

Preparation of Kefiran-waterborne Polyurethane Film Incorporated with *Rosmarinus officinalis* Essential Oil for Keeping Ostrich Meat

FATEMEH HEDAYATI RAD¹, ANOUSHEH SHARIFAN^{1*}, GHOLAMHASSAN ASADI¹

1. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
(Received: Apr. 23, 2019- Revised: July. 1, 2019- Accepted: July. 22, 2019)

ABSTRACT

The physicochemical and antimicrobial properties of kefiran-waterborne polyurethane blend film incorporated with *Rosmarinus officinalis* essential oil with concentrations of 2, 4, 6, 8 and 10 %v/v were investigated. By increasing the concentration of the essential oil, the scanning electron microscopy images showed inhomogeneous and pores in the films structures, while thickness of the resulting films did not show a significant difference ($p > 0.05$), but significant decrease and increase were obtained for tensile strength and elongation at break, respectively ($p < 0.05$). The water vapor permeability of films was increased up to 6% of essential oil but with further increase, it was significantly decreased ($p < 0.05$). The results of inhibition zone test showed that the antimicrobial inhibitory properties of *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Staphylococcus aureus* were greater than *Escherichia coli*. Decrease of 2, 1.7 and 1.85 logarithmic units was respectively observed in total count of microorganisms, *E. coli* and *S. aureus* on ostrich meat during 12 days of storage in the refrigerator. The produced antimicrobial film has the potential to be applied in the packaging of different food.

Keywords: Kefiran-waterborne polyurethane film, *Rosmarinus officinalis* essential oil, Antimicrobial property, Ostrich meat.

بالای آن‌ها از الاستومرها تا پلیمرهای سخت ترموپلاستیک را شامل می‌شود (Lu et al., 2005). در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی به دلیل سمیت، اشتعال پذیری و مشکلات زیست محیطی که حلال‌ها ایجاد می‌کنند، از انواع پایه آبی آن‌ها استفاده می‌گردد (Lu et al., 2005).

جهت کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها و جلوگیری از اثرات نامطلوب آن‌ها در سطح مواد غذایی، می‌توان به جای نگهدارنده‌های شیمیایی از نگهدارنده‌های طبیعی همچون اسانس‌ها در داخل بسته‌بندی‌ها استفاده نمود (Burt, 2004). رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است. ماده موثر اصلی اسانس را 1,8-cineol، camphor و verbenone تشکیل می‌دهند که اثر ضد میکروبی این منوترین‌ها به اثبات رسیده است (Preedy, 2015). اسانس رزماری به شکل مطلوبی توانسته است در زمینه افزایش زمان نگهداری و مهار رشد میکروارگانیسم‌های گوشت گوساله (Hadian et al., 2017)، شتر (Kamel, 2013)، مرغ (Mathlouthi et al., 2012)، ماهی قزل‌آلا (Ozogul et al., 2017) عمل نماید.

در پژوهش پیشین مشخص شد که فیلم ترکیبی پلی یورتان پایه آبی با کفیران به نسبت ۳۰ به ۷۰ بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را دارد (Rad et al., 2018). هدف از این تحقیق تولید فیلم پلی یورتان پایه آبی-کفیران (با نسبت ۳۰ به ۷۰) حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن علیه *S. aureus* و *E. coli* است. فیلمی که بالاترین فعالیت ضد میکروبی را داشته جهت بسته‌بندی گوشت شترمرغ انتخاب شد و تاثیر اسانس بر میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در گوشت شترمرغ در طی ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

در پژوهش پیشین مشخص شد که فیلم ترکیبی پلی یورتان پایه آبی با کفیران به نسبت ۳۰ به ۷۰ بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را دارد (Rad et al., 2018). هدف از این تحقیق تولید فیلم پلی یورتان پایه آبی-کفیران (با نسبت ۳۰ به ۷۰) حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن علیه *S. aureus* و *E. coli* است. فیلمی که بالاترین فعالیت ضد میکروبی را داشته جهت بسته‌بندی گوشت شترمرغ انتخاب شد و تاثیر اسانس بر میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در گوشت شترمرغ در طی ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دانه‌های کفیر از شرکت لبنیات کاله خریداری شده است. اسانس گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه شد. آمپول‌های حاوی سوش میکروب‌های *Escherichia coli* (PTCC 1189) و *Staphylococcus aureus* (PTCC 1399) از بانک میکروبی دانشگاه تهران فراهم گردید. ایزوفورون دی‌ایزوسیانات و پلی‌کاپرولاکتون، دی‌متیل پروپیونیک اسید، تری اتیل آمین و بوتان دی‌ال تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آلمان استفاده گردید. گلیسرول پروآنالیز ۸۳ درصد، کلرید کلسیم، تلوریت پتاسیم، قرص رینگر و محیط‌های کشت میکروبی (BHI broth, Mueller hinton agar, Nutrient agar).

مقادیر مشخص دانه کفیر به مدت ۱ ساعت در آب با دمای ۹۰ درجه سلسیوس با همزن مغناطیسی بهم زده شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۱۰۰۰۰ g در دمای ۲۰ درجه سلسیوس سانتریفیوژ (Sigma 3-k, آلمان) گردید. به منظور رسوب پلی ساکاریدهای مترشحه موجود در نمونه به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفیوژ اتانول ۹۶ درصد سرد افزوده شد. رسوب سازی پلی ساکاریدهای مترشحه به مدت ۱۸ ساعت و در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت. برای جدا کردن کربوهیدرات‌های رسوب یافته از سانتریفیوژ با شتاب ۱۰۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سلسیوس و زمان ۲۰ دقیقه استفاده گردید (Goudarzi & Shahabi-Ghahfarrokhi, 2018).

پس از تهیه کفیران برای ساخت محلول فیلم به میزان ۲ درصد وزنی/وزنی با آب مخلوط گردید. گلیسرول به عنوان پلاستی‌سایزر به میزان ۲۵ درصد وزنی/وزنی نسبت به وزن ماده خشک کفیران به محلول افزوده شد. محلول حاصل توسط همزن آهنربایی در دمای ۴۰-۵۰ درجه سلسیوس همزده شد بعد از مدت ۴۵ دقیقه محلول حاصل که مایعی شفاف و بدون لخته‌های

بالای آن‌ها از الاستومرها تا پلیمرهای سخت ترموپلاستیک را شامل می‌شود (Lu et al., 2005). در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی به دلیل سمیت، اشتعال پذیری و مشکلات زیست محیطی که حلال‌ها ایجاد می‌کنند، از انواع پایه آبی آن‌ها استفاده می‌گردد (Lu et al., 2005).

جهت کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها و جلوگیری از اثرات نامطلوب آن‌ها در سطح مواد غذایی، می‌توان به جای نگهدارنده‌های شیمیایی از نگهدارنده‌های طبیعی همچون اسانس‌ها در داخل بسته‌بندی‌ها استفاده نمود (Burt, 2004). رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از خانواده نعناعیان (*Lamiaceae*) است. ماده موثر اصلی اسانس را 1,8-cineol، camphor و verbenone تشکیل می‌دهند که اثر ضد میکروبی این منوترین‌ها به اثبات رسیده است (Preedy, 2015). اسانس رزماری به شکل مطلوبی توانسته است در زمینه افزایش زمان نگهداری و مهار رشد میکروارگانیسم‌های گوشت گوساله (Hadian et al., 2017)، شتر (Kamel, 2013)، مرغ (Mathlouthi et al., 2012)، ماهی قزل‌آلا (Ozogul et al., 2017) عمل نماید.

در پژوهش پیشین مشخص شد که فیلم ترکیبی پلی یورتان پایه آبی با کفیران به نسبت ۳۰ به ۷۰ بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی را دارد (Rad et al., 2018). هدف از این تحقیق تولید فیلم پلی یورتان پایه آبی-کفیران (با نسبت ۳۰ به ۷۰) حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن علیه *S. aureus* و *E. coli* است. فیلمی که بالاترین فعالیت ضد میکروبی را داشته جهت بسته‌بندی گوشت شترمرغ انتخاب شد و تاثیر اسانس بر میزان رشد میکروارگانیسم‌ها در گوشت شترمرغ در طی ۱۲ روز نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

دانه‌های کفیر از شرکت لبنیات کاله خریداری شده است. اسانس گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه شد. آمپول‌های حاوی سوش میکروب‌های *Escherichia coli* (PTCC 1189) و *Staphylococcus aureus* (PTCC 1399) از بانک میکروبی دانشگاه تهران فراهم گردید. ایزوفورون دی‌ایزوسیانات و پلی‌کاپرولاکتون، دی‌متیل پروپیونیک اسید، تری اتیل آمین و بوتان دی‌ال تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آلمان استفاده گردید. گلیسرول پروآنالیز ۸۳ درصد، کلرید کلسیم، تلوریت پتاسیم، قرص رینگر و محیط‌های کشت میکروبی (BHI broth, Mueller hinton agar, Nutrient agar).

سلسیوس اختلاف فشار بخاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال ایجاد می‌کند. در بازه زمانی ۲۴ ساعت، هر ساعت فنجانک‌ها را از دسیکاتور خارج شدند و وزن آن‌ها با استفاده از یک ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. نمودار اوزان فنجانک‌ها به صورت تابعی از زمان رسم شد (Barzegar et al., 2019). میزان انتقال بخار آب (Water Vapor Transmission Rates) با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد.

(رابطه ۱) مساحت سطح فیلم / شیب منحنی $WVTR =$
 WVP با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد. هر نمونه حداقل سه بار مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.
 (رابطه ۲)

اختلاف فشار / ضخامت منحنی $WVP = WVTR \times$

ویژگی‌های مکانیکی

اندازه‌گیری ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها شامل مقاومت به کشش و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی مطابق روش ASTM - D882 توسط دستگاه بافت سنج (Gotech GT-7010-D2ELP، تایوان) انجام گرفت (ASTM, 2002). فیلم‌ها در ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی متر مربع بریده شدند و مشروط کردن فیلم‌ها قبل از انجام آزمون توسط قرار دادن آن‌ها در دسیکاتور حاوی برمورسدیم در درجه حرارت ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵ درصد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. فیلم‌های مشروط شده بین فک‌ها قرار گرفتند و با سرعت 50 دقیقه بر میلی متر کشیده شدند. مقاومت به کشش^۳ (TS) و درصد ازدیاد طول^۴ (%EB) تا نقطه پارگی به ترتیب توسط فرمول‌های ۳ و ۴ محاسبه شده‌اند.

(رابطه ۳) $TS = ML / A$

ML بیشینه نیروی وارد شده به فیلم بر حسب نیوتن و A کمترین سطح مقطع عرضی اولیه فیلم بر حسب مترمربع می‌باشند.

(رابطه ۴) $\%EB = E / IL \times 100$

E مقدار اتساع تا لحظه پارگی و IL فاصله اولیه بین دو فک است. از هر نمونه حداقل با سه بار تکرار اندازه‌گیری انجام شد (Motedayen et al., 2013).

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری

آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی

ابتدا به کمک لوپ استریل مقداری از هر سوش میکروبی S.

کفیران است، سرد شد و درون ظرف شیشه‌ای در درجه حرارت ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید (Rad et al., 2018).

با توجه به نتایج مطالعه پیشین بهترین نسبت محلول WPU و محلول کفیران به ترتیب ۳۰:۷۰ گزارش شده است (Rad et al., 2018). در تحقیق حاضر جهت ساخت فیلم‌های ترکیبی از این نسبت استفاده شده و فیلم حاصل به عنوان شاهد جهت مقایسه به کار رفته است. اسانس رزماری با غلظت های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد حجمی/حجمی به محلول فیلم‌های ترکیبی افزوده شد و به ترتیب توسط کدهای RO۲، RO۴، RO۶، RO۸ و RO۱۰ نام گذاری شدند. جهت تشکیل فیلم‌های ضد میکروبی به روش کستینگ محلول‌های حاصل روی قالب‌های تفلونی با ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی متر ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فیلم‌های حاوی اسانس رزماری

میکروسکوپ الکترونی^۱ (SEM)

به منظور تعیین توزیع و بررسی تغییرات سطح فیلم‌های تولیدی از میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM; KYKY-EM3200 model، چین) استفاده شد. به منظور گرفتن عکس از سطح فیلم‌ها، آن‌ها را به وسیله چسب روی سطح پایه چسبانده شدند. پایه حامل نمونه‌های چسبانده شده در دستگاه پوشش‌دهنده طلا (KYKY-SBC-12 sputter coater، چین) قرار داده شدند. پس از لایه نشانی طلا نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی در بزرگ-نمایی‌های مختلف مورد تصویربرداری قرار گرفتند.

ضخامت

ضخامت فیلم‌ها توسط میکرومتر (Mitutoyo، چین) در ۱۰ نقطه مختلف از سطح فیلم اندازه‌گیری شدند. میانگین اعداد به دست آمده جهت تعیین نفوذپذیری به بخار آب و ویژگی‌های مکانیکی نیز مورد استفاده قرار گرفت (Barzegar et al., 2019).

نفوذپذیری به بخار آب^۲ (WVP)

انجام آزمون WVP فیلم‌ها مطابق استاندارد ASTM شماره E 96-95 انجام گرفت (ASTM, 1993). درون فنجانک‌های مخصوص کلرید کلسیم ریخته شده، توسط فیلم‌ها دهانه آن‌ها مسدود گردید. فنجانک‌ها درون دسیکاتور حاوی آب نمک (کلرید سدیم) اشباع دارای رطوبت نسبی ۷۵ درصد قرار گرفت و سنجش رطوبت درون دسیکاتور توسط رطوبت سنج (TES-1365، تایوان) انجام شد. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم‌ها در دمای ۲۵ درجه

3. Tensile strength
 4. %Elongation at break

1. Scanning Electron Microscopy
 2. Water Vapor Permeability

سطح گوشت‌ها در تماس مستقیم با لایه فیلم باشند. گوشت‌های بسته‌بندی شده در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند و در روزهای ۱، ۳، ۶، ۹ و ۱۲ مورد آنالیز میکروبی قرار گرفتند. به این منظور محلول رینگر جهت ساخت رقت اولیه و رقت‌های سریالی مورد نظر استفاده شد. برای شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت Nutrient agar، برای *S. aureus* از محیط اختصاصی Baird parker agar (حاوی سوسپانسیون زرده تخم مرغ و محلول تلوریت پتاسیم) و برای *E. coli* محیط اختصاصی Maconky agar استفاده گردید (Emiroglu et al., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار برای کلیه آزمون‌ها به جز آزمون ضخامت که ۱۰ بار تکرار شد، انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل نتایج از نرم افزار SPSS استفاده شد و جهت مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح آماری ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی ریزساختار فیلم‌های حاوی اسانس رزماری با استفاده

SEM

توسط میکروسکوپ الکترونی از سطح فیلم‌های حاوی اسانس رزماری تصویربرداری انجام شد (شکل ۱). عکس‌های به دست آمده نشان دادند که با افزایش غلظت اسانس ۲ به ۱۰ درصد اندازه قطرات اسانس‌ها در سطح فیلم‌ها بزرگتر شدند. به دلیل افزایش غلظت اسانس‌ها تصادم یا برخورد قطرات اسانس‌ها با یکدیگر بیشتر شده و یکی شدن قطرات و تشکیل قطرات بزرگتر در سطح فیلم‌ها مشاهده گردید. از طرف دیگر با توجه به ماهیت فرار اسانس‌ها در طی گذر زمان و تبخیر اسانس‌ها در سطح فیلم‌ها حفراتی مشاهده شدند. با ایجاد این حفرات ساختار یکنواخت فیلم کفیران-پلی یورتان پایه آبی بدون اسانس (شاهد) از میان رفت و ایجاد ساختار غیریکنواخت و دارای خلل و فرج در سطح فیلم‌ها شد. مشابه تحقیقات پیشین در این پژوهش نیز ثابت شده است که وجود این حفرات باعث ایجاد راهی برای خروج اسانس‌ها است که موجب بهبود خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها می‌گردد. با خروج اسانس‌ها از ماتریکس فیلم‌ها و در تماس قرار گرفتن آنها با مواد غذایی موجب از بین رفتن بیشتر میکروارگانیسم‌ها شده و در نتیجه عمر نگهداری مواد غذایی افزایش می‌یابد (Wu et al., 2014).

E. coli و *aureus* از داخل آمپول‌های استریل حاوی آن‌ها برداشته و وارد ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI broth گردید. پس از طی ۲۴ ساعت انکوباتورگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس از این لوله‌ها روی محیط کشت Mueller hinton agar کشت خطی داده شدند و مجدداً گرمخانه گذاری شدند. اگر میزان جذب در حد ۰/۵ مک فارلند (۰/۰-۱۳/۰۸) باشد، بعد از حدود ۱۵ دقیقه سوسپانسیون آماده تلقیح است. سوسپانسیونی با غلظت ۰/۵ مک فارلند از ۳ تا ۵ کلنی که به خوبی ایزوله شده تهیه گردید. وقتی میزان جذب سوسپانسیون ۰/۱۱ توسط اسپکتوفتومتر (Mecasys)، کره جنوبی) در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد، با استفاده از سواب استریل از لوله‌های حاوی سوسپانسیون به طور کامل روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت Mueller hinton agar تلقیح انجام شد (Rad et al., 2017 ; Emiroglu et al., 2010).

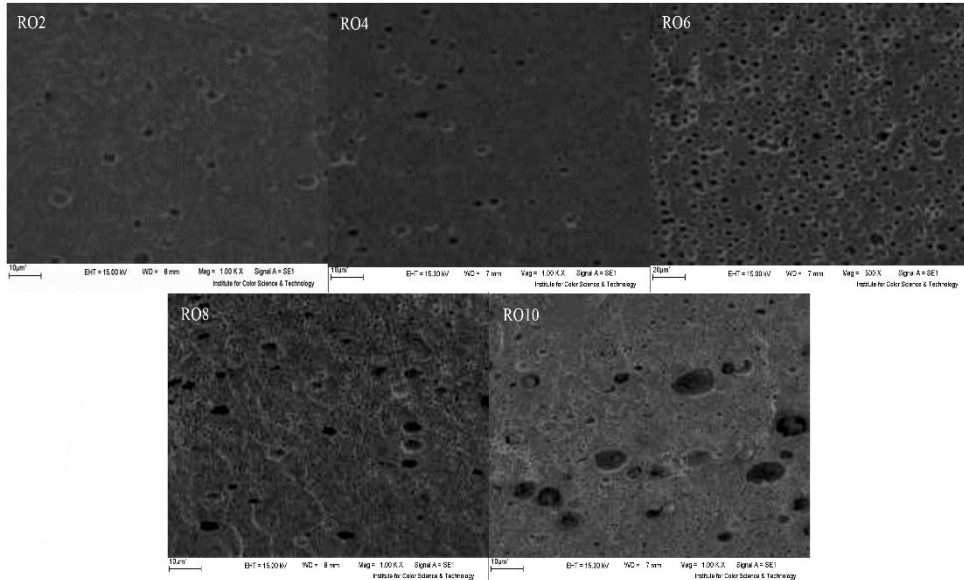
ارزیابی اثر ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری

فیلم‌ها به قطر ۶ میلی متر توسط چاقوی استریل شده در اتوکلاو، در زیر هود لامینار بریده شدند. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود لامینار تحت اشعه ماورا بنفش استریل شدند. با استفاده از روش Agar diffusion فیلم‌های بریده شده را روی پلیت‌های حاوی محیط کشت Mueller hinton agar تلقیح شده با سوسپانسیون‌های در فاصله مناسب با هم جاگذاری شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. قطر هاله‌های شفاف در اطراف نمونه شاهد (فیلم بدون اسانس رزماری) و فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس رزماری با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شدند (Rad et al., 2017). حداقل غلظتی از اسانس که خاصیت ضد میکروبی بر روی هر کدام از میکروارگانیسم‌ها دارند و هاله عدم رشد ایجاد کردند به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش شدند و غلظتی از اسانس که بالاترین میزان فعالیت ضد میکروبی را داشت برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی روی گوشت شترمرغ به کار برده شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم حاوی اسانس رزماری در

گوشت شترمرغ

گوشت شترمرغ در زیر هود لامینار و توسط چاقوی استریل به شکل مکعب‌هایی به وزن ۵ گرم بریده شدند. پوشش‌دهی قطعات بریده شده توسط فیلم حاوی اسانس رزماری با توجه به غلظتی که در مرحله قبل به دست آمده به صورتی انجام گرفت که، تمام



شکل ۱ - تصاویر SEM از سطح فیلم‌های حاوی اسانس رزماری با غلظت‌های ۰.۲، ۰.۴، ۰.۶، ۰.۸ و ۱.۰ درصد حجمی/حجمی

ضخامت

نتایج تجزیه واریانس ضخامت فیلم‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثر افزودن اسانس رزماری بر ضخامت فیلم نسبت به فیلم شاهد معنی‌دار نیست ($p > 0.05$). دلیل این موضوع را می‌توان به غلظت پایین اسانس افزوده شده نسبت داد. تحقیقات پیشین نشان دادند که اثر افزودن اسانس‌های مختلف در فیلم‌های ساخته شده از مواد مختلف بر ضخامت آن‌ها متفاوت است (Burt, 2004). در فیلم ژلاتین استخوان ماهی افزودن اسانس‌های میخک و فلفل موجب کاهش معنی‌دار ضخامت فیلم‌ها شد ($p < 0.05$) (Shakila, 2016). افزایش معنی‌دار ضخامت فیلم‌های ژلاتین پوست ماهی در اثر افزودن اسانس مرکبات (ترنج، لیموترش، بالنگ و لیموشیرین) را به دلیل ماهیت روغنی و عدم پراکنش یکنواخت درون ساختار فیلم دانسته‌اند که موجب افزایش حجم فیلم‌ها در یک میزان ثابت فیلم شدند ($p < 0.05$) (Tongnuanchan et al., 2012).

نفوذپذیری به بخار آب

همان‌طوری که نتایج تجزیه واریانس WVP فیلم‌ها (جدول ۱) نشان می‌دهد، در غلظت‌های ۰.۲ و ۰.۴ درصد، WVP نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ولی با افزایش غلظت اسانس‌ها، WVP افزایش معنی‌داری دارد ($p < 0.05$). Atarés et al. (2010) نشان دادند که در فیلم خوراکی ایزوله پروتئین سویا در اثر اضافه کردن اسانس‌های دارچین و زنجبیل، WVP به طور معنی‌داری کاهش نشان داده است. این محققین علت این تغییر را خاصیت آبرگریزی اسانس‌ها دانسته‌اند که از ورود ذرات بخار آب به داخل فیلم جلوگیری می‌کنند. با افزایش غلظت

اسانس همان‌طوری که در تصاویر بدست آمده از SEM این فیلم‌ها مشخص گردید، حفراتی در سطح فیلم‌ها ایجاد شدند که وجود همین حفرات به عنوان راهی برای عبور بخار آب و افزایش نفوذپذیری فیلم‌ها است. مشابه این پژوهش در فیلم کربوکسی متیل سلولز با افزایش غلظت اسانس میخک، WVP افزایش معنی‌داری دارد ($p < 0.05$). تصاویر SEM این فیلم‌ها نیز وجود حفرات را در سطح فیلم‌ها نشان دادند (Dashipour et al., 2014). با استناد به نتایج تحقیقات پیشین تغییر روند WVP با افزایش غلظت اسانس قابل تفسیر و توجیه است.

ویژگی‌های مکانیکی

جدول ۱ میانگین مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری را نشان می‌دهد. در اثر افزودن اسانس مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی فیلم‌ها به ترتیب به طور معنی‌داری کاهش و افزایش نشان دادند ($p < 0.05$). در پژوهش‌های پیشین که اثرات اضافه کردن اسانس‌ها را بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها مورد بررسی قرار دادند، برای اسانس‌ها نقش پلاستی‌سایزری در نظر گرفتند. اسانس‌ها با داشتن نقش پلاستی‌سایزری باعث کاهش نیروهای بین‌مولکولی، افزایش سیالیت و حرکت زنجیره‌های پلیمری می‌شوند که در نتیجه آن انعطاف‌پذیری فیلم‌ها افزایش می‌یابد ولی از طرفی در برخی از موارد کاهش انسجام ماتریکس و مقاومت به کشش فیلم‌ها نیز گزارش شدند (Atarés et al., 2010 ; Burt, 2004). نتایج کمترین میزان مقاومت به کشش و بیشترین میزان ازدیاد طول تا نقطه پارگی در فیلم RO10 به ترتیب $0.35 \pm 8/49$ مگاپاسکال و $2/53 \pm 403/63$ درصد به دست آمد. در این پژوهش نیز تصاویر

که نتایج این مطالعه نشان می‌دهند باکتری گرم منفی (*E. coli*) نسبت به باکتری گرم مثبت دیگر (*S. aureus*) مقاومت بیشتری در برابر ترکیبات ضد میکروبی اسانس دارد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشا خارجی از جنس لیپوپلی ساکاریدی اطراف دیواره سلولی هستند که این غشا با داشتن خاصیت آبدوستی از نفوذ ترکیبات آبریز همچون اسانس‌ها به داخل سلول باکتریایی جلوگیری می‌کنند (Rad et al., 2017; Gomez-Estaca et al., 2010; Zinoviadou et al., 2009; Burt, 2004). ترکیبات منوترپنی خاصیت چربی دوستی نسبی و حلالیت در آب را دارند، در نتیجه این ویژگی‌های باعث ایجاد اختلال در بخش لیپیدی پلازما و غشاهای زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌شوند. این تغییرات منجر به نفوذپذیری غشا و نشت ترکیبات داخل سلول نظیر RNA، پروتئین‌ها، یون‌ها و نهایتاً مرگ سلول می‌گردند (Preedy, 2015). پتاسیم نقش‌های تعیین‌کننده‌ای نظیر حفظ بالانس اسمزی، تعادل pH، فعال ماندن آنزیم‌های حیاتی همچون ATPase، ترانسفراز و اکسیدوردکتاز، تنظیم مصرف اکسیژن و متابولیسم گلوکز در باکتری‌ها دارد. از دست رفتن پتاسیم به واسطه آسیب سلولی توسط منوترپن‌ها در نهایت منجر به مرگ سلول باکتریایی می‌گردد (Preedy, 2015; Trombetta et al., 2005). توسط Gómez-Estaca et al. (2010) خاصیت ضد میکروبی فیلم ژلاتین-کتیوزان حاوی اسانس‌های میخک، رازیانه، اسطوخودوس، آویشن باغی، گل شاهپسند، کاج و رزماری بر روی ۱۸ گونه میکروب بیماری‌زا مورد آزمایش قرار گرفت. قطره‌ها له عدم رشد اسانس میخک از سایر اسانس‌ها بیشتر بود و بعد از آن اسانس‌های رزماری و اسطوخودوس بیشترین بازدارندگی را داشتند. در این میان بررسی قطر هاله عدم رشد نشان داد که *E. coli* به میزان کمتری نسبت به *S. aureus* و *B. cereus* تحت تاثیر اثر اسانس رزماری قرار دارد.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد (mm) تشکیل شده در اطراف فیلم‌های کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری با غلظت‌های ۰.۴، ۰.۶، ۰.۸ و ۱۰ درصد حجمی/حجمی در مقایسه با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی به عنوان شاهد

نوع فیلم	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
شاهد	۰g	۰g
RO۲	۷/۰ ± ۲۳/۲۳ ^f	۰g
RO۴	۱۰/۰ ± ۲۰/۶۴ ^{de}	۸/۰ ± ۹/۰۸ ^e
RO۶	۱۴/۰ ± ۰۷/۰۳ ^b	۱۰/۰ ± ۴۵/۸۵ ^d
RO۸	۱۵/۰ ± ۲۵/۷۶ ^{ab}	۱۱/۰ ± ۱۲/۲۱ ^{cd}
RO۱۰	۱۵/۰ ± ۹۲/۹۱ ^a	۱۲/۰ ± ۴۵/۹۳ ^c

ارقام میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است.

SEM از بین رفتن انسجام و یکنواختی فیلم‌ها را با افزایش اسانس نشان دادند. همچنین (Ahmad et al., 2012) و Zinoviadou et al. (2009) نتایج مشابهی را گزارش کردند. در این مطالعات علاوه بر ایجاد ساختار غیر یکنواخت در طی اضافه شدن اسانس به فیلم‌ها، به ماهیت لیپیدی و مایع بودن اسانس‌ها در دمای اتاق اشاره شده که بعد از حضور در فیلم به صورت قطراتی ظاهر گردیده و به راحتی موجب تغییر شکل و افزایش توسعه‌پذیری فیلم شدند (Ahmad et al., 2012; Zinoviadou et al., 2009).

جدول ۱- ضخامت، WVP، مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی فیلم‌های کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری با غلظت‌های ۰.۴، ۰.۶، ۰.۸ و ۱۰٪ (v/v) در مقایسه با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی به عنوان شاهد

نوع فیلم	ضخامت (mm)	WVP (g/m.s.Pa×10 ⁻¹¹)	مقاومت به کشش (MPa)	ازدیاد طول تا نقطه پارگی (%)
شاهد	± ۰/۰۰۱	۱۰.۱ ^a × ۲/۶۶ ± ۱۱	± ۰/۵۸	± ۲/۵۸
RO۲	± ۰/۰۰۴	۱۰.۱ ^b × ۲/۶۲ ± ۱۱	± ۰/۳۷	± ۲/۱۳
RO۴	± ۰/۰۹۱ ^a	۱۰.۱ ^c × ۲/۲۸ ± ۱۱	± ۰/۳۵	± ۲/۵۳
RO۶	± ۰/۰۰۲	۱۰.۱ ^d × ۲/۲۱ ± ۱۱	± ۰/۴۵	± ۱/۴۴
RO۸	± ۰/۰۹۰ ^a	۱۰.۱ ^{cd} × ۲/۲۱ ± ۱۱	± ۰/۱۲	± ۵/۱۱
RO۱۰	± ۰/۰۰۳	۱۰.۱ ^d × ۲/۰۷ ± ۱۱	± ۰/۳۱	± ۲/۴۷

ارقام میانگین ۳ تکرار (به جز ضخامت که ۱۰ تکرار داشت) ± انحراف معیار است.

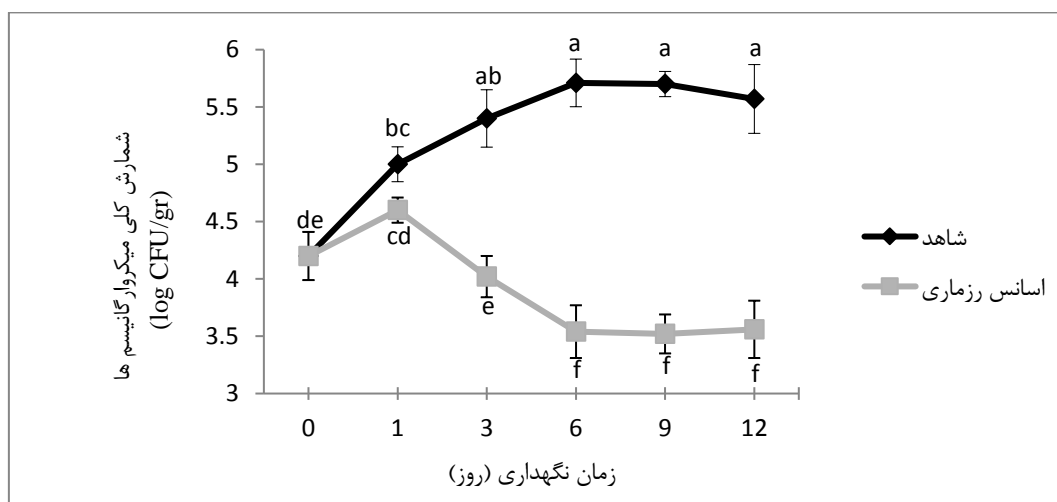
خواص ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری

نتایج خواص ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری علیه باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* نشان می‌دهند که بیشترین اثر بازدارندگی اسانس رزماری با غلظت ۱۰ درصد علیه *S. aureus* بود (جدول ۲). *E. coli* بیشترین مقاومت را در برابر اثر ضد میکروبی اسانس رزماری از خود نشان داد. MIC اسانس رزماری علیه باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* به ترتیب در غلظت‌های ۲ و ۴ درصد به دست آمد. ماده موثر اصلی اسانس رزماری را 1,8-cineol (میزان آن با توجه به محل رویش از میزان ۲/۶۴ درصد تا ۶۳ درصد متغییر گزارش شده است)، camphor (< ۲۰ درصد) و verbenone (< ۱۵ درصد) تشکیل می‌دهند که اثر ضد میکروبی این منوترپن‌ها به اثبات رسیده است. سایر ترکیبات عمده آن شامل borneol، α-pinene و limonene هستند که با سه ترکیب اصلی اسانس رزماری در جهت خاصیت ضد میکروبی اثر هم‌افزایی دارند (Preedy, 2015). همین طوری

می‌یابد (Burt, 2004). شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها که در زمان آغاز آزمون $4/2 \text{ Log cfu/g}$ بود، پس از ۱۲ روز نگهداری در بسته‌بندی حاوی اسانس به $3/56 \text{ Log cfu/g}$ رسید. در نهایت این اعداد نشان می‌دهند که اسانس رزماری قدرت مهارکنندگی مطلوبی داشت و توانایی کاهش باریکروبی گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده در طی زمان نگهداری را دارا می‌باشد. نتایج مشابه تحقیق حاضر در زمینه بررسی گوشت گوساله بسته‌بندی شده در فیلم پروتئین آب پنیر حاوی $1/5$ درصد اسانس پونه کوهی نشان داد شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها توسط ترکیبات ضد میکروبی حدود $3/3$ سیگل لگاریتمی در مقایسه با شاهد کاهش پیدا کردند (Zinoviadou et al., 2009). در مقابل مطالعه انجام شده در زمینه تاثیر ترکیبات ضد میکروبی اسانس‌های آویشن باغی و پونه-کوهی در فیلم خوراکی پروتئین سویا بر روی گوشت گوساله نگهداری شده در دمای یخچال نشان داد که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در فیلم‌های حاوی اسانس‌ها در مقایسه با شاهد در طی زمان نگهداری تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p > 0/05$). در این مطالعه علت تفاوت نتایج به دست آمده را مرتبط با تفاوت‌های مواد تشکیل‌دهنده گوشت دانستند (Emiroglu et al., 2010). همچنین نتایج بدست آمده توسط Mastromatteo et al. (2010) نشان دادند که استفاده از ترکیبات ضد میکروبی همچون لیزوزیم، ناپسین و EDTA تنها سه روز توانستند بار میکروبی گوشت شترمرغ را کنترل نمایند.

فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس رزماری در گوشت شترمرغ

شمارش کلی میکروارگانیسم‌های گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری و بدون اسانس (شاهد) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه شاهد در طی ۶ روز افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در نمونه‌های بسته‌بندی شده دارای اسانس رزماری فقط در روز اول آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها افزایش معنی‌داری نشان داد ولی در ادامه، در روزهای سوم و ششم با شروع فعالیت ضد میکروبی اسانس شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها کاهش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0/05$). در تمامی روزهای آزمون اختلاف شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در نمونه‌های گوشت شترمرغ حاوی اسانس با نمونه‌های شاهد باهم معنی‌دار بودند ($p < 0/05$). از روز ششم آزمون به بعد تا پایان زمان نگهداری، روند تغییرات در هر دو نمونه به میزان ثابتی رسیدند و دیگر تغییر معنی‌داری را نشان ندادند ($p > 0/05$). همانطوری که تصاویر به دست آمده از SEM نشان دادند اسانس به علت ماهیت فرار خود ماتریکس فیلم را رها کرد و موجب کاهش قدرت مهارکنندگی شد. به این ترتیب تا زمانی که ترکیبات ضد میکروبی حضور دارند توانایی مهار رشد و کشندگی میکروارگانیسم‌ها را دارند و پس از کاهش غلظت آن‌ها میکروارگانیسم‌ها شروع به فعالیت نموده و بار میکروبی افزایش



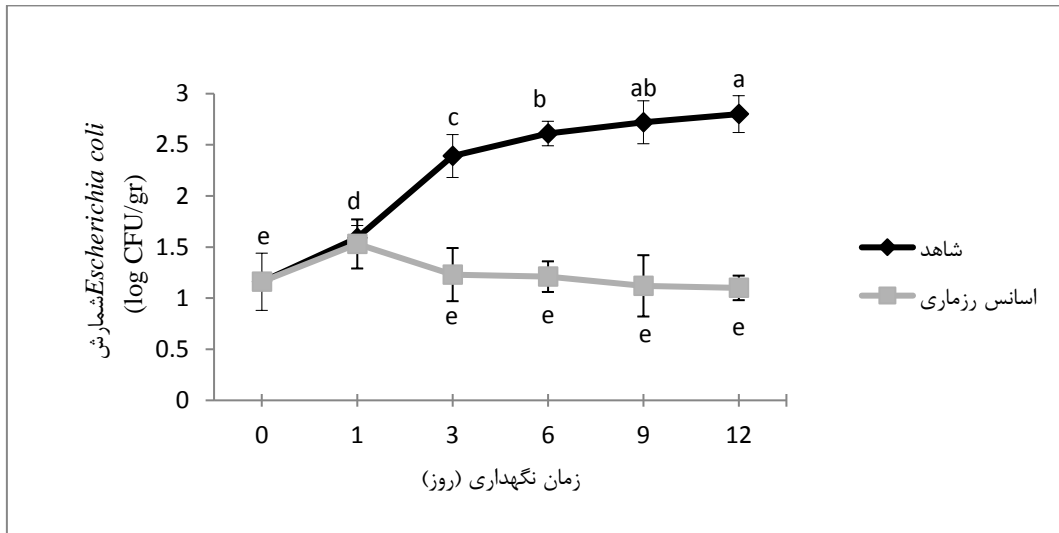
شکل ۲- شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها بر حسب (Log cfu/g) در گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم‌های کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری با غلظت ۱۰ درصد حجمی/حجمی در مقایسه با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی به عنوان شاهد

روز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). شمارش *E. coli* نمونه شاهد به طور معنی‌داری بالاتر از نمونه‌های بسته‌بندی شده بود و در تمام زمان نگهداری افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$).

شمارش *E. coli* گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری و بدون اسانس (شاهد) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۲

حد ثابتی حفظ نماید. (2010) Gómez-Estaca et al. نشان دادند که به ترتیب اسانس‌های آویشن باغی، میخک، رزماری و اسطوخدوس موجب مهار رشد *E. coli* در ماهی نگهداری شده در دمای یخچال شدند. آن‌ها اثبات کردند که به دلیل وجود پیوند اسانس‌ها با اجزا سازنده فیلم آزادسازی اسانس‌ها آرام‌تر شد و در نتیجه مدت زمان نگهداری ماهی افزایش یافت.

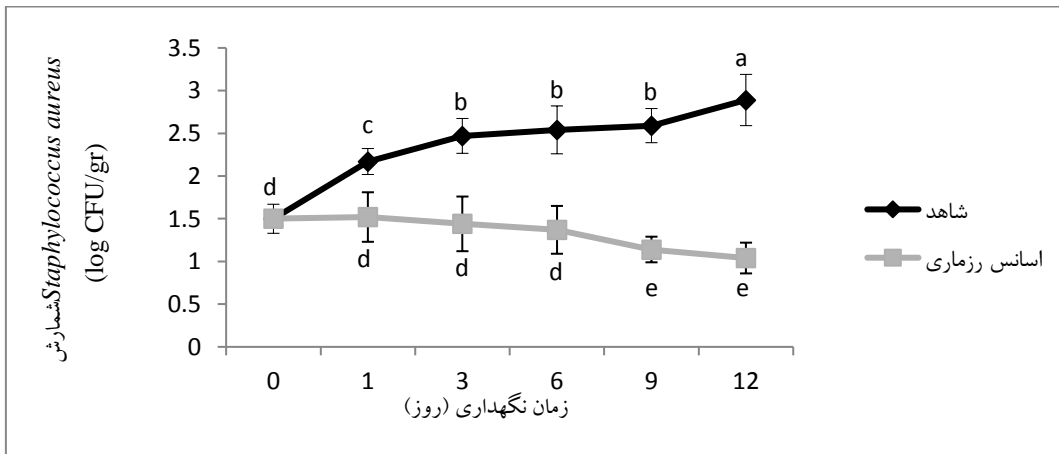
طی روز اول افزایش معنی‌دار *E. coli* در نمونه‌های بسته‌بندی شده مشاهده شد ولی بعد از آن تا پایان زمان نگهداری کاهش آن مشاهده گردید ($p < 0.05$). در مقایسه با شاهد در روز آخر نگهداری، شمارش *E. coli* ۱/۷ سیکل لگاریتمی توسط اسانس رزماری کاهش داشت. اسانس رزماری در طی زمان نگهداری قدرت مهارکنندگی داشت و توانست از رشد و تکثیر *E. coli* موجود در گوشت شترمرغ جلوگیری کند و میزان رشد آن را در



شکل ۳- شمارش *E. coli* برحسب (Log cfu/g) در گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم های کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری با غلظت ۱۰ درصد حجمی/حجمی در مقایسه با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی به عنوان شاهد

به طور معنی‌داری باعث کاهش شمارش *S. aureus* شد ولی در مقابل، نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌دار شمارش *S. aureus* را تا پایان زمان نگهداری نشان دادند ($p < 0.05$). شمارش *S. aureus* در زمان آغاز آزمون که ۱/۵ Log cfu/g بود به ۱/۰۴ Log cfu/g در گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم‌های حاوی اسانس رزماری رسید. در مقایسه با شاهد، در روز آخر شمارش *aureus* ۱/۸۵ سیکل لگاریتمی توسط اسانس رزماری کاهش داشت.

شکل ۴ شمارش *S. aureus* گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری و بدون اسانس (شاهد) نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز را نشان می‌دهد. در کلیه روزهای آزمون تفاوت شمارش *S. aureus* در نمونه‌های شاهد در مقایسه با نمونه‌های بسته بندی شده حاوی اسانس رزماری با هم معنی‌دار بود ($p < 0.05$). همان‌طوری که نتایج نشان دادند اسانس رزماری توانسته



شکل ۴- شمارش *S. aureus* برحسب (Log cfu/g) در گوشت شترمرغ بسته‌بندی شده با فیلم های کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی اسانس رزماری با غلظت ۱۰ درصد حجمی/حجمی در مقایسه با فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی به عنوان شاهد

نتیجه‌گیری کلی

coli بودند. بیشترین اثر بازدارندگی در غلظت ۱۰ درصد اسانس مشاهده شد که برای بسته‌بندی گوشت شترمرغ مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ۱۲ روز زمان نگهداری در یخچال، رشد میکروارگانیسم‌های مورد آزمون در نمونه‌های گوشت بسته‌بندی شده با فیلم ضد میکروبی مهار شدند. به طور کلی اسانس رزماری به عنوان یک نگهدارنده طبیعی توانایی جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش زمان ماندگاری گوشت شترمرغ را داشته و به نظر می‌رسد می‌توان از این فیلم ضد میکروبی در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران بابت حمایت‌های علمی و امکانات آزمایشگاهی تقدیر و قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 189-199.
- ASTM. (1993). Designation E 96: Standard test method for water vapor transmission of materials. In Annual book of ASTM: Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM (2002). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. In Annual book of ASTM: Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.
- Atarés, L., De Jesús, C., Talens, P., & Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 384-391.
- Barzegar, H., M. A. Mehrnia and M. Hassanzadeh (2019). Characterization of physicochemical and mechanical properties of biodegradable hemicellulose-gelatin films. *Iranian Journal of Biosystems Engineering*, 49(4), 609-619. (In Farsi)
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Dashipour, A., Khaksar, R., Hosseini, H., Shojaee-Aliabadi, S., & Kiandokht, G. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial characteristics of carboxymethyl cellulose edible film cooperated with clove essential oil. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(8), 34-42.
- Emiroğlu, 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 Science*, 86(2), 283-288.
- Gómez-Estaca, J., De Lacey, A. L., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M., & Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27(7), 889-896.
- Goudarzi, V., & Shahabi-Ghahfarrokhi, I. (2018). Development of photo-modified starch/kefiran/TiO₂ bio-nanocomposite as an environmentally-friendly food packaging material. *International journal of biological macromolecules*, 116, 1082-1088.
- Hadian, M., Rajaei, A., Mohsenifar, A., Tabatabaei, M. (2017). Encapsulation of *Rosmarinus officinalis* essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antibacterial activity in beef cutlet against *Salmonella typhimurium* during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*. 84, 394-401.
- Júnior, A. V., Fronza, N., Foralosso, F. B., Dezen, D., Huber, E., dos Santos, J. H. Z., Machado, R. A. F., & Quadri, M. G. N. (2015). Biodegradable duofunctional active film: antioxidant and antimicrobial actions for the conservation of beef. *Food and bioprocess technology*, 8(1), 75-87.
- Kamel, S. (2013). The use of some herbs for improving the refrigerated storage stability of minced camel meat. *Scientific journal of microbiology*. 2, 95-103.
- Lu, Y., Tighzert, L., Berzin, F., & Rondot, S. (2005). Innovative plasticized starch films modified with waterborne polyurethane from renewable resources. *Carbohydrate Polymers*, 61(2), 174-182.
- Mastromatteo, M., Lucera, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2010). Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties. *Journal of*

در این پژوهش فیلم کفیران- پلی یورتان پایه آبی حاوی غلظت- های مختلف (۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد حجمی/حجمی) اسانس رزماری تهیه شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی آن در نگهداری گوشت شترمرغ در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس مورد مطالعه قرار گرفت. با بررسی نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، مشاهده شد که با افزودن اسانس خصوصیات فیلم‌ها تغییرات معنی‌داری داشتند ($p > 0.05$). تصاویر SEM نشان دادند که با افزایش غلظت اسانس ساختار فیلم‌ها به صورت حفره‌دار و غیریکنواخت شدند. با استفاده از این تصاویر نتایج به- دست آمده در زمینه نفوذپذیری به بخار آب، ویژگی‌های مکانیکی و خواص ضد میکروبی فیلم‌ها قابل توجیه و تفسیر شدند. فیلم‌های حاوی اسانس دارای خاصیت ضد میکروبی علیه *S. aureus* و *E.*

food science, 75(7), 422-429.

- Mathlouthi, N., Bouzaienne, T., Oueslati, I., Recoquillay, F., Hamdi, M., Urdaci, M., Bergaoui, R. (2012). Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth performance. *Journal of animal science*. 90, 813-823.
- Motedayen, A. A., F. Khodaiyan and E. A. Salehi (2013). Development and characterisation of composite films made of kefir and starch. *Food chem*. 136(3-4), 1231-1238.
- Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A.R., Öz, M., Ozogul, F. (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT-Food Science and Technology*. 75, 677-684.
- Preedy, V. R. (2015). Essential oils in food preservation, flavor and safety: Academic Press.
- Rad, F. H., Sharifan, A., & Asadi, G. (2018). Miscibility and morphology of kefir/waterborne polyurethane blend films. *International Journal of Food Properties*, 1-12.
- Rad, F. H., Sharifan, A., Khodaiyan, F., & Ghahfarrokhi, I. S. (2017). Preparation and characterization of pullulan-soy protein concentrate blended film incorporated with *Zataria multiflora* and *Artemisia biennis* essential oils. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 12(4).
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), 1-16.
- Shakila, R. J., Jeevithan, E., Arumugam, V., & Jeyasekaran, G. (2016). Suitability of antimicrobial grouper bone gelatin films as edible coatings for vacuum-packaged fish steaks. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(5), 724-734.
- Tian, H., Wang, Y., Zhang, L., Quan, C., & Zhang, X. (2010). Improved flexibility and water resistance of soy protein thermoplastics containing waterborne polyurethane. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 13-20.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2012). Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3), 1571-1579.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- WU, Y., QIN, Y., YUAN, M., LI, L., CHEN, H., CAO, J. & YANG, J. (2014). Characterization of an antimicrobial poly (lactic acid) film prepared with poly (ϵ -caprolactone) and thymol for active packaging. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(9), 948-954.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82(3), 338-345.