص مکانیکی فیلم نشاسته بومی به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافته است. استفاده از عصاره‌های طبیعی یا ترکیبات اصلی آنها (شامل اسیدهای فنلی با وزن مولکولی پایین، تانن‌ها، پروآنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، همچنین آنتوسیانین‌ها یا فلاونول‌ها) برای کاربردهای بسته‌بندی غذایی در سال‌های اخیر رو به افزایش است (Smith-Palmer *et al*., 2001; Bañón *et al*., 2007; Carpenter *et al*., 2007; Negi, 2012).

اما بعضی از مواد شیمیایی فوق برای اتصال مستقیم به ماده خوراکی فرار هستند و زمان استفاده در بسته‌بندی انتشار می‌یابند و وارد مواد غذایی می‌شوند (Burt, 2004; Del 2009; Gutiérrez *et al*., 2009). در این حالت، مواد فعال ضدمیکروبی به ماتریس پلیمر متصل می‌شوند و سپس آنها می‌توانند به‌تدریج از مواد بسته‌بندی روی سطح ماده غذایی در طول مدت‌زمان ماندگاری ماده خوراکی بسته‌بندی‌شده انتشار یابند. هدف، حداقل انتشار عصاره و در عین حال بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد باکتریایی است (Gutiérrez *et al*., 2009).

در سیر ماده‌ای بنام آلیین وجود دارد که بعد از خرد شدن توسط آنزیم آلیناز تبدیل به آلیسین می گردد (شکل ۱). این ماده به عنوان یک ضدمیکروب بسیار قوی در برابر بسیاری از میکروب‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها عمل می‌کند (Saad *et al*., 2013). Victor و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سیر فعالیت ضدمیکروبی بسیار قوی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلای، سودوموناس ائروجینوزا و سالمونلا تایفی دارد (Victor et al., 2012). Jebali و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه خود نشان دادند که نانوذرات سلولز کونژوگه شده با آلیسین اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی

[1] Antimicrobial Carriers

www.SID.ir

Archive of SID

بالایی از خود نشان می‌دهند. آنها ادعا نمودند که می‌توان از این نانو ساختار جدید درون غذا یا در سطح بسته‌بندی استفاده کرد (Jebali *et al*., 2013). هدف این مطالعه ساخت بیوفیلم جدید بر پایه مواد طبیعی شامل نانوذرات نشاسته، نانوذرات سلولز و عصاره سیر و سپس بررسی خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم ساخته‌شده بدون حضور ماده غذایی و در حضور ماده غذایی بود.

مواد و روش‌ها

برای تهیه بیوفیلم نخست نانوذرات سلولز و نشاسته و عصاره آبی سیر تهیه و سپس مخلوط شدند.

- سنتز عصاره سیر

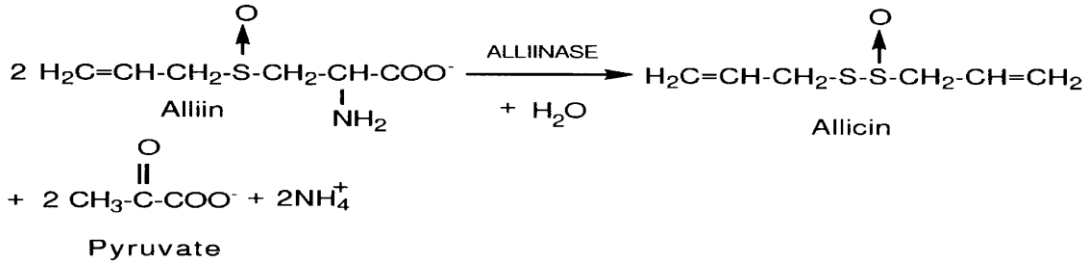
نخست g ۳۰ سیر تازه خریداری شده از بازار (پوست، ریشه و جوانه جدا شده) توسط هاون (با الکل استریل شده) کاملاً له شده و داخل ظرف استریل قرار داده شد. سیرهای باقی‌مانده در هاون با سرم فیزیولوژی مخلوط شده و به ظرف استریل انتقال داده شد. همچنین mL ۳۰ سرم فیزیولوژی علاوه بر موارد قبلی از طریق استوانه مدرج به ظرف حاوی سیر له‌شده اضافه شد. سپس گلوله‌های سرامیکی درون ظرف استریل گذاشته و به شدت بهم زده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون تهیه‌شده به مدت ۱۰ دقیقه روی میکسر قرار گرفت، و آنگاه به مدت ۱ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار داده شد. درنهایت بعد از انکوباسیون با استفاده از فیلتر پنبه‌ای استریل توده‌های سلولی سیر از عصاره جدا شدند و mL ۴۰ عصاره آبی سیر به دست آمد(Palaksha *et al*., 2010; Durairaj *et al*., 2009).

- سنتز نانوذرات نشاسته

نخست g ۳۰ گرانول نشاسته معمولی تجاری توسط هاون کاملاً به‌صورت پودر درآمده و سپس درون ارلن ریخته شد و با mL ۷۵ آب مقطر مخلوط گردید. ارلن روی شیکر قرار گرفت و mL ۵۰ اتانول ٪ ۷۰ به‌صورت قطره‌قطره با استفاده از سمپلر به ارلن اضافه گردید تا الکل و محلول کاملاً مخلوط شوند. بدین شکل مخلوطی از نانوذرات و ذراتی در ابعاد میکرونی ساخته می شود. در مرحله بعد سوسپانسیون تهیه‌شده حاوی نانوذرات در ۳۷°C خشک گردید تا الکل و آب موجود در آن تبخیر گردد. درنهایت نانوذرات سنتز شده به حجم mL ۱۰۰ رسید و در حضور گلوله‌های سرامیکی به‌شدت هم زده شد (Moran *et al*., 2013).

- سنتز نانوذرات سلولز

نخست g ۱۰ پنبه درون لوله آزمایش قرار گرفت. سپس mL ۷۰ اسیدسولفوریک غلیظ وmL ۳۰ آب مقطر داخل استوانه مدرج ریخته شد تا اسیدسولفوریک تقریباً ٪ ۷۰ تولید شود. این مخلوط چند دقیقه داخل یخچال قرار گرفت تا کمی سرد شود، چون واکنش گرمازا است. کل اسیدسولفوریک به لوله حاوی پنبه اضافه و کاملاً هم زده شد. بعد از یک دقیقه یعنی بعد از هیدرولیز کامل پنبه، برای خنثی کردن اسید موجود در لوله و رسوب نانوذرات از ۲mL محلول ۵ مولار NaOH استفاده گردید. در این مرحله برای بهتر مخلوط شدن و ریزتر شدن ذرات از گلوله‌های سرامیکی استفاده گردید. ارلن به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. درنهایت ذرات سنتز شده سه بار با آب مقطر شستشو داده شد که این کار با کمک سانتریفوژ با دور RPM ۳۰۰۰ انجام گردید. نانوذرات شستشو داده‌شده در نهایت به حجم mL ۱۰۰ رسانده شد (Jebali *et al*., 2013).



شکل ۱. تشکیل آلیسین از آلیین موجود در سیر (Ankri and Mirelaman, 1997)

www.SID.ir

Archive of SID

- تولید بیوفیلم

تمامی سوسپانسیون نانوذرات نشاسته و سلولز سنتز شده (۲۰۰ میلی لیتر) درون ارلن مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا به‌طور کامل هم زده شوند. سپس ارلن به مدت ۱۵ دقیقه روی حرارت شعله قرار داده شد تا بجوش آیند. سپس بسیار سریع به ۴۰ میلی لیتر سوسپانسیون عصاره سیر اضافه گردید. در مرحله بعد مخلوط تهیه‌شده به‌سرعت روی پلاستیک پلی اتیلن (PE) ریخته شد و به‌طور یکنواخت پخش گردید تا لایه نازکی ایجاد شود. سپس سینی به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد تا کمی سرد شود. در نهایت سینی حاوی بیوفیلم داخل انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ قرار داده شد (Moran *et al*., 2013).

- تأیید نانوذرات

برای اثبات نانوذره بودن سلولز و نشاسته از نانوذرات نشاسته و سلولز cc ۱ برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی طبق پروتکل استاندارد آن نمونه‌برداری گردید و به مرکز مجری آن ارسال شد.

- بررسی خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم تهیه شده

نخست قطعات cm ۱×۱ از بیوفیلم به‌طور جداگانه بر روی محیط کشت نوترینت آگار (تلقیح شده با میکروب‌های استاندارد) قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در $^{\circ}c$ ۳۷ انکوبه گردید. در این مطالعه ۴ سوش استاندارد شامل: استافیلوکوکوس اورئوس[1] (S. aureus)، اشریشیا کلای[2] (E. coli)، کاندیدا آلبیکنس[3] (C. albicans) و آسپرژیلوس نایجر[4] (A. niger) مورد استفاده قرار گرفتند. بدین‌صورت که نخست یک کلنی از میکروب‌های فوق به‌طور جداگانه روی محیط نوترینت آگار قرار داده و در همه جهات با کمک لوپ در نزدیکی شعله، تلقیح صورت پذیرفت. لازم به ذکر است که قطعات از جهتی بر روی پلیت آگار قرار گرفت تا بیوفیلم ساخته‌شده در معرض میکروب‌ها قرارگیرد. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته پلیت‌ها از نظر قطر هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر زمان بر ماندگاری خاصیت ضدمیکروبی، در زمان‌های مختلف (در هفته‌های اول، دوم، سوم،... تا ششم) بعد از تهیه بیوفیلم این آزمون جمعاً با ۳ تکرار انجام گرفت و میانگین آنها گزارش گردید.

- بررسی خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم تهیه‌شده در حضور ماده غذایی (شیر)

نخست ۲۰۰ میلی‌لیتر شیر استریلیزه درون بشر ریخته و سپس به آن ۱ کلنی از میکروب‌های استاندارد فوق تلقیح و به‌شدت بهم زده شد. دایره‌ای به قطر cm ۳/۵ از نمونه بیوفیلم با قیچی استریل بریده و درون ظرف به‌صورت افقی گذاشته و سپس mL ۵۰ شیر روی آن اضافه گردید (زیرا قاعدتا این بیوفیلم باید بصورت لایه ی داخلی بسته بندی غذا و مایعات بکار رود و در تماس مستقیم با آن باشد). همچنین mL ۵۰ شیر داخل ظرف دیگری بدون بیوفیلم ریخته شد. درنهایت درب آنها بسته شد. این کار ۲ بار صورت گرفت. همه نمونه‌ها به دمای $^{\circ}C$ ۴ منتقل شد. در فواصل زمانی هفته ای یکبار شامل ۱ تا ۵ هفته از شیرها نمونه‌گیری شد و تعداد کلنی شمارش و گزارش گردید.

- روش تلقیح و نمونه‌برداری از شیر

به علت افزایش رشد میکروبی نمونه‌های شیر رقیق شد. بدین صورت که µL ۱۰ میکرولیتر از شیر (کنترل و تست) با mL ۳ آب مقطر استریل مخلوط و µL ۵ از آن نمونه‌برداری و روی محیط نوترینت آگار تلقیح گردید. بعد از ۲۴ ساعت تمامی کلنی‌ها شمارش گردید.

- تجزیه و تحلیل آماری

بعد از به دست آمدن نتایج و گرفتن میانگین جمعاً حاصل ۳ بار تکرار هر آزمون، جهت پی بردن به اختلاف معنی‌دار با نرم‌افزار SPSS، تست آماری t-test در $p< ۰/۰۵$ انجام شد.

یافته‌ها

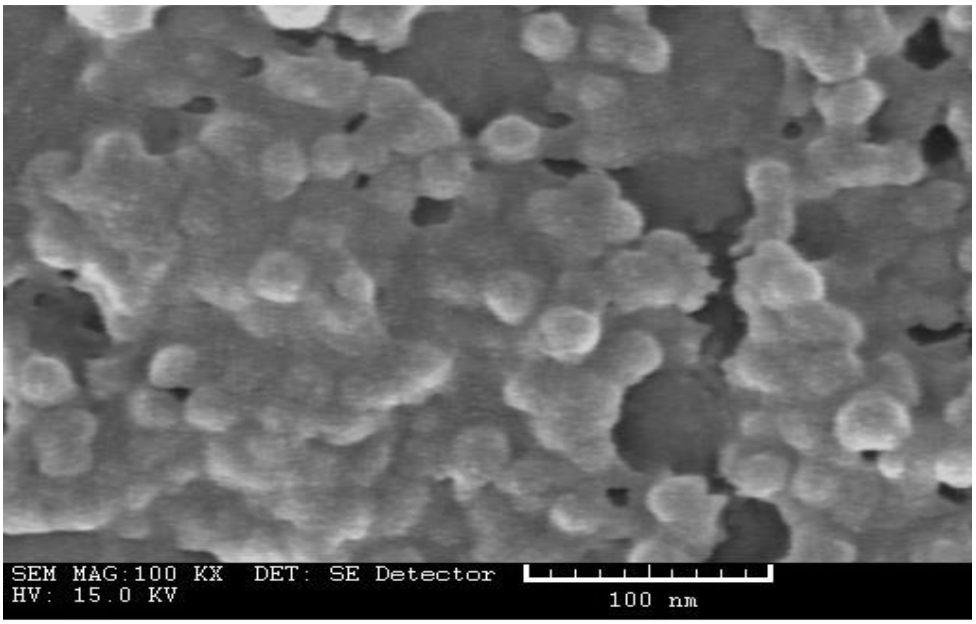
- تأیید ایجاد نانوذرات

شکل‌های شماره ۲ و۳ بیانگر عکس‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات نشاسته و سلولز (با اندازه ۵ تا ۱۰۰ نانومتر) است.

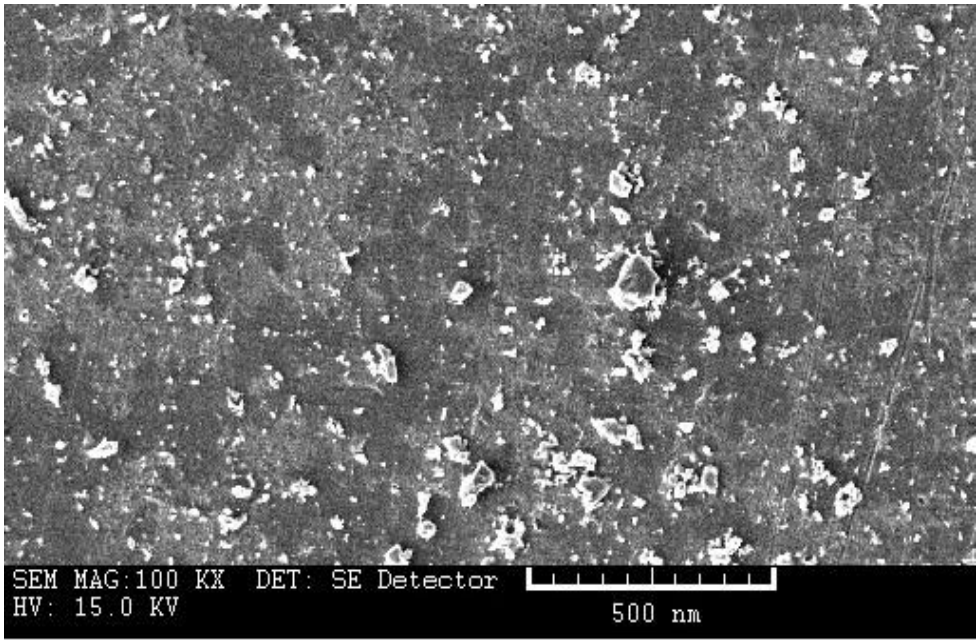
[1] Staphylococcus Aureus [2] Escherichia Coli [3] Candida Albicans [4] Aspergillus Niger

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات نشاسته



شکل ۳- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات سلولز

- بررسی خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم سنتز شده بدون حضور ماده غذایی (تست هاله عدم رشد)

نمودارهای ۱، ۲، ۳، ۴ به ترتیب قطر هاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس را طی ۱ تا ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال (۴ $^{\circ}C$) را نشان می‌دهد.

همان‌طور که در E. coli (نمودار ۱) مشاهده می‌گردد، بیوفیلم سنتز شده در هفته اول دارای قطر هاله عدم رشد نزدیک به ۶ cm بوده و سپس در هفته دوم به حدود ۸/۵cm می‌رسد. از هفته دوم به بعد هاله عدم رشد آن تقریباً در همین سایز باقی می‌ماند. به دلیل اینکه تمامی موارد دارای $P<0/05$ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد E. coli در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم مشاهده گردید (p_{value}= ۰/۰۰۱۵).

www.SID.ir

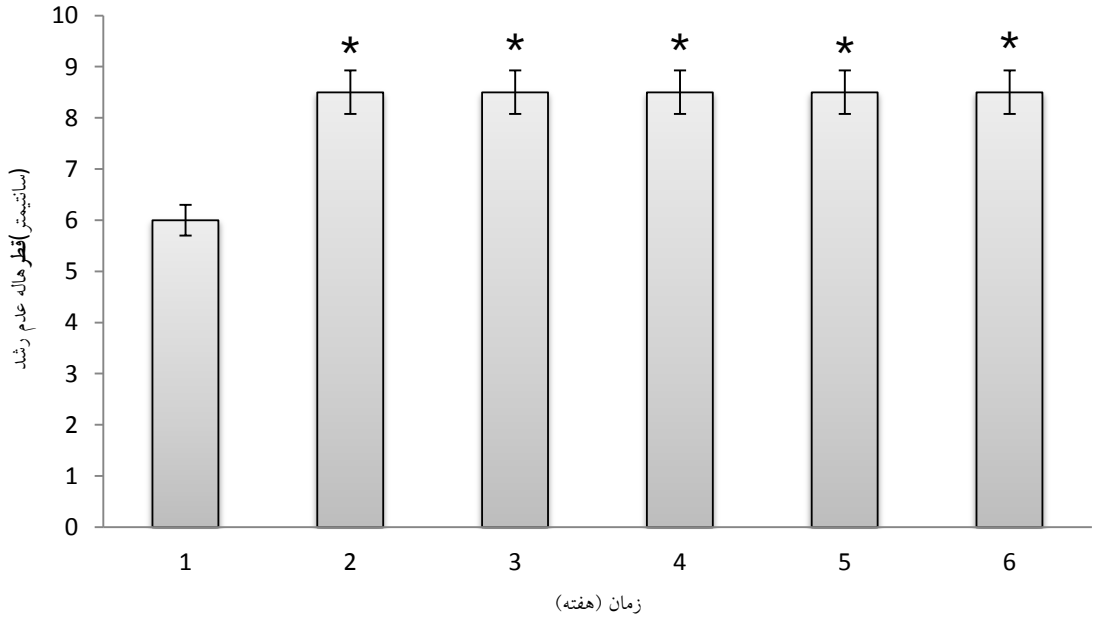
Archive of SID

در مورد S. aureus (نمودار ۲) در هفته اول بیوفیلم سنتز شده دارای قطر هاله عدم رشد ۳/۵ cm بوده و سپس در هفته دوم این قطر به حدود ۵ cm رسیده (p_{value}= ۰/۰۰۴) و در هفته سوم به حداکثر سایز خود یعنی حدود ۶ cm رسید (p_{value}= ۰/۰۰۱۵). این در حالی است که در هفته‌های ۴-۵-۶ مقدار قطر هاله عدم رشد تقریباً ثابت بود (p_{value}= ۰/۰۰۲). به دلیل اینکه تمامی موارد دارای P<۰/۰۵ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد S. aureus در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم دیده شد.

در مورد A. niger (نمودار۳) در هفته اول قطر هاله عدم رشد حدود ۴/۵ cm و در هفته دوم حدود ۵/۵cm (p_{value}= ۰/۰۰۹۷) و در هفته سوم حدود ۶/۵ cm گردید (p_{value}= ۰/۰۰۲۴) و از هفته ۴ به بعد مقدار هاله عدم رشد کمی کاهش یافت و به حدود قطر 5cm رسید (هفته چهارم: p_{value}= ۰/۰۰۵۸) ، (هفته پنجم: p_{value}= ۰/۰۰۸) و (هفته ششم: p_{value}= ۰/۰۳۵). به دلیل اینکه تمامی موارد دارای P<۰/۰۵ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد A. niger در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم مشاهده گردید.

همچنین در مورد C. albicans (نمودار ۴) تقریباً چنین الگویی دیده شد به‌نحوی‌که در هفته اول قطر هاله عدم رشد نزدیک به ۲/۵ cm و در هفته دوم نزدیک به ۵/۵ cm (p_{value}= ۰/۰۰۱۱) و در هفته سوم به حداکثر سایز خود نزدیک به ۶/۵ cm رسید (p_{value}= ۰/۰۰۰۶) و هفته چهارم قطر هاله عدم رشد به‌طور یکنواختی کاهش یافت و به قطر ۵/۹ cm (p_{value}= ۰/۰۰۰۸) ، هفته پنجم ۵/۶ cm (p_{value}= ۰/۰۰۱) و هفته ششم ۵ cm (۰/۰۰۱۵ =p_{value}) رسید. به دلیل اینکه تمامی موارد دارای P<۰/۰۵ می‌باشند، از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد C. albicans در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته‌های دوم تا ششم وجود دارد.

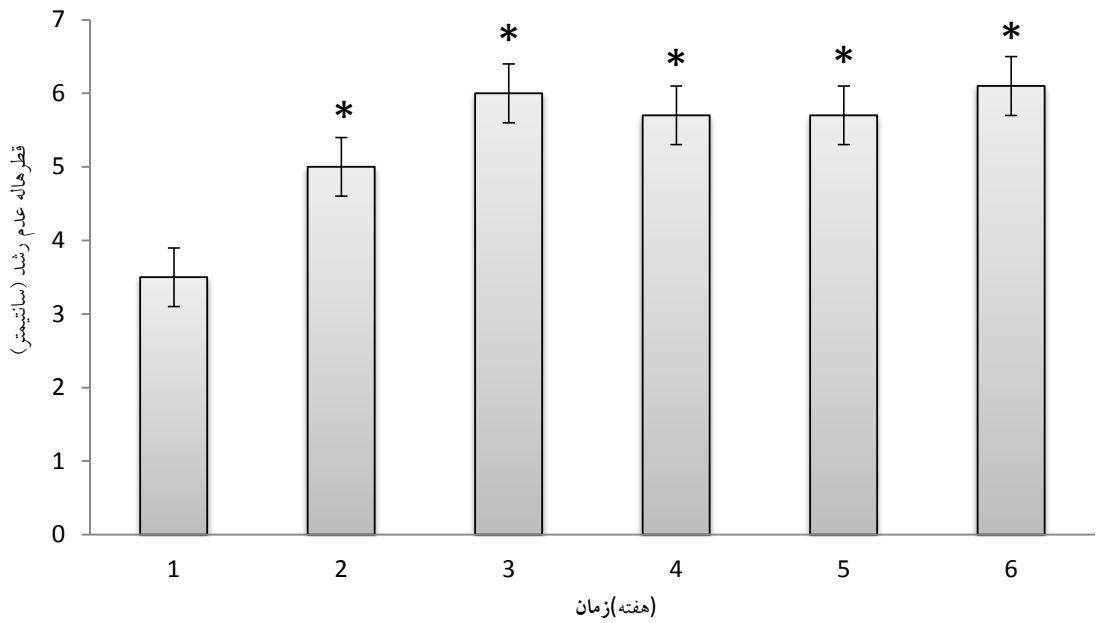
بنابراین از نظر آماری رابطه معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد همه میکروب‌های موردبررسی در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب‌ها در سایر هفته‌ها مشاهده گردید (P<۰/۰۵). گروه‌های معنی‌دار درروی نمودار با علامت ستاره مشخص‌شده‌اند.



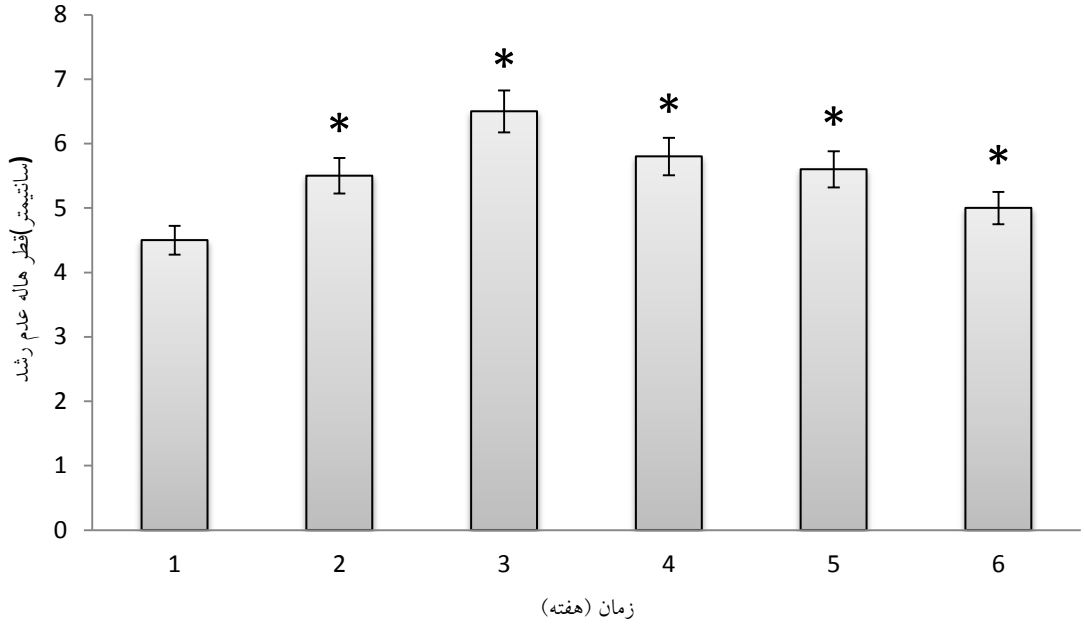
نمودار ۱- قطرهاله عدم رشد باکتری اشریشیا کلی طی ٦ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (٤°C). علامت ستاره معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p_{value} کمتر از 0.05 نشان می‌دهد. در این بخش آزمون آماری t-test استفاده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



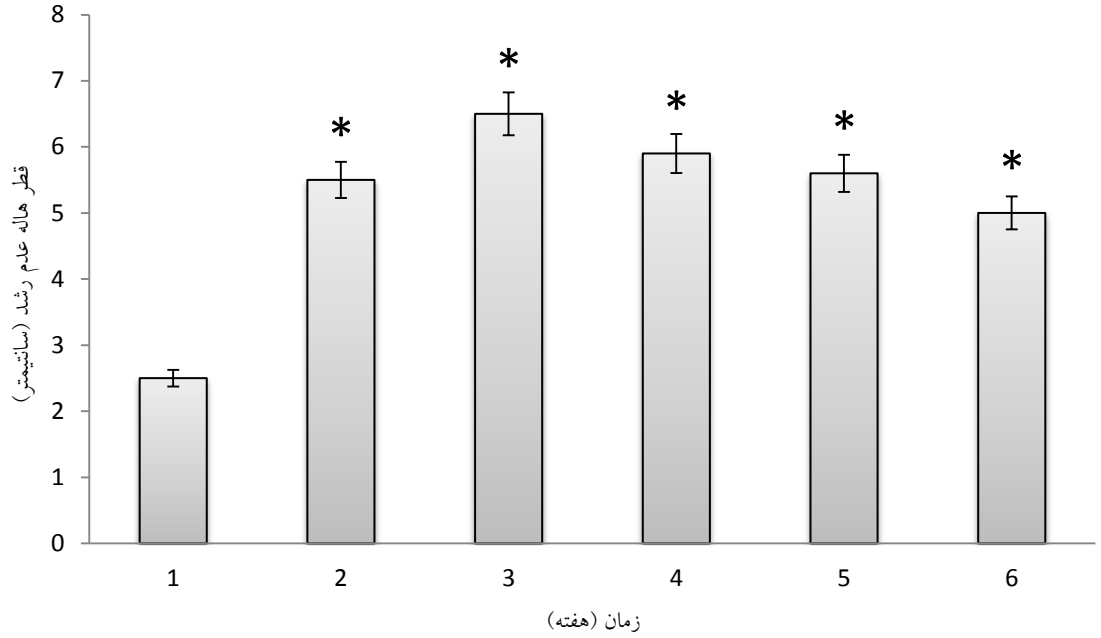
نمودار ۲ – قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس طی ٦ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (٤°C). علامت ستاره، معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p_{value} کمتر از۰/۰۵ نشان می‌دهد. در اینجا نیز آزمون آماری t-test استفاده شده است.



نمودار ۳– قطر هاله عدم رشد آسپرژیلوس نایجر طی ٦ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (٤°C). علامت ستاره، معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p_{value} کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد. در این بخش آزمون آماری t-test بکار رفته است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ٤- قطر هاله عدم رشد کاندیدا آلبیکنس طی ٦ هفته نگهداری بیوفیلم در دمای یخچال (٤ ˚C). علامت ستاره، معنی‌داری را از نظر قطر هاله عدم رشد این میکروب در هفته اول با قطر هاله عدم رشد این میکروب در سایر هفته‌ها را با p_{value} کمتر از ۰/۰۵ نشان می‌دهد. در این بخش هم آزمون آماری t-test استفاده شده است.

- بررسی خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم سنتزشده در حضور ماده غذایی

همان‌طور که در روش کار ذکر گردید بیوفیلم سنتز شده به مدت ۵-۱ هفته در معرض شیر آلوده قرار گرفت و بار میکروبی آن طی زمان‌های پیش گفت (تا ۵ هفته) گزارش گردید.

نمودار ۵ بیانگر بار میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۵-۱ هفته است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، طی هفته ۵-۱ به‌صورت صعودی بار میکروبی از CFU/mL۵۰۰۰۰۰۰ به حدود ۲۵ میلیون CFU/mL رسید.

نمودار ۶ بیانگر بار میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۵-۱ هفته که در حضور بیوفیلم سنتز شده قرارگرفته بود، است.

به‌وضوح می‌توان دید که بار میکروبی شیر موردمطالعه در همه هفته‌ها کمتر از کنترل بوده و این نشانگر عملکرد خوب بیوفیلم ساخته‌شده می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد بار میکروبی در هفته اول حدود CFU/mL۱۰۰۰۰۰۰ بوده و در هفته دوم بار میکروبی کاهش و به حدود CFU/mL ۱۰۰۰۰۰ رسید و در هفته سوم هیچ میکروبی رشد نکرده و بار میکروبی صفر بود. اما به‌طور جالب در هفته چهارم و پنجم باز هم کمی بار میکروبی داشتیم و به نظر می‌رسد بار میکروبی در حال افزایش است. ازنظر آماری بار میکروبی در تمام هفته‌ها در لوله آزمون با بار میکروبی لوله کنترل دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

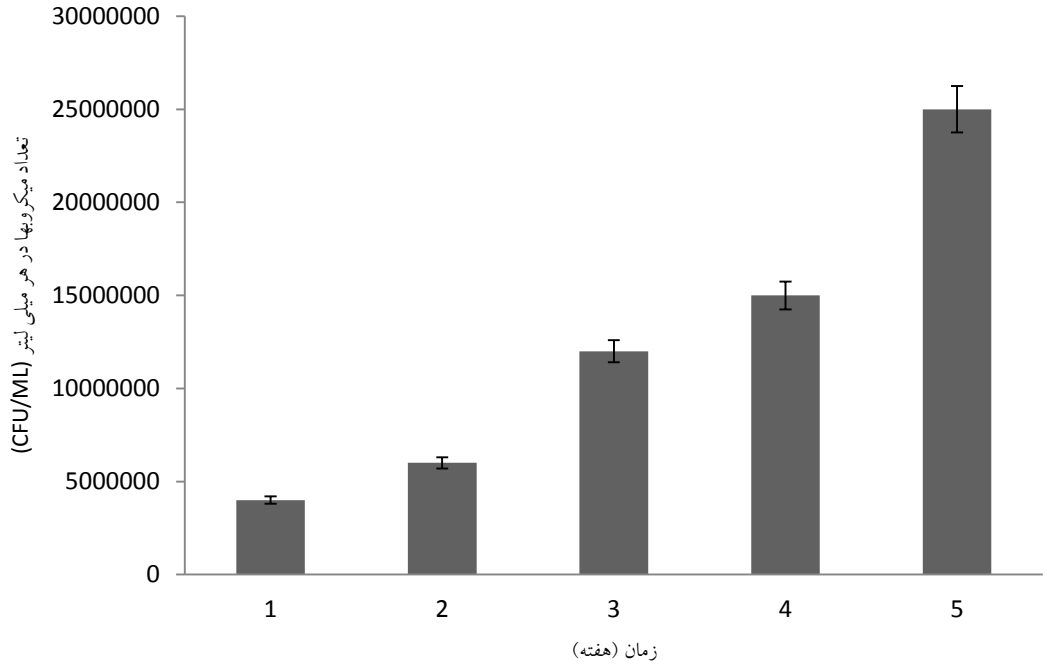
بحث

بیوفیلم شامل پوششی است که دارای یک یا چند جزء بیولوژیک است که این اجزای بیولوژیک می‌توانند زنده یا بدون حیات باشند. در این مطالعه هر سه جزء مورداستفاده از مواد طبیعی و بیولوژیک می‌باشند، که به‌صورت نانوکامپوزیت در کنار هم قرارگرفته‌اند.

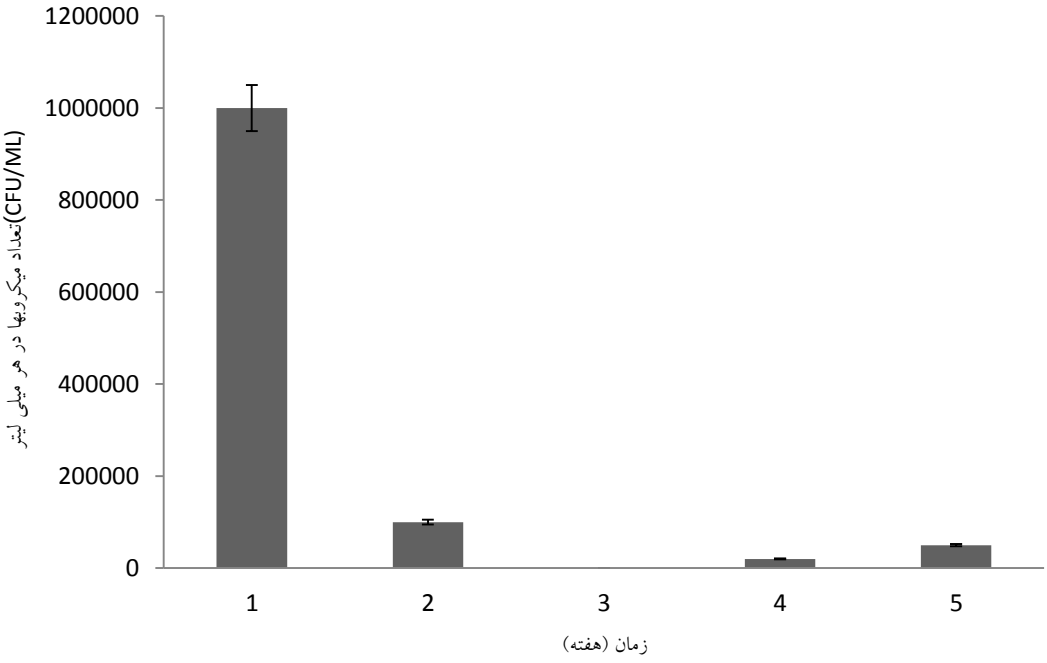
انگیزه اول استفاده از نانوذرات سلولز و نانوذرات نشاسته در این مطالعه زیست تجزیه‌پذیری این دو ماده بود. هدف ما بهبود خواص مکانیکی و ممانعت پذیری بیوفیلم نهایی بود (Sozer *et al*., 2011). لازم به ذکر است که نه نانوذرات نشاسته و نه نانوذرات سلولز هیچ‌کدام خاصیت ضدمیکروبی ندارند (بر اساس پژوهش‌های قبلی نویسندگان، از جمله رفرانس Jebali et al., 2013). تولید

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۵- شمارش کلی میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۵-۱ هفته بدون حضور بیوفیلم.



نمودار٦- شمارش کلی میکروبی شیر آلوده در بازه زمانی ۵-۱ هفته در حضور بیوفیلم.

الیاف سلولزی در ابعاد نانو و کاربرد آن در مواد کامپوزیتی با توجه به قدرت بالا و سفتی آنها همراه با وزن کم و زیست تخریب پذیربودن و قابلیت تجدید پذیر بودن در حال افزایش است. استفاده از نانو الیاف سلولز در تقویت پلیمر در حوزه پژوهش نسبتاً جدید است (Plackett and Siro, 2010). مواد بر پایه نشاسته به‌طور گسترده به‌عنوان محصول انتخابی در بهبود زیست تجزیه‌پذیر کردن پلاستیک‌های مختلف بررسی‌شده است. با این وجود

www.SID.ir

Archive of SID

شکنندگی نشاسته احتیاج به استفاده از پلاستیزایزرها ازجمله پلی ال دارد که انعطاف‌پذیری نشاسته را افزایش و خواص ترمودینامیکی آن را کاهش می‌دهد. افزودن ویسکرها به سیستم نشاسته خواص ترمودینامیکی آن را افزایش می‌دهد، حساسیت به آب را کاهش می‌دهد و خواص تجزیه‌پذیری زیستی آن را حفظ می‌کند. جذب آب توسط فیلم نشاسته با افزایش محتوای ویسکر سلولز به‌صورت خطی یا تقریباً خطی کاهش می‌یابد و همچنین کاهش شکنندگی نشاسته با ویسکرهای سلولز نیز گزارش‌شده است (De Azeredo and Henriette, 2009). استفاده از پرکننده‌هایی که حداقل یک وجه در گستره نانومتری دارند (نانوذرات) پلیمرهای نانوکامپوزیت را تولید می‌کنند (Alexanddre and Dubios, 2000). در نانوکامپوزیت های پلیمری نسبت به کامپوزیت‌های معمولی برهم کنش بهتری بین ماتریس پلیمر و فیلر وجود دارد. توزیع یکنواخت نانوذرات در ماتریس پلیمری موجب افزایش سطح تماس ماتریس و نانوذرات می‌شود که این اتفاق بهبود خواص مکانیکی، گرمایی و ممانعتی را در پی دارد (Rhim *et al*., 2013). پلی اتیلن بکاررفته در این تحقیق قابلیت دوخت پذیری دارد و به کمک حرارت می‌توان آن را براحتی به دیگر لایه‌های پلی اتیلن چسباند تا نفوذناپذیر شود. پس برای بسته بندی مواد غذایی مناسب است. البته می‌توان بجای پلی اتیلن، پلیمرهای زیست تخریب پذیر را هم برای این نوع بسته بندی آزمود. یکی از محدویت های این مطالعه، عدم بررسی خواص مکانیکی و زیست تخریب پذیری این بیوفیلم بود.

علت اصلی فساد میکروبی بسیاری از مواد غذایی نگهداری شده در یخچال، رشد میکروبی در سطح محصول است. استفاده از عوامل ضدمیکروب در تهیه ماده بسته بندی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم که می‌تواند در ماده غذایی بسته‌بندی‌شده یا ماده بسته‌بندی موجود باشد، سودمند است و ازاین‌رو باعث افزایش ماندگاری می‌گردد. پژوهش‌های انجام‌شده در این رابطه نشان می‌دهد که استفاده از فیلم‌های ضدمیکروب در مقایسه با افزودن مستقیم ماده ضدمیکروب بسیار موثرتر است، زیرا ترکیب ضدمیکروب به‌کندی از سطح بسته‌بندی به ماده غذایی آزاد می‌شود و غلظت موردنیاز برای جلوگیری از رشد میکروبی حفظ می‌گردد (Ankri & Mirelman, 1999; Silveria, 2007 and Hotckie, 2002). طبق مطالعات گذشته عصاره سیر که حاوی مولکول آلیسین است، دارای خاصیت ضدمیکروبی است و علیه میکروب‌های پاتوژن و غیرپاتوژن می‌تواند عمل کند. ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها به‌شدت تحت تأثیر آلیسین قرارگرفته و به راحتی از بین می‌روند (Ankri & Mirelman, 1999). این ترکیب فعالیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به استرپتومایسین[1] و آمپی‌سیلین[2] نشان داد (Ilic *et al*., 2012). Joe و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که خواص ضدباکتریایی و ضدقارچ آب سیر به علت مهار سوکسنیک دهیدروژناز از طریق غیرفعال کردن گروه تیول است (Joe *et al*., 2009). Hovana و همکاران (۲۰۱۱) ثابت کردند استفاده از سیر به‌صورت خام، به‌طور مستقیم یا به‌صورت حل‌شده خاصیت ضدمیکروبی بالاتری دارد (Hovana *et al*., 2011). اگرچه عصاره سیر طعم و بوی خاص خود را دارد ولی شاید بتوان با افزودن مواد دیگری (طی پژوهش های دیگر) این ویژگی منفی را پوشانید. علت استفاده از شیر در این مطالعه، اهمیت بسته‌بندی آن و سهولت کاربرد آن بعنوان یک مدل ماده غذایی مایع بود.

نانوذرات سلولز دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد بوده و می‌تواند با انواع مواد کونژوگه شود. در مطالعه‌ای نانوذرات سلولز کونژوگه شده با لیزوزیم و نانوذرات سلولز کونژوگه شده با آلیسین سنتز شدند و خاصیت ضدمیکروبی این ترکیبات بررسی گردید. بعد از بررسی مشخص گردید که نانوذرات کونژوگه شده با لیزوزیم و آلیسین دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند (Jebali *et al*., 2013).

چون این بیوفیلم برای اولین بار تهیه گردید، غلظت مورد استفاده از سه جزء فوق در بیوفیلم موردمطالعه قرار گرفت تا بیوفیلمی با قوام مطلوب ظاهری ایجاد شود. بیوفیلم سنتز شده نمی‌بایست شکننده و یا حالت ژل‌مانند داشته باشد. این بیوفیلم نباید بسیار سخت و محکم باشد. بر اساس تجارب آزمایشگاهی و آزمون‌های اولیه‌ای که برای این کار لحاظ شد نسبت مناسبی از آلیسین و نانوذرات نشاسته و نانوذرات سلولز انتخاب گردید و خاصیت ضدمیکروبی آن طی زمان‌های مختلف بررسی گردید.

[1] Streptomycin [2] Ampicillin

www.SID.ir

Archive of SID

قبل از بررسی خواص ضدمیکروبی، رنگ بیوفیلم باید مورد بررسی قرار می‌گرفت. رنگ بیوفیلم نخست زرد، سپس قهوه‌ای و درنهایت بعد از دو هفته رنگ آن به‌طور کامل سیاه شد. البته رنگ بصورت عددی و نرم افزاری بررسی نشد که جزء محدودیت‌های این مطالعه است. علت این تغییر رنگ شاید به دلیل وجود آنزیم‌های پلی فنل اکسیداز[1] موجود در عصاره سیر باشد، به دلیل اینکه در این مطالعه ماده مخربی که باعث از بین رفتن آنزیم پلی فنل اکسیداز شود، استفاده‌نشده است. پلی فنل اکسیدازها آنزیم‌هایی هستند که سبب ایجاد رنگ قهوه‌ای در مواد غذایی می‌شوند. از این نظر واکنش‌های مربوطه، به قهوه‌ای شدن آنزیمی[2] معروف است. پلی فنلاز یا فنلاز نیز به این گروه از آنزیم ها اطلاق می‌شود. این آنزیم‌ها دارای فلز مس هستند و بدون وجود این عنصر قادر به فعالیت نمی‌باشند. این‌ها اورتو- دی هیدروکسی فنل[3] را به اورتو- کینون[4] تبدیل می‌کنند (Amito *et al.*, 1992; Coseteng and lee, 1987). واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی، اکسایشی است و در صورت احیا می‌توان جلوی آنها را گرفت. پلی فنلاز باعث اکسایش می‌شود و نانوذره توانسته است روند اکسایش قهوه‌ای شدن را تسریع نماید. چنانچه در آینده از این بیوفیلم جهت مقاصد تجاری استفاده گردد، می‌بایست این آنزیم با انواع روش‌های شیمیایی یا فیزیکی مهار گردد. حتی شاید بتوان با اضافه کردن رنگدانه‌های دلخواه رنگ مطلوب موردپسند بازار نیز ایجاد نمود.

نتایج ضدمیکروب بدون حضور ماده غذایی نشان داد که در بین میکروب‌های موردبررسی E. coli بهترین جواب را داده بدین معنی که مواد آزادشده از بیوفیلم به‌طور صد در صد بر روی E. coli تأثیر داشته و این خاصیت تا ۶ هفته ادامه یافته است. اما در مورد سایر میکروب‌های مورد بررسی حداکثر توانایی بیوفیلم در هفته سوم مشاهده گردید. یعنی طی این سه هفته حداکثر آزادسازی و حداکثر توان ضدمیکروبی وجود دارد. در مورد سوش های قارچی نکته قابل‌توجه آنکه با گذر زمان از ۳ هفته به ۶ هفته مقدار هاله عدم رشد در حال کاهش بود و این امر شاید به دلیل خواص متفاوت بیوشیمیایی و فیزیولوژیک قارچ‌ها و باکتری‌های موردمطالعه باشد. علت کم بودن قطر هاله عدم رشد برای هر چهار میکروب مورد بررسی در این مطالعه به علت مقدار انتشار کم مواد ضدمیکروب موجود در بیوفیلم بود.

آزمون اصلی که در این مطالعه انجام شد و نتایج آن در نمودارهای ۵ و ۶ ذکر گردید، بیانگر اثر بسیار مطلوب بیوفیلم سنتز شده در حضور شیر آلوده بود. این مطالعه نشان می‌دهد که نتایج آزمون بیوفیلم در حضور ماده غذایی همگام با نتایج هاله عدم رشد است. تعداد کم میکروب‌ها در شمارش کلنی در هفته چهارم و پنجم در حضور بیوفیلم سنتز شده شاید به دلیل ایجاد مقاومت میکروبی به مواد ضدمیکروب ترشح‌شده از بیوفیلم یا اینکه به دلیل کاهش یا نبود مواد ضدمیکروبی باشند. یعنی شاید تا ۳ هفته هر ماده ضدمیکروبی که در بیوفیلم بوده آزادشده و دیگر ماده ضدمیکروب دیگری نمانده است که بتواند میکروب‌های موجود را از بین ببرد. در لوله آزمون که هیچ بیوفیلمی مورداستفاده قرار نگرفته بود، رشد کلنی به‌صورت صعودی بوده و نشان می‌دهد که بیوفیلم در بازه زمانی به‌خوبی دارای کارایی بوده است. شاید اگر زمان بیشتری مورد مطالعه قرار می‌گرفت، الگوی رشد هم در لوله آزمون و هم لوله کنترل متفاوت می‌شد که برای اظهارنظر قاطع، این امر نیاز به آزمون دارد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که می‌توان با نانوذرات نشاسته، سلولز و عصاره سیر بیوفیلم مناسبی که دارای خواص ضدمیکروبی باشد، تهیه نمود. خاصیت ضدمیکروبی بیوفیلم سنتز شده علیه میکروب E. coli در بهترین حالت ممکن بود و این در حالی است که بیوفیلم سنتز شده علیه C. albicans و A. niger در هفته سوم بهترین جواب را داده و با گذشت زمان از کارایی آن کم می‌گردد. هم باکتری‌های گرم منفی و هم باکتری‌های گرم مثبت و هم مخمر و هم قارچ میسلیال در برابر مواد ضدمیکروب آزادشده از بیوفیلم حساس بوده‌اند و مانع رشد آنها می‌گردد. بررسی خاصیت ضدمیکروبی در حضور شیر آلوده به ما نشان داد که به‌طور معنی‌داری خاصیت ضدمیکروبی

[1] Polyphenol Oxidases [2] Enzymatic Browning [3] O- dihydroxyphenol [4] Ortho- quinone

www.SID.ir

Archive of SID

بیوفیلم سنتز شده بسیار بالا بوده و نسبت به کنترل، که حاوی هیچ‌گونه بیوفیلمی نیست بار میکروبی شدیداً افت می‌نماید. می‌توان نتیجه گرفت که تا ۳ هفته بیوفیلم سنتز شده تقریباً همه مواد ضدمیکروب خود را تقریباً ازدست‌داده و بار میکروبی تقریباً صفر می‌گردد. ولی بعد از آن بار میکروبی کمی شروع به افزایش می‌کند که این امر نیازمند مطالعات مستقل دیگری است.

سپاسگزاری

این پژوهش حاصل پایان‌نامه دانشجویی در مقطع کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی می‌باشد که در آزمایشگاه پژوهش یزد به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از همکاری مدیریت آزمایشگاه پژوهش یزد تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Alexandre, M. & Dubois, P. (2000). Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. MSE: R: Reports, 28(1), 1-63.

Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. J F SCI, 57(4), 958–962.

Ankri S., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M. & Mirelman D. (1997). Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of Entamoeba histolytica. ANTIMICROB AGENTS CH, 10, 2286–2288.

Ankri, S. & Mirelaman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. MICROBES INFECT, 2, 125-129.

Appendini, P. & Hotckie, J. (2002). Review of Antimicrobial Food Packaging. INNOV Food Sci Emerg, 3, 113-126.

Banon, S., Diaz, P., Rodriguez, M., Garrido, M. D. & Price, A. (2007). Ascorbate, green teaand grape seed extracts increase the shelf lifeo flow sulphite beef patties. MEAT SCI. 77626–633.doi:10،1016/j.meatsci.2007.05.015.

Bi, L., Yang, L., Narsimhan, G., Bhunia, A. K. & Yao, Y. (2011). Designing carbohydrate nanoparticles for prolonged efficacy of antimicrobial peptide. J Control Release, 150(2), 150-156.

Bordes, P., Pollet, E. & Avérous, L. (2009). Nano-biocomposites: biodegradable polyester / nanoclay systems. Prog Poly M Sci, 20,125–55.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications infoods-areview. Int. J. Food Microbiol. 94223–253. doi: 10،1016/ j. ijfoodmicro. 2004. 03. 022.

Carpenter, R., O'Grady, M. N., O'Callaghan, Y. C., O'Brien, N. M. & Kerry, J. P. (2007). Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bear berry extracts in raw and cooked pork. Meat Sci. 76604–610.doi: 10،1016/j.MEAT SCI.2007.01.021.

Chen, Y., Liu, C., Chang, P. R., Cao, X. & Anderson, D. P. (2009). Bionanocomposites based on pea starch and cellulose nanowhiskers hydrolyzed from pea hull fibre: effect of hydrolysis time. Carbohyd Poly M, 76(4), 607-615.

Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L., Bleve-Zacheo, T., D'alessio, M., Zambonin, P. G. & Traversa, E. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. Chem Mater, 17, 5255–5262.

Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extending shelf life of meat-based products, Meat Sci., 78, 90-103.

Coseteng, M. Y. & Lee, C. Y. (1987). Changes in apple polyphenol oxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. J Food Sci., 52(4), 985–989.

Damm C, Münsted H, Rösch A. (2008). The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver nano- and microcomposites. Mater Chem Phys., 108, 61–66.

De Azeredo, H. M. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. Food Res Int, 42(9), 1240-1253.

Del Nobile, M. A., Conte, A., Incoronato, A. L. & Panza, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. J Food Eng., 89, 57-63.

Durairaj S., Sangeetha, S. & Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). In vitro antibacterial activity and stability of garlic extract at different pH and temperature. Elect Ron J Biotech., 5, 5–10.

EC. (2009). EU guidance to the commission regulation on active and

www.SID.ir

Archive of SID

intelligent materials and articles intended to come into contact with food. European Commission.

Emiroglu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K. & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Sci., 86(2), 283-288.

Grande, C. J., Torres, F. G., Gomez, C. M., Troncoso, O. P., Canet-Ferrer, J. & Martínez-Pastor, J. (2009). Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. Mat Sci Eng., 29 (4), 1098-1104.

Gutierrez, L., Sánchez, C., Batlle, R. & Nerin, C. (2009). antimicrobial active package for bakery products. Trends Food Sci Tech., 2092–99.doi: 10،1016/j.tifs.2008.11.003.

Hong, S. I., Park, J. D. & Kim, D. M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds, Food Sci Biotechnol., 9, 38-42.

Hovana, E. K., James, U. S., James, E., Egbobor, E. M., Egba, A. G., Nwachukwu, O. A. & Akpama, O.U. (2011). Antibacterial and Phytochemical Studies of Allium Sativum. New York Sci J., 4,124-128.

Ilic, D., Nikolic, V., Ciric, A., Soković, M., Stanojkovic, T., Kundakovic, T., Stankovic, M. & Nikolić, L. (2012). Cytotoxicity and antimicrobial activity of allicin and its transformation products. J. Medi. Plants Research, 6, 59-65.

Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S. H. & Behzadi, A. (2013). Antimicrobial activity of nanocellulose conjugated with allicin and lysozyme. Cellulose, 20(6), 2897-2907.

Joe, M. M., Jayachitra, J. & Vijayapriya, M. (2009). Antimicrobial activity of some common spices against certain human pathogens. J. Med Plants R 3, 1134-1136.

Morán, J. I., Vázquez, A. & Cyras, V. P. (2013). Bionanocomposites based on derivatized potato starch and cellulose, preparation and characterization. J Mater Sci., 48(20), 7196-7203.

Negi, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol.,1567–17.doi: 10. 1016 /j.ijfoodmicro. 2012.03.006.

Palaksha, M. N., Ahmed, M. & Das, S. (2010). Antibacterial activity of garlic extracts on streptomycin-resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli solely and in synergism with streptomycin. J Nat Sci Biol Med., 1, 12-15.

Pandey, J. K., Kumar, A. P., Misra, M., Mohanty, A. K., Drzal, L. T. & Palsingh, R. (2005). Recent advances in biodegradable nanocomposites. J Nanosci Nanotech O., 5(4), 497-526.

Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M. & Ng, P. K. W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. J AGR Food Chem., 54, 5814–5822.

Rhim, J. W. & Ng, P. K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. Crit Rev Food Sci., 47(4), 411-433.

Rhim, J. W., Park, H. M. & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. Prog Poly M Sci., 38(10), 1629-1652.

Saad, B. & AlBureikan, M. O. (2013). Antimicrobial Activity of Garlic Juice (Allium Sativum), Honey, And Garlic-Honey Mixture On Some Sensitive and Multiresistant Microorganisms. Life Sci J., 10(4).

Silveira, M. F. A., Soares, N. F. F., Geraldine, R. M., Andrade, N. J. & Goncalves, M. P. J. (2007). Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. Package Tech Sci., 20(4), 287-292.

Siró, I. & Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. Cellulose, 17(3), 459-494.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbial., 18, 463–470. doi: 10. 1006/ fmic. 2001،0415.

Sozer, N., Dogan, H. & Kokini, J. L. (2011). Textural properties and their correlation to cell structure in porous food materials. J Agr Food Chem., 59(5), 1498-1507.

Victor I. U. & Igeleke, C. L. (2012). Antimicrobial properties of the extracts of locally sold garlic and neem leaf in Benin City, Nigeria. Int J Biosci., 2, 21-27.

Wang, X., Du, Y., Yang, J., Wang, X., Shi, X. & Hu, Y. (2006). Preparation, characterization and antimicrobial activity of

www.SID.ir

Archive of SID

chitosan/layered silicate nanocomposites. Polymer, 47, 6738–6744.

www.SID.ir