

# بررسی خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی فیلم های خوراکی تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس های آویشن و میخک

سید محمد هاشم حسینی<sup>۱</sup>، سید هادی رضوی<sup>۲\*</sup>، سید محمد علی موسوی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

## چکیده

استفاده از فیلم های خوراکی برای آزاد سازی ترکیبات ضد میکروبی به درون بسته بندی ماده غذایی نوعی از بسته بندی فعال می باشد. اگرچه در مورد خواص ضد میکروبی عصاره های ادویه جات، تحقیقات زیادی صورت گرفته است؛ اما کاربرد آنها در فیلم های خوراکی محدود می باشد. در این تحقیق فیلم های خوراکی از جنس کیتوزان محتوی اسانس های آویشن و میخک در سه سطح غلظتی ۰/۵ درصد، ۱ درصد و ۱/۵ درصد تولید شدند. خواص ضد میکروبی فیلم ها روی پنج باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد آزمایش قرار گرفتند. خواص فیزیکی فیلم ها شامل رطوبت و نفوذپذیری در برابر بخار آب و خواص مکانیکی فیلم ها شامل مقاومت کششی و درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن مورد بررسی قرار گرفتند. خواص ضد میکروبی فیلم های حاوی اسانس آویشن، به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) بالاتر از فیلم های حاوی اسانس میخک بودند. فیلم ها روی باکتری های گرم مثبت به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) مؤثرتر از باکتری های گرم منفی بودند. در اثر افزودن اسانس ها نفوذپذیری فیلم ها در برابر بخار آب به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) افزایش یافت. مقاومت کششی فیلم ها با افزایش غلظت اسانس کاهش یافت. این کاهش در مورد فیلم های حاوی اسانس آویشن بیشتر بود.

کلید واژگان: فیلم خوراکی، کیتوزان، آویشن، میخک،

## ۱- مقدمه

در آنها بوده که می توان با استفاده از فیلم های خوراکی حاوی مواد ضد میکروبی آنرا کنترل نمود [۸، ۹، ۱۰]. کیتوزان یک نوع چند قندی است که از واحدهای گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین تشکیل شده است. کیتوزان از استیل زدایی کیتین- یکی از فراوانترین پلیمرهای طبیعی- به دست می آید [۱۱]. ساختار کیتوزان در شکل ۱ نشان داده شده است. ثابت شده است که کیتوزان یک ماده غیر سمی، تجزیه پذیر<sup>۱</sup> و زیست سازگار و نیز دارای خواص ضد میکروبی می باشد [۱۱، ۱۲]. اثر ضد میکروبی کیتوزان ناشی

در سال های اخیر، عامل اصلی ایجاد تحول در تکنولوژی بسته بندی مواد غذایی، افزایش تقاضای مصرف کننده برای غذاهایی است که حداقل فرایند روی آنها انجام گرفته است [۲، ۱].

معمولاً به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت، محدود کردن انتقال گاز (مثلاً اکسیژن)، جلوگیری از مهاجرت روغن ها و چربی ها و نگهداری ترکیبات معطر فرار، از فیلم ها و پوشش های خوراکی روی مواد غذایی استفاده می کنند [۳، ۴، ۵، ۶، ۷]. رشد میکروبی روی سطح مواد غذایی عامل اصلی ایجاد فساد

\* مسئول مکاتبات: srazavi@ut.ac.ir

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- باکتری های مورد استفاده و روش

#### نگهداری آنها

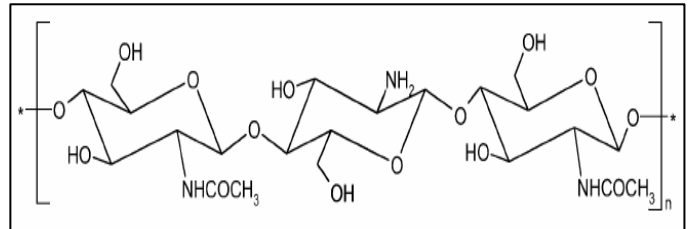
باکتری های مورد استفاده در این تحقیق، *Listeria monocytogenes* PTCC1298 و *Staphylococcus aureus* PTCC1399، *Escherichia coli* PTCC1431 و *Salmonella enteritidis* PTCC1431 و *Pseudomonas aeruginosa* بودند. سه باکتری اول از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران و دو باکتری دیگر از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند. باکتری ها روی محیط نوترینت آگار شیبدار (Merck آلمان) کشت داده شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور حفظ قابلیت زیستی باکتری ها، هر بیست روز کشت مجدد آنها صورت گرفت. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* هر ده روز کشت مجدد داده شد. هنگام تهیه کشت مایع از باکتری ها یک لوپ پر از هر نمونه باکتری برداشته شده و در شرایط کاملا سترون در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع Brain Heart Infusion (Merck آلمان) کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۵۰-۱۴۰ به مدت ۲۴ ساعت در یک دستگاه گرمخانه شیکر دار (Stuart<sup>®</sup> انگلیس) گرمخانه گذاری شد. در نهایت عمل رقیق کردن کشت ها با استفاده از آب مقطر استریل تا رسیدن به جمعیت میکروبی مورد نیاز برای کشت سطحی صورت گرفت. هنگام کشت سطحی جمعیت میکروبی  $10^6 - 10^8$  cfu/ml بود.

### ۲-۲- تهیه فیلم های خوراکی محتوی

#### اسانس ها

کیتوزان تولید شده از پوسته کیتینی خرچنگ (درجه استیل زدایی ۸۰ درصد، Sigma آمریکا) در محلول اسید استیک ۱ درصد حجمی - حجمی تا رسیدن به غلظت ۲ درصد حل گردید. مدت زمان لازم برای انحلال کیتوزان در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتیگراد، ۶-۵ ساعت بود. از یک همزن مغناطیسی برای انحلال کیتوزان استفاده شد. محلول کیتوزان حاصل با استفاده از کاغذ صافی Whatman شماره ۳ تحت خلاء صاف شد تا ناخالصی ها و مواد نامحلول موجود در آن حذف شوند. سپس گلیسرول (Sigma آمریکا) به میزان ۰/۷۵ میلی لیتر بر گرم کیتوزان به محلول اضافه شد. از گلیسرول به عنوان ماده

از گروه های آمینی با بار مثبت است. این گروه ها با غشاء سلولی میکروارگانیسم ها که دارای بار منفی است واکنش می دهند. این واکنش منجر به نشت اجزاء پروتئینی و سایر اجزاء درون سلولی میکروارگانیسم ها می شود [۱۳].



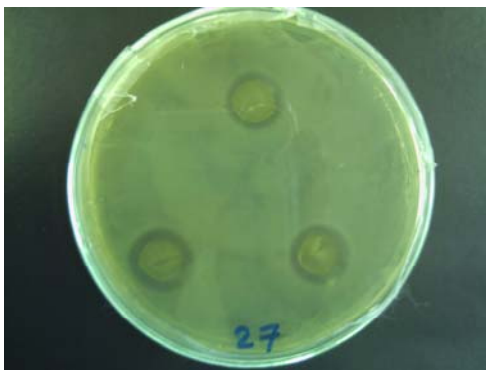
شکل ۱ ساختار کیتوزان

ترکیبات ضد میکروبی موجود در مواد غذایی می توانند عمر نگهداری مواد غذایی فرآوری شده یا فرآوری نشده را افزایش دهند. استفاده از اسانس های گیاهی به جای مواد نگهدارنده شیمیایی نگرانی های ناشی از مصرف این گونه مواد را کاهش می دهد [۱۴]. اسانس های گیاهی و ترکیبات آنها از زمان های قدیم به عنوان مواد طعم دهنده مورد استفاده قرار گرفته اند و هم اکنون ثابت شده است که این مواد دارای طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی هستند [۱۵، ۱۶، ۱۷]. ترکیب، ساختار و گروه های عاملی اسانس ها نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آنها ایفا می کنند [۱۴]. معمولاً ترکیباتی که دارای گروه های فنلی هستند، مؤثرترند [۱۸، ۱۹]. در این میان اسانس های میخک، آویشن، رزماری، پونه کوهی<sup>۱</sup>، مریم گلی<sup>۲</sup> و مرزه مؤثرترین ترکیبات علیه میکروارگانیسم ها هستند [۲۰]. افزودن مواد ضد میکروبی به فیلم های خوراکی در مقالات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است؛ اما در مورد افزودن اسانس های گیاهی با خاصیت ضد میکروبی به درون فیلم های خوراکی مطالعات زیادی صورت نگرفته است [۲۱، ۲۲، ۱۰].

هدف از این تحقیق تولید فیلم های خوراکی از جنس کیتوزان محتوی اسانس های آویشن و میخک بود. سپس خواص ضد میکروبی فیلم ها روی پنج گونه باکتری بیماریزا در مواد غذایی و نیز خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم های تولید شده مورد بررسی قرار گرفتند.

1. Oregano  
2. Sage

وجود نداشت، به جای آنکه عدد ۱۰ میلیمتر (قطر اولیه دیسک) گزارش شود اندازه آن معادل صفر در نظر گرفته شد؛ اما هنگام وجود فعالیت ضد میکروبی، با در نظر گرفتن قطر دیسک ها، همواره قطر هاله های تشکیل شده بیش از ۱۰ میلیمتر بود. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری ها بر روی سطح پلیت برای هر کدام از باکتری های مورد آزمایش یک پلیت کشت داده شده فاقد فیلم، در نظر گرفته شد. همچنین از یک پلیت فاقد باکتری برای اطمینان از عدم آلودگی محیط های کشت استفاده شد. نمونه ای از هاله های ایجاد شده در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲ نمونه ای از هاله های ایجاد شده توسط فیلم حاوی آویشن بر روی *S. aureus*

## ۲-۴- اندازه گیری ضخامت فیلم ها

ضخامت فیلم های تولید شده با استفاده از یک میکرومتر با دقت ۰/۰۱ میلیمتر اندازه گیری شد. اندازه گیری ضخامت فیلم های تولید شده برای آزمایشات نفوذپذیری در برابر بخار آب و آزمایشات مکانیکی ضروری بود. ضخامت فیلم های تولید شده در حدود ۰/۱۱ میلیمتر بود.

## ۲-۵- اندازه گیری میزان رطوبت فیلم ها

پس از آنکه فیلم ها به تعادل رطوبتی رسیدند، تکه های فیلم وزن شده و درون کپسولی که قبلاً به وزن ثابت رسیده بود قرار داده شدند. سپس در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت حرارت داده شدند. سپس از روی میزان کاهش وزن نمونه ها نسبت به نمونه اولیه، درصد رطوبت تعیین شد. در این آزمایش تبخیر گلیسرول و اسانس ها از درون فیلم ناچیز در نظر گرفته شدند.

بهبود دهنده برای شکل گیری و جلوگیری از شکنندگی فیلم ها استفاده گردید. مدت زمان لازم برای انحلال و توزیع یکنواخت گلیسرول ۳۰ دقیقه بود. اسانس های آویشن و میخک تهیه شده از شرکت گیاه اسانس (گرگان) در سه سطح غلظتی ۰/۵ درصد، ۱ درصد و ۱/۵ درصد به محلول کیتوزان اضافه شده و با استفاده از یک مخلوط کن در دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱/۵ دقیقه به طور یکنواخت درون محلول توزیع گردیدند. محلول های تشکیل دهنده فیلم تحت خلاء در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد هواگیری شدند. سپس ۴۵ میلی لیتر از این محلولها توسط پی پت در مرکز پلیت های شیشه ای به قطر ۱۴/۵ سانتی متر به آرامی ریخته شد. سپس پلیت ها در یک سطح کاملاً تراز قرار داده شدند تا نمونه ها خشک شده و فیلم ها تشکیل شوند. مدت زمان لازم برای خشک شدن نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۳۶ ساعت بود. فیلم های خشک شده به آرامی از پلیت ها جدا شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد تا رسیدن به تعادل رطوبتی (وزن ثابت) و انجام آزمایشات نگهداری شدند. برای تأمین رطوبت ۵۰ درصد از دیسکاتورهای حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم (Merck آلمان) استفاده گردید. نمونه های کنترل فاقد اسانس نیز تهیه شده و در همان شرایط نگهداری شدند.

## ۲-۳- بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم های

### خوراکی

برای تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم های خوراکی از روش نفوذ آگار<sup>۱</sup> استفاده شد. فیلم های تولید شده با استفاده از یک قالب به دیسک هایی به قطر ۱۰mm تبدیل شدند. دیسک ها در شرایط استریل روی محیط Brain Heart Infusion Agar قرار داده شدند. سپس قطر هاله های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلیمتر اندازه گیری شد. قبل از قرار دادن دیسک ها روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر کشت مایع هر کدام از باکتری های مورد آزمایش (  $10^6 - 10^8$  cfu/ml ) صورت گرفت. پلیت ها سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. قطر هاله های تشکیل شده به عنوان شاخص میزان فعالیت ضد میکروبی فیلم ها در نظر گرفته شد. در مواردی که هاله ای تشکیل نشده بود یعنی فعالیت ضد میکروبی

1. Agar Diffusion Method

## ۲-۶- اندازه گیری میزان نفوذپذیری فیلم ها

### در برابر بخار آب<sup>۱</sup>

برای انجام این آزمایش از روش شماره E96 مصوب ASTM استفاده گردید [۲۳]. برای انجام این آزمایش مقداری کلرید کلسیم بدون آب درون سلول های اندازه گیری نفوذ پذیری<sup>۲</sup> ریخته شد. سپس سطح سلول ها بوسیله فیلم و با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شد. بدین ترتیب به علت جاذب الرطوبه بودن کلرید کلسیم بدون آب، رطوبت نسبی درون سلول ها ۰ درصد شد. سپس سلول ها درون دسیکاتور حاوی آب نمک اشباع منتقل شدند. آب نمک اشباع در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد رطوبت ۷۵٪ ایجاد می کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد منجر به شیب فشار بخاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال گردید. تغییرات وزن سلول ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. در تمام نمونه ها با رسم منحنی تغییرات وزن نسبت به زمان یک خط راست ( $R^2 > 0.99$ ) حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب<sup>۳</sup> بر حسب (گرم ثانیه<sup>-۱</sup> متر<sup>۲</sup>) معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول ها بود. سطح سلول ها ۰/۰۰۲۸۷ متر مربع بود. نفوذپذیری فیلم ها در برابر بخار آب بر حسب (گرم ثانیه<sup>-۱</sup> متر<sup>۲</sup> پاسکال) از رابطه (۱) محاسبه شد:

رابطه (۱) ضخامت فیلم  $\times (1753/55)$  نرخ انتقال بخار آب) = نفوذپذیری فیلم ها در برابر بخار آب

برای هر نمونه فیلم، یک سلول اندازه گیری نفوذپذیری فاقد کلرید کلسیم نیز که توسط فیلم پوشانده شده بود، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. بدین ترتیب رطوبتی که جذب فیلم شده و از درون آن عبور نکرده بود، اندازه گیری شد.

## ۲-۷- اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم ها

آزمایشات کشش با استفاده از دستگاه Testometric (مدل M350-10CT ساخت انگلستان) و با استفاده از روش شماره D882-91 مصوب ASTM انجام گرفت [۲۴]. فیلم ها به شکل مستطیلی به ابعاد ۹×۱ سانتیمتر مربع بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵ سانتیمتر و سرعت حرکت فک ها ۳۰

میلیمتر بر دقیقه انتخاب شد. بر اساس روش استاندارد و به علت ضخامت کم نمونه ها، نیازی به استفاده از نمونه های دمبلی شکل نبود. فاکتورهای شامل حداکثر نیرو، درصد افزایش طول در نقطه پاره شدن<sup>۴</sup> (تغییر طول نمونه تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰) از روی منحنی های نیرو- تغییر شکل حاصل شدند. مقاومت کششی فیلم ها<sup>۵</sup> نیز از رابطه (۲) محاسبه شد:

رابطه (۲)

(ضخامت فیلم  $\times$  عرض فیلم / حداکثر نیرو) = مقاومت کششی فیلم ها

## ۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام آزمایشات میکروبی در هر سطح غلظت اسانس، آزمایش سه بار انجام شد و در هر بار آزمایش سه دیسک بر روی سطح محیط کشت قرار داده شد. آزمایشات میکروبی به صورت فاکتوریل ۲×۴×۵ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تکرار انجام شد. در این تحقیق در آزمایشات میکروبی اثر سه فاکتور نوع اسانس در ۲ سطح و غلظت اسانس در ۴ سطح (شامل کنترل) و تعداد باکتری ها در ۵ سطح بررسی شدند. سایر آزمایشات نیز به صورت فاکتوریل ۲×۴ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفتند. اثر عوامل مورد بررسی با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. مقایسه میانگین داده ها با استفاده از نرم افزار MSTATC در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- خواص ضد میکروبی فیلم های

#### خوراکی

در جدول شماره ۱ اثر ضد میکروبی فیلم های تولید شده (قطر هاله شفاف ایجاد شده بر حسب میلیمتر) علیه باکتری های مورد آزمایش نشان داده شده است. زمانی که مواد ضد میکروبی به درون فیلم افزوده می شوند این ترکیبات به درون آگار نفوذ می کنند و خواص ضد میکروبی را نشان می دهند. فیلم های کیتوزان حاوی آویشن خواص ضد میکروبی

4. Elongation at Break  
5. Tensile Strength

1. Water Vapor Permeability (WVP)  
2. Diffusion Cell  
3. Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

افزایش یافت. همانگونه که از جدول شماره ۱ مشخص است در بین باکتریهای مورد آزمایش *Listeria monocytogenes* ضعیفترین و *Pseudomonas aeruginosa* مقاومترین میکروارگانیسم در برابر اسانس ها بودند. همانگونه که مشاهده می شود تنها سطح غلظت ۱/۵ درصد اسانسها از رشد *Pseudomonas aeruginosa* جلوگیری کرده است. این نتایج تایید کننده تحقیقات مختلفی است که در این زمینه صورت گرفته است [۲۷،۳۳]. همانگونه که ذکر شد کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی است. با وجودیکه در زیر سطح فیلم ها هیچ رشدی مشاهده نگردید، اما فیلم های کنترل (فاقد اسانس) هاله ای نشان ندادند. علت این پدیده آن است که ماهیت ضد میکروبی کیتوزان یک ویژگی ذاتی است که به علت وجود گروههای آمینی با بار مثبت می باشد [۳۴،۱۲]. لذا اثر ضد میکروبی بدون مهاجرت ماده فعال رخ داده و تنها از رشد باکتری هایی که در تماس با سطح فیلم بودند، جلوگیری گردید.

### ۳-۲- میزان رطوبت و نفوذپذیری فیلم ها در

#### برابر بخار آب

نتایج مربوط به میزان رطوبت و نفوذپذیری فیلم ها در برابر بخار آب در جدول شماره ۲ گزارش شده است. همانگونه که مشاهده می شود در اثر افزودن ترکیبات ضد میکروبی به فیلم ها میزان رطوبت موجود در آنها به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) کاهش پیدا کرد. علت کاهش رطوبت را می توان اثر دفع کننده ترکیبات غیر قطبی موجود در اسانس ها بر ملکول های آب دانست. از ترکیبات موجود در اسانس ها سبب ایجاد تغییراتی در سطح ساختار ملکولی شده و لذا فشردگی ساختار سطحی کاهش یافت. این پدیده سبب تسریع عبور رطوبت از درون فیلم ها شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح فیلم ها در شکل شماره ۳ تایید کننده این گونه تغییرات سطحی می باشند. به طور کلی میزان نفوذپذیری فیلم های حاوی اسانس میخک در برابر بخار آب بیش از فیلم های حاوی اسانس آویشن بود. همانگونه که مشاهده می شود فیلم های کنترل، سطحی صاف و یک دست دارند؛ اما با افزودن اسانس ها فشردگی سطحی

بالاتری نشان دادند. بر اساس تحقیقات صورت گرفته آویشن و پونه کوهی دارای بالاترین خواص ضد میکروبی می باشند [۲۵،۲۶،۲۷]. فعالیت ضد میکروبی آویشن ناشی از وجود دو ترکیب تیمول<sup>۱</sup> و کارواکرول<sup>۲</sup> می باشد. چنین ترکیباتی می توانند اثر هم افزایی<sup>۳</sup> داشته باشند [۲۸]. کارواکرول و تیمول غشاء خارجی میکروارگانیسم ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکارید ها و افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی به ATP می شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ سلول می شود [۲۸]. ترکیب بازدارنده اصلی در اسانس میخک اوجنول<sup>۴</sup> می باشد [۳۰،۲۹]. مکانیزم اثر ضد میکروبی اوجنول جلوگیری از تولید آنزیم های آمیلاز و پروتئاز و نیز تخریب دیواره سلولی می باشد [۳۱]. در مقالات مختلف [۲۱،۲۲] غلظت های متفاوتی از اسانس ها به کار برده شده است که علت آن جنس گیاه، روش تهیه اسانس، غلظت ترکیبات موثر درون اسانس و همچنین نوع ماده تشکیل دهنده فیلم می باشند.

اسانس های آویشن و میخک با غلظت ۰/۵٪ روی باکتری های گرم مثبت اثر بازدارنده داشتند؛ در حالی که روی باکتری های گرم منفی چنین تاثیری مشاهده نشد. اسانس ها به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) در برابر باکتری های گرم مثبت موثرتر از باکتری های گرم منفی بودند. که علت این امر تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است؛ اما دیواره سلولی باکتری های گرم منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی ساکاریدهای مختلف، پروتئین ها و لیپیدها می باشد [۲۲]. همچنین دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی دارای غشاء خارجی<sup>۵</sup> است که سطح خارجی دیواره را می پوشاند [۳۲]. مجموعه این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت می شود. با افزایش غلظت هر کدام از اسانس ها اثر بازدارندگی (قطر هاله شفاف ایجاد شده) به طور معنی داری ( $p < 0.05$ )

1. Thymol
2. Carvacrol
3. Synergistic effect
4. Eugenol
5. Outer membrane

### ۳-۳- میزان مقاومت کششی و درصد افزایش

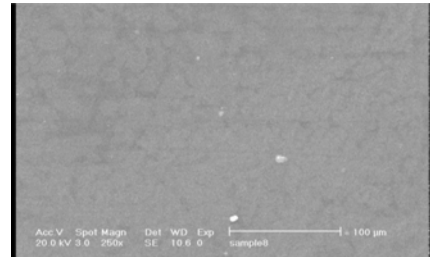
#### طول فیلم های تولید شده

در جدول شماره ۳ خواص مکانیکی فیلم های تولید شده، گزارش شده است. به طور کلی با افزودن اسانس به درون فیلم و با افزایش غلظت اسانس مقاومت کششی به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) کاهش پیدا کرد. حضور اسانس سبب به هم خوردن تراکم ساختاری و کاهش مقاومت نمونه های حاوی اسانس در برابر کشش شد. بر اساس تحقیقات صورت گرفته توسط محققین مختلفی افزودن ترکیبات ضد میکروبی به پلیمرهای مختلف به علت ایجاد تغییرات در سطح ملکولی سبب تغییر خواص مکانیکی فیلم های تولید شده از این پلیمرها می شود. این تغییرات به علت تخریب ماتریکس فیلم در اغلب موارد، در جهت کاهش مقاومت فیلم ها در برابر کشش می باشد [۳۸،۳۷]. به طور کلی با کاهش مقاومت کششی، شاهد افزایش طول بیشتری بودیم اما این افزایش در بعضی از سطوح غلظت نسبت به نمونه کنترل معنی دار نبود. به طور کلی فیلم های حاوی اسانس میخک خواص مکانیکی بهتری نسبت به فیلم های حاوی اسانس آویشن نشان دادند. افزودن اسانس آویشن در مقایسه با اسانس میخک مقاومت کششی فیلم ها را با شدت بیشتری کاهش داد. این پدیده به خصوص در زمانی که از محلول تشکیل دهنده چنین فیلم هایی برای پوشش دادن ماده غذایی استفاده شود می تواند اثرات منفی به جا گذارد. چنین اثراتی را می توان با تغییر مقدار پلاستی سایزر یا نوع آن کاهش داد.

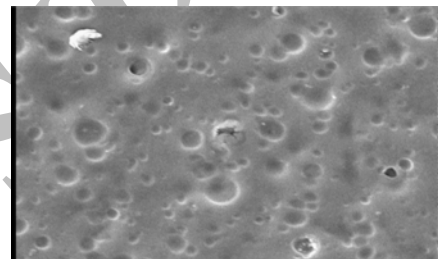
#### ۴- نتیجه گیری کلی

خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی فیلم های کیتوزان غنی شده با اسانس های آویشن و میخک در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. افزودن مستقیم مواد ضد میکروبی به درون ماده غذایی ممکن است بر روی خواص حسی آن تاثیر نامطلوبی داشته باشد؛ بنابراین افزودن ماده ضد میکروبی به درون مواد بسته بندی می تواند چنین اثراتی را کاهش دهد. ماده بسته بندی آزادسازی این ترکیبات را روی سطح ماده غذایی کنترل می کند و سبب می شود که غلظت این ترکیبات همواره بالاتر از حد بحرانی مورد نیاز برای جلوگیری از رشد

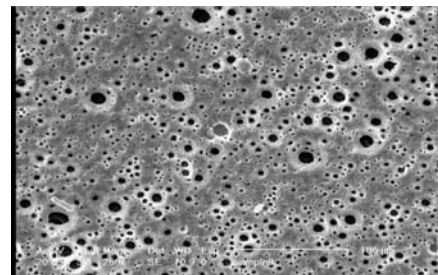
کاهش یافته و حتی منافذ و حفراتی نیز ایجاد شده است. این نتایج تاییدی بر تحقیقات پژوهشگران مختلف در این زمینه می باشند [۳۶،۳۵،۲۲].



فیلم کنترل (فاقد اسانس)



فیلم حاوی ۱۰ درصد اسانس آویشن



فیلم حاوی ۱۰ درصد اسانس میخک

شکل ۳ تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح فیلم های تولید شده

جدول ۱ خواص ضد میکروبی فیلم های تولید شده (قطر هاله ایجاد شده در اطراف دیسک ها بر حسب میلیمتر)

نفوذپذیری در برابر بخار آب ( $10^{-11}$ گرم <sup>-۱</sup> ثانیه <sup>-۱</sup> متر <sup>-۱</sup> پاسکال)				میزان رطوبت (درصد)				ویژگی فیزیکی
کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	غلظت اسانس
۵/۶۶ <sup>d</sup> A	۷/۲۳ <sup>c</sup> B	۹/۶۲ <sup>b</sup> B	۱۰/۸۰ <sup>a</sup> B	۳۲/۲۴ <sup>c</sup> A	۳۶/۲۲ <sup>b</sup> A	۴۰/۴۸ <sup>a</sup> A	۴۱/۷۰ <sup>a</sup> A	نوع اسانس آویشن
۵/۶۶ <sup>d</sup> A	۸/۹۵ <sup>c</sup> A	۱۰/۰۳ <sup>b</sup> A	۱۱/۱۰ <sup>a</sup> A	۳۱/۳۹ <sup>d</sup> B	۳۴/۳۶ <sup>c</sup> B	۳۸/۶۵ <sup>b</sup> B	۴۱/۷۰ <sup>a</sup> A	میخک

- میانگین هایی که در یک ستون با حروف کوچک یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

- میانگین هایی که در مورد یک باکتری در دو ستون کنار یکدیگر با حروف بزرگ یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

جدول ۲ میزان رطوبت و نفوذپذیری فیلم های تولید شده در برابر بخار آب

نفوذپذیری در برابر بخار آب ( $10^{-11}$ گرم <sup>-۱</sup> ثانیه <sup>-۱</sup> متر <sup>-۱</sup> پاسکال)				میزان رطوبت (درصد)				ویژگی فیزیکی
کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	غلظت اسانس
۵/۶۶ <sup>d</sup> A	۷/۲۳ <sup>c</sup> B	۹/۶۲ <sup>b</sup> B	۱۰/۸۰ <sup>a</sup> B	۳۲/۲۴ <sup>c</sup> A	۳۶/۲۲ <sup>b</sup> A	۴۰/۴۸ <sup>a</sup> A	۴۱/۷۰ <sup>a</sup> A	نوع اسانس آویشن
۵/۶۶ <sup>d</sup> A	۸/۹۵ <sup>c</sup> A	۱۰/۰۳ <sup>b</sup> A	۱۱/۱۰ <sup>a</sup> A	۳۱/۳۹ <sup>d</sup> B	۳۴/۳۶ <sup>c</sup> B	۳۸/۶۵ <sup>b</sup> B	۴۱/۷۰ <sup>a</sup> A	میخک

- میانگین هایی که در یک ردیف با حروف کوچک یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

- میانگین هایی که در یک ستون با حروف بزرگ یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

جدول ۳ میزان مقاومت کششی (مگاپاسکال) و درصد افزایش طول فیلم های تولید شده در لحظه پاره شدن

درصد افزایش طول در لحظه پاره شدن				مقاومت کششی (مگاپاسکال)				ویژگی مکانیکی
کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	کنترل	%۰/۵	%۱	%۱/۵	غلظت اسانس
۲۹/۴۸ <sup>c</sup> A	۳۳/۸۶ <sup>b</sup> A	۳۴/۴۲ <sup>b</sup> A	۳۹/۱۲ <sup>a</sup> A	۳/۳۱ <sup>d</sup> B	۳/۸۰ <sup>c</sup> B	۴/۴۱ <sup>b</sup> B	۶/۴۶ <sup>a</sup> A	نوع اسانس آویشن
۲۹/۴۸ <sup>c</sup> A	۲۸/۱۶ <sup>c</sup> B	۳۱/۳۴ <sup>b</sup> B	۳۴/۱۴ <sup>a</sup> B	۴/۵۲ <sup>d</sup> A	۴/۹۱ <sup>c</sup> A	۵/۷۹ <sup>b</sup> A	۶/۴۶ <sup>a</sup> A	میخک

- میانگین هایی که در یک ردیف با حروف کوچک یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

- میانگین هایی که در یک ستون با حروف بزرگ یکسان نشان دار شده اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح  $p < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند.

- concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog. *Journal of Food processing and Preservation*, 9, 107–119.
- [9] Guilbert, S. 1988. Use of superficial edible layer to protect intermediate moisture foods: Application to the protection of tropical fruit dehydrated by osmosis. In C. C. Seow, T. T. Teng, & C. H. Quah, *Food preservation by moisture control* (pp. 199–219). London: Elsevier.
- [10] Siragusa, G. R., & Dickson, J. S. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *Journal of Food Science*, 57(2), 293–296.
- [11] Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67(3), 1162–1169.
- [12] Wang, G. H. 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55 (11), 916–919.
- [13] Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. 1999. Food application of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10(2), 37–51.
- [14] Holley R. A., & Patel D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials: A Review. *Food Microbiology*, 22, 273–292.
- [15] Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. 1995. Antimicrobial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839–2845.
- [16] Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. 2002. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 223–230.
- [17] Packiyasothy, E. V., & Kyle, S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*, 54 (9), 384–387.
- [18] 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.
- [19] Deans, S. G., Noble, R. C., Hiltunen, R., Wuryani, W., & Penzes, L.G. 1995.

باکتری های مضر باشد. افزودن ترکیبات ضد میکروبی تغییرات زیادی در خواص فیزیکی فیلم ها به ویژه نفوذپذیری در برابر بخار آب ایجاد می کند. برای حل این مشکلات می توان از ترکیبات غیرقطبی مثل لیپید ها استفاده نمود. برای کاهش تاثیر افزودن ترکیبات ضد میکروبی روی خواص مکانیکی نیز می توان، از مخلوط پلیمرهای مختلف استفاده نمود و فیلم های ترکیبی<sup>1</sup> تولید کرد. این تحقیق پتانسیل بالای فیلم های کیتوزان غنی شده با اسانس های خوراکی را در جلوگیری از رشد باکتری های بیماریزا به اثبات رساند و نشان داد که می توان از چنین بسته بندی هایی برای افزایش عمر نگهداری مواد غذایی سود برد.

## ۵- منابع

- [1] Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Krujif, N., & Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10(3), 77–86.
- [2] Sonneveld, K. 2000. What drives (food) packaging innovation? *Packaging Technology Science*, 13(1), 29–35.
- [3] Kester, J. J., & Fennema, O. R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology*, 40(12), 47–59.
- [4] Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., & Baker, R. A. 1995. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 509–524.
- [5] Krochta, J. M., & De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2), 61–74.
- [6] Miller, K. S., & Krochta, J. M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 8(7), 228–237.
- [7] Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., & Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 299–313.
- [8] Torres, J. A., & Karel, M. 1985. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. III. Effects of surface preservative

1. Composite film



- [29] Della Porta, G., Taddeo, R., D'Urso, E., Reverchon, E. 1998. Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *LWT*, 31, 454–460.
- [30] Jayatilaka, A., Poole, S. K., Poole, C. F., Chichila, Tina M. 1995. Simultaneous micro steam distillation/solvent extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from cinnamon and their separation by series coupled-column gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 302, 147–162.
- [31] Thoroski, J., Blank, G., & Biliaderis, C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 52 (6), 399–403.
- [32] Black, J. G. 1996. *Microbiology: principles & application*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. pp. 80–82.
- [33] Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., and Cavanagh, H.M. 2003. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 76–81.
- [34] Darmadji, P., & Izumimoto, M. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38, 243–254.
- [35] Wong, D. W., Gastineau, F. A., Gregorski, K. S., Tillin, S. J., & Pavalth, A. E. 1992. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 540–544.
- [36] Moller, H., Grelier, S., Pardon, P., & Coma, V. 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of Chitosan-HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6585-6591.
- [37] Cha, D. S., Choi, J. H., Chinnan, M. S., & Park, H. J. 2002. Antimicrobial Films Based on Na-alginate and  $\kappa$ -carrageenan. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 35: 715–719.
- [38] Chen, M. C., Yeh, G. H., & Chiang, B. H. 1996. Antimicrobial and physicochemical properties of methylcellulose and chitosan films containing a preservative. *Journal of Food Processing and Preservation*, 20, 379-390.
- Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour Fragrance Journal*. 10, 323–328.
- [20] Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. 2001. Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 187–195.
- [21] Seydim, A. C., & Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with thyme, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639–644.
- [22] Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38, 859–865.
- [23] ASTM 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E 96-95. Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material.
- [24] ASTM 1996. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material.
- [25] Kim, J., Marshall, M. and Wei, C. 1995. Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components against Five Foodborne Pathogens? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2839-2845.
- [26] In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum acutidens*
- [27] Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 308–316.
- [28] Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Applied Microbiology*, 29, 130–135.