



ارزیابی خواص فیزیکی مکانیکی، ضد میکروبی و ریزساختاری فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس

احسان آزادبخت^۱، یحیی مقصودلو^{۲*}، مرتضی خمیری^۳، محبوبه کشیری^۴

۱. دانش آموخته، کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۰، تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۵)

چکیده

بسته‌بندی ضد میکروبی نوعی بسته‌بندی فعال است که مهاجرت پیوسته ترکیبات ضد میکروبی به سطح ماده غذایی را فراهم می‌سازد. در این پژوهش فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد حجمی/حجمی) با روش قالب‌گیری تولید و خواص فیزیکی، مکانیکی، میکروبی و ریزساختاری فیلم‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون قطر هاله نشان داد بخار اسانس در ترکیب با فیلم کیتوزان در سطح ۱ و ۱/۵ درصد اسانس قادر به کاهش دانسیته میکروبی بود. افزودن اسانس اکالیپتوس به فیلم کیتوزان در مقایسه با نمونه شاهد محتوی رطوبت، حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب و مقاومت به کشش را به ترتیب ۴۱/۲۸، ۳۹/۰۸، ۲۵/۳۶ و ۲۷/۳ درصد کاهش داد، در حالی که منجر به افزایش درصد طول فیلم در لحظه پاره شدن (۶۵/۶۱ درصد) و ضخامت فیلم گردید. به نظر می‌رسد که خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس ناشی از پیوندهای شکل گرفته بین ترکیبات موجود در اسانس و گروه‌های عاملی کیتوزان بود که در نتیجه خواص فیزیکی فیلم بهبود یافت در حالی که خواص مکانیکی فیلم کاهش پیدا کرد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی موید نتایج به دست آمده در این پژوهش بودند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد این مواد طبیعی آلی پتانسیل بالقوه زیادی دارند و می‌توانند به عنوان بسته بندی فعال به دلیل خاصیت ضد میکروبی و فیزیکی مناسب مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی فعال، اسانس اکالیپتوس گلوبولوس، نفوذ پذیری به بخار آب، مقاومت به کشش.

* نویسنده مسئول: yahyamaghsoudlou@gmail.com

1- مقدمه

14-550 بر اساس نظرات مختلف محققان) است [12].

بسیاری از گونه‌های این جنس نظیر اکالیپتوس اسموتی^۱ از نظر اسانس با ارزش هستند. این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدها است و ترکیب اصلی برگ آن سینئول $C_{10}H_{18}O^2$ (50 تا 80 درصد) می‌باشد که به نام‌های اوکالیپتول^۳ و کاژه پوتول^۴ نیز گفته می‌شود [13]. سینئول مایعی است بی‌رنگ یا کمی زرد رنگ که نقطه جوش 176 درجه سلسیوس دارد و از طریق اسانس‌گیری به‌دست می‌آید [14]. اسانس اکالیپتوس سبب بازداری رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی مثل سالمونلا تیفی موریم، باسیلوس سابتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژنز، اشرشیا کلی، کلیسیلا پنومونیا و هم‌چنین کاندیدا آلبیکنز می‌گردد [15، 16]. نوع ترکیبات شیمیایی اسانس تعیین‌کننده کاربرد اسانس به‌عنوان مواد دارویی و یا مواد معطر و یا صنعتی می‌باشد [17]. بر اساس مطالعات انجام شده، مکانیسم عمل اسانس بر مبنای اثرات این ترکیبات بر غشای سلول تشریح می‌گردد. این ترکیبات آب‌گریز تمایل به حل کردن و تجمع در لایه پیتیدی سیتوپلاسم غشاء سلول‌های باکتریایی را دارند [18].

به تازگی، اسانس‌های مختلف مثل میخک، کارواکرول، پونه کوهی و برگ لیمو با کیتوزان ترکیب شده‌اند و خواص ضد میکروبی خوبی علیه طیف مختلفی از میکروارگانیسم‌ها به‌دست آمده است [19]. هم‌چنین اجاق و همکاران، سازگاری منحصر به فردی بین کیتوزان و اسانس دارچین گزارش دادند و افزودن ترکیب ضد میکروبی به پلیمر منجر به بهبود خواص ضد میکروبی فیلم شد [20]. بر اساس گزارش گومز-استاکا و همکاران، فیلم کیتوزان-ژلاتین غنی شده با اسانس میخک طی نگاهداری سرد ماهی سبب تاخیر و یا بازداری رشد میکروارگانیسم‌ها و ازت فرار کل شد. بر اساس گزارش این محققان فیلم محتوی میخک سبب افزایش انبارمانی ماهی سرد گردید [21]. علاوه بر خواص ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی، افزودن اسانس منجر به اصلاح خواص فیزیکی فیلم می‌شود. نفوذپذیری نسبت به بخار آب فاکتوری مهم برای درک مبادله رطوبت بین محصول پوشش داده شده و محیط اطراف می‌باشد.

صنعت غذا با چالش‌هایی مواجه است که نیاز به اتخاذ رویکردهای خاصی دارد. یکی از این چالش‌ها بسته‌بندی مواد غذایی با عمر ماندگاری کوتاه می‌باشد [1]. اگرچه استفاده از موادی مانند پلاستیک‌ها در نگهداری و حفظ مواد غذایی موثر هستند، اما به‌دلیل این‌که این مواد مشکلاتی جدی برای سلامت محیط زیست ایجاد می‌کنند، نگرانی‌های اجتماعی در این زمینه افزایش یافته است [2]. به‌دلیل نگرانی‌های موجود در رابطه با افزودنی‌های شیمیایی، مصرف‌کنندگان استفاده از مواد حاوی افزودنی‌های طبیعی را ترجیح می‌دهند [3]. فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حامل‌های بسیار خوبی برای ترکیب شدن با افزودنی‌های غذایی متعددی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، عوامل ضدقارچی، عوامل ضدباکتریایی و دیگر افزودنی‌های طبیعی محسوب می‌شوند و این می‌تواند راهی موثر برای کاهش مصرف مواد شیمیایی در نگهداری مواد غذایی به حساب آید [4].

کیتوزان، (1<4)-2-استامید-2-داکسی-بتا-دی-گلوکان، دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت است [5]. از نظر تجاری، کیتوزان محصول تقریباً منحصر به فرد از کیتین است که به‌وسیله دی-استیله شدن قلیایی به‌دست می‌آید [6]. زیست‌تخریب‌پذیری، خوراکی بودن و زیست‌سازگار بودن ماهیت پلیمر سبب شده است کیتوزان توجه زیادی برای کاربردهای مثل کشاورزی، صنعت غذا، داروسازی و فرایندهای بیوتکنولوژی به‌دست آورد [7]. اسانس در ترکیب با پلیمر، خاصیت ضد میکروبی به فیلم می‌دهد. افزودن اسانس‌ها در محلول کیتوزان برای تهیه فیلم و یا پوشش به‌دلیل خواص باکتری‌کشی و قارچ‌کشی مورد توجه زیادی واقع شده است [8]. در این فناوری سرعت رهائش ترکیبات ضد میکروبی کنترل می‌شود و غلظت بیش‌تری از ترکیبات فعال روی سطح محصول برای مدت زمان طولانی‌تری حفظ می‌شود [9]. اسانس‌ها محتوای 85-99 درصد ترکیبات فرار نظیر مخلوطی از ترپن‌ها، ترپنوئیدها و دیگر ترکیبات آلفاتیک و آروماتیک و 1-15 درصد ترکیبان غیرفرار می‌باشند و به‌طور رایج در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [10]. منشاء و خواستگاه گونه‌های اکالیپتوس استرالیا و تاسمانیا می‌باشد که در قسمت‌های مختلف جهان رشد می‌کنند [11]. این جنس دارای تعداد گونه‌های متنوع و زیادی

1. *E. smithii*
2. Cineole
3. Eucalyptol
4. cajepuol

کاشان)، کیتوزان (شنگ بایو کم-چین)، سویه‌های باکتریایی استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی و سالمونلا اینترتیدیس (کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران)، محیط کشت‌های مولار هینتون آگار و برات (مرک، آلمان) و تریپتوز سوی آگار و برات (اسکارلب، اسپانیا)، گلیسرول (شرکت پانرک، اسپانیا) و اسید استیک خالص (مرک، آلمان) در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

2-2- تهیه فیلم

فیلم‌های بر پایه کیتوزان با تکنیک قالب‌گیری بر اساس روش اجاق و همکاران، با کمی اصلاحات تولید شدند [20]. محلول تشکیل دهنده فیلم کیتوزان با حل کردن 1/5 درصد وزنی-حجمی کیتوزان در محلول آبی محتوای 0/7 درصد استیک اسید تهیه گردید و با همزن مغناطیسی در دمای 40 درجه سلسیوس هم زده شد. سپس محلول کیتوزان تهیه شده توسط کاغذ واتمن صاف شد تا ناخالصی‌های غیرمحلول جدا شود. پس از فیلتر کردن به محلول صاف شده گلیسرول (10 درصد وزن پلیمر) به‌عنوان پلاستی سایزر اضافه گردید و به مدت 10 دقیقه هم زده شد. محلول شکل گرفته به مدت 10 دقیقه هواگیری و 25 میلی‌لیتر از آن در مرکز پلیت (8 سانتی‌متر) ریخته شد. سپس فیلم در داخل آن در دمای 38 درجه سلسیوس خشک و فیلم شاهد تولید شد. سپس برای تولید فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس، اسانس اکالیپتوس با غلظت 0/5، 1 و 1/5 درصد حجمی-حجمی به محلول تهیه شده در فوق اضافه گردید و به مدت 5 دقیقه هم زده شد. سپس با استفاده از دستگاه هموژنایزر (D91126، شرکت هایدولف، آلمان) محلول به مدت 4 دقیقه با دور 13000 هموژن گردید. پس از خشک شدن، فیلم از سطح پلیت جدا و مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-3- ارزیابی خاصیت بازدارندگی فیلم زیست فعال

کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس

اشرشیا کلی O157:H، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا اینترتیدیس و باسیلوس سرئوس از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه و در این مطالعه به کار رفت.

کم بودن فاکتور نفوذپذیری نسبت به بخار آب به دلیل کاهش افت وزنی محصول مطلوب است و به‌طور مستقیم روی قوام و ظاهر محصول نقش دارد. افزودن اسانس به ماتریکس پلیمر منجر به بهبود نفوذپذیری نسبت به بخار آب فیلم می‌شود، زیرا اجزای ترکیب شده آب‌گریز در فیلم افزایش می‌یابد [22]. فیلم کیتوزان خالص بدون ترکیبات آب‌گریز نظیر اسانس خواص ممانعت‌کنندگی کمی در مقابل رطوبت در دمای 20 درجه سلسیوس دارد. به‌عنوان مثال افزودن 3 درصد اسانس نارنج سبب کاهش قابل ملاحظه رطوبت به مقدار 50 درصد گردید [10]. بر اساس گزارش محققان، خواص مکانیکی فیلم‌های خوراکی تحت تاثیر واکنش بین اسانس و پلیمر به شرایط فیزیکی، مکانیکی و دمایی بستگی دارد و همچنین اسانس بر انعطاف‌پذیری و پایداری فیلم تاثیر دارد. ترکیب اسانس با پلیمر خواص مقاومتی-مکانیکی فیلم را کاهش می‌دهد، زیرا فاز پراکنده روغن سبب ناپیوستگی ساختار فیلم می‌شود [22]. افزایش درصد طول فیلم تا نقطه شکست فیلم کیتوزان ترکیب شده با اسانس دارچین، چای و یا اسانس نارنج کاهش پیدا کرد [20، 22]. استفاده از اسانس شفافیت، رنگ و درخشندگی فیلم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به‌طور معمول ترکیب اسانس با فیلم درخشندگی و شفافیت فیلم را کاهش می‌دهد [22]، زیرا افزایش در زبری و سفتی فیلم در نتیجه مهاجرت قطرات و تجمع آن‌ها روی سطح فیلم در طی خشک شدن رخ می‌دهد که سبب بی‌نظمی روی سطح فیلم می‌شود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در رنگ هنگامی که غلظت کمی از اسانس به فیلم افزوده شد گزارش نشده است [23، 24].

امروزه استفاده از بسته‌بندی‌های ضد میکروبی بسیار رایج شده است و این بسته‌بندی‌ها از توسعه و انتشار میکروارگانیسم‌های مولد فساد و بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند [25]. اهداف کلی این پژوهش ارزیابی خواص فیزیکی، مکانیکی، ضد میکروبی و ریزساختاری فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس¹ بود.

2- مواد و روش‌ها

1-1- تهیه مواد اولیه

اسانس اکالیپتوس گلوبولوس (شرکت باریج اسانس

1. Eucalyptus globulus

2-6- محتوای رطوبت

محتوای رطوبت فیلم (2 سانتی‌متر مربع) به‌وسیله اندازه‌گیری کاهش وزن فیلم قبل و بعد از خشک کردن در آون با دمای 110 درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت (وزن خشک نمونه) اندازه‌گیری شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد [27].

2-7- حلالیت فیلم در آب

فیلم‌های مورد آزمون به ابعاد 3×1 سانتی‌متر آماده شدند و حلالیت فیلم در آب بر اساس روش حفصه و همکاران، تعیین گردید [27]. این روش به‌عنوان درصد کل ماده محلول فیلم (TSM) که بعد از 6 ساعت غوطه‌وری در آب حل می‌شود تعریف گردید. وزن خشک اولیه (W_1) هر نمونه فیلم به‌وسیله خشک کردن فیلم در آون با دمای 110 درجه سلسیوس تعیین شد. دیسک‌های تهیه شده از هر نمونه فیلم در 50 میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شدند. پس از 6 ساعت غوطه‌وری در دمای 20 درجه سلسیوس با همزن، تکه‌های حل نشده فیلم برداشته شد و تا رسیدن به وزن ثابت (W_2) در آون با دمای 110 درجه سلسیوس خشک، تا وزن ماده خشکی که نامحلول است تعیین شود. حلالیت فیلم توسط معادله (2) محاسبه گردید.

$$\%TSM = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (2)$$

2-8- نفوذپذیری در برابر بخار آب

سرعت نفوذپذیری به بخار آب (WVTP) در فیلم مطابق روش استاندارد ASTM¹ تعیین گردید [28]. نمونه‌های فیلم روی ظروف شیشه‌ای با استفاده از پارافین مذاب نفوذ ناپذیر شدند (قطر داخلی ظرف شیشه‌ای 3 سانتی‌متر، قطر بیرونی 4 سانتی‌متر و به اندازه 5 سانتی‌متر از عمق ظرف را سیلیکاژلی که قبلاً در آون با دمای 2 ± 103 درجه سلسیوس فعال گردید، می‌ریزیم). در ادامه ظروف شیشه‌ای در دسیکاتوری با دمای 2 ± 20 درجه سلسیوس که با محلول اشباع کلرید سدیم به رطوبت نسبی 75 درصد رسیده‌اند قرار داده شدند. ظروف به‌صورت متناوب با استفاده از ترازوی با دقت $0/0001 \pm$ گرم تا رسیدن به وزن ثابت توزین شدند. نرخ انتقال بخار آب

1. American Standard American Society (ASTM)

باکتری‌ها روی محیط کشت مولار هینتون آگار در 37 درجه سلسیوس به مدت 18 ساعت کشت و پس از فعال سازی، یک لوپ باکتری به 10 میلی‌لیتر مولار هینتون برات تلقیح و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سلسیوس نگه‌داری گردید (دانشیته نوری 0/9 در طول موج 600 نانومتر بیانگر ابتدای فاز سکون می‌باشد). در مرحله بعد برای رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، 100 میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی آماده شده، در 10 میلی‌لیتر مولار هینتون برات رقیق و در دمای 37 درجه سلسیوس تا حصول دانشیته نوری 0/2 در طول موج 600 نانومتر نگه‌داری شد. 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های آماده شده به‌طور یکنواخت با استفاده از سوآپ استریل روی محیط کشت تریپتوز سوی آگار پخش گردید. فیلم‌های زیست فعال کیتوزان حاوی اسانس به قطر 3 سانتی‌متر تهیه و به درب پلیت‌ها برای ارزیابی خاصیت بازدارندگی بخار اسانس اکالیپتوس بدون تماس مستقیم با میکروارگانیسم‌ها چسبانده شدند و به مدت 24 ساعت در 37 درجه سلسیوس گرم‌خانه گذاری شدند. قطر منطقه بازدارندگی به‌عنوان نتیجه گزارش گردید [26].

2-4- تهیه و بررسی ویژگی‌های محلول تشکیل دهنده فیلم

برای تعیین رفتار رئولوژیکی محلول تشکیل دهنده فیلم از دستگاه ویسکومتر بروکفیلد که متصل به تنظیم کننده دما جهت ثابت نگه داشتن دما بود استفاده شد. هم‌چنین اسپیندل SC4-18 با قطر 17/48 میلی‌متر و طول 31/72 میلی‌متر مورد استفاده قرار گرفت. منحنی رئولوژیکی بعد از زمان 3 دقیقه در دمای 25 درجه سلسیوس تهیه گردید. مدل پاورلا بری تعیین شاخص قوام (K) و شاخص رفتار جریان (n) به کار گرفته شد [22].

$$\sigma = k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

چگالی و pH محلول فیلم نیز در دمای 25 درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد.

2-5- ضخامت فیلم

ضخامت فیلم‌های تولیدی با استفاده از ریزسنج دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

(ASTM، 2001) برش داده شدند [31]. قبل از آزمون نوارهای برش داده شده در اتاقک با رطوبت نسبی 50 درصد به مدت 24 ساعت در دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری شدند. فاصله بین دو فک 50 میلی‌متر و آهنگ بارگذاری یا همان سرعت هد 50 میلی‌متر/ دقیقه تنظیم گردید. در نمونه‌های فیلم، مقاومت کششی فیلم (TS) با تقسیم حداکثر نیرو (F_{max}) به سطح اولیه (Φ) بر حسب مگاپاسگال و افزایش طول فیلم تا نقطه شکست (EAB) با نسبت افزایش طول فیلم (ΔL) در نقطه پاره شدن به طول اولیه (l_0) بر حسب درصد محاسبه گردید.

$$TS = \frac{F_{max}}{\Phi} \quad (6)$$

$$\%EAB = \frac{\Delta L}{l_0} \times 100 \quad (7)$$

11-2- ارزیابی شکل شناسی فیلم با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی روبشی¹ (SEM)

تغییرات شکل شناسی فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های فیلم در دسیکاتور حاوی پنتا اکسید فسفر به‌طور کامل خشک شدند و در ادامه جهت تصویر برداری از سطح و مقطع عرضی ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع شکسته و سپس از سمت مقابل قسمت شکسته به کمک چسب نقره بر روی پایه فلزی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش دهنده/ پاشنده تا نقطه بحرانی خشک و به مدت 5 دقیقه با ذرات طلا پوشش داده شدند و تصویر برداری از نمونه‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های مختلف انجام گرفت [32].

12-2- آنالیز آماری

در این تحقیق آزمایشات میکروبی در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار انجام شد. اثر عوامل مورد بررسی با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) ارزیابی گردید و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری 5 درصد انجام گرفت.

(WVTR) از تقسیم شیب خط به‌دست آمده از آنالیز رگرسیون وزن رطوبت (ΔW) بر سطح فیلم‌ها (A) در زمان مشخص (Δt) با استفاده از معادله (3) محاسبه شد.

$$WVTR = \frac{\Delta W}{A \Delta t} \quad (3)$$

پس از محاسبه نرخ انتقال بخار آب، نفوذپذیری در برابر بخار آب (WVP) با استفاده از معادله (4) محاسبه شد.

$$WVP = \frac{\Delta m}{\Delta t} \times \frac{X}{\Delta P} \quad (4)$$

که WVP ضریب نفوذپذیری ($g \text{ mm m}^{-2} \text{ d}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)، ضخامت فیلم، ΔP اختلاف فشار بخار آب بین دو طرف فیلم (Pa) می‌باشد.

9-2- اندازه‌گیری رنگ و نور

جهت بررسی رنگ فیلم‌ها از روش پردازش تصویر استفاده شد. در این روش از یک اسکنر اچ‌پی مدل G3110 جهت تصویر برداری استفاده شد. تصاویر با فرمت jpg و فضای رنگی RGB ذخیره شدند. تصاویر گرفته شده توسط نرم‌افزار Image J (Image J software version 1.42e, USA) و برنامه آن (Color-Space-Converter) از فضای رنگی RGB به $L^*a^*b^*$ و b^* تبدیل گردیدند [29]. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. برای تعیین درجه کدورت براساس روش پارک و ژئو، از دستگاه طیف سنجی در طول موج 600 نانومتر استفاده شد [30] و توسط معادله زیر محاسبه گردید:

$$OD = \frac{Abs_{600nm}}{Filmmthickness(mm)} \quad (5)$$

10-2- خواص مکانیکی فیلم‌های تولیدی

خواص مکانیکی فیلم با استفاده از بافت سنج AT-XT-Plus (Stable Micro Systems, Surrey UK) و نرم‌افزار مربوطه (Texture Expert 1.05) با نیرویی معادل 50 نیوتن اندازه‌گیری شد. نوارهای فیلم به ابعاد 25 میلی‌متر عرض و 100 میلی‌متر طول بر اساس روش ASTM D-882

1. Scanning Electron Microscopy

3- نتایج و بحث

3-1- خواص ضد میکروبی بخار اسانس اکالیپتوس در ترکیب با فیلم کیتوزان

ترکیبات ضد میکروبی فرار از طریق مهاجرت در فضای موجود در بسته‌بندی و ترکیبات ضد میکروبی غیر فرار به صورت مواد حل شونده در تماس بین ماده بسته‌بندی و غذا می‌تواند اثرات ضد میکروبی نشان دهند [33]. همان طوری که در جدول (1) مشاهده می‌شود، بخار اسانس در فیلم زیست کامپوزیتی کیتوزان در سطح 0/5 درصد تاثیر مثبتی نداشت و در سطح 1 و 1/5 درصد خاصیت بازدارندگی نشان داد و سبب کاهش دانسیته میکروبی در سطح پلیت گردید. هم‌چنین فیلم زیست کامپوزیت کیتوزان بدون اسانس فاقد هر گونه فعالیت ضد باکتریایی بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق با گزارش کشیری و همکاران مبنی بر عدم افزایش فعالیت ضد میکروبی فاز بخار فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی مطابقت داشت [34].

3-2- ویژگی‌های محلول تشکیل دهنده فیلم¹ (FFD)

دانسیته (ρ) ، pH و خواص رئولوژیکی محلول تشکیل دهنده فیلم در جدول (2) نشان داده شده است. نتایج این تحقیق نشان داد مقدار دانسیته محلول با افزایش غلظت اسانس از $1001/84 \text{ kg/m}^3$ به $910/11 \text{ kg/m}^3$ کاهش اما pH از 4/56 به 5/33 افزایش یافت. فعالیت ضد میکروبی کیتوزان در pH پایین بیش تر است زیرا یونیزاسیون گروه‌های آمینی آن افزایش می‌یابد [35]. بر اساس نتایج محققان بار مثبت روی گروه NH_3^+ مونومر گلوکز آمین در $\text{pH} < 6/3$ با بار منفی غشای سلولی باکتری‌ها واکنش داده و منجر به نشت مواد درون سلولی می‌گردد [36]

1. Film-Forming Dispersions

اما در pH های بالاتر از 6، کیتوزان تمایل دارد بار مثبت خود را از دست دهد و ممکن است به دلیل دی پروتونه شدن گروه‌های عاملی در محلول‌های با pH بالا رسوب کند [37].

در ارتباط با رئولوژی محلول‌های تشکیل دهنده فیلم، شاخص قوام (k) و رفتار جریان (n) نسبت به نمونه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش یافت و هم‌چنین بین غلظت‌های مختلف اسانس تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. شکل (1) منحنی تجربی جریان محلول‌های متفاوت کیتوزان حاوی اسانس را نشان می‌دهد. مقدار ضریب همبستگی تمامی نمونه‌ها نزدیک 1 بود. افزودن اسانس اکالیپتوس گلوبولوس به پلیمر سبب تغییر رفتار رئولوژیکی محلول کیتوزان گردید که با نتایج تحقق سانچز-گنزالز و همکاران روی اسانس درخت چای و کیتوزان مطابقت داشت [22]. رفتارهای رئولوژیکی دیسپرسیون‌ها تابع خصوصیات فاز پراکنده مثل غلظت، اندازه و توزیع ذرات و بار الکتریکی سطحی می‌باشد [38]. محلول‌های تشکیل دهنده فیلم به دلیل تاثیر قابل توجه اسانس اکالیپتوس گلوبولوس، رفتار سودوپلاستیک (رقیق شونده با برش) از خود نشان دادند. تغییر در رفتار محلول‌های تشکیل دهنده فیلم تابع این عوامل می‌باشد: تغییر در غلظت کیتوزان در فاز پیوسته به دلیل جذب سطحی ناحیه مشترک آب-روغن، بنابراین ظرفیت غلیظ شونده‌گی کاهش و بار الکتریکی ذرات تغییر می‌کند [39].

اسانس‌ها با افزایش غلظت فاز پراکنده، سبب کاهش دسترس پذیری کیتوزان در فاز پیوسته می‌شوند و به همین دلیل جذب سطحی پلیمر در ناحیه سطحی قطرات افزایش و به دنبال آن ویسکوزیته محلول کاهش می‌یابد.

3-3- ضخامت فیلم

فیلم شاهد دارای ضخامت کم‌تری نسبت به فیلم‌های

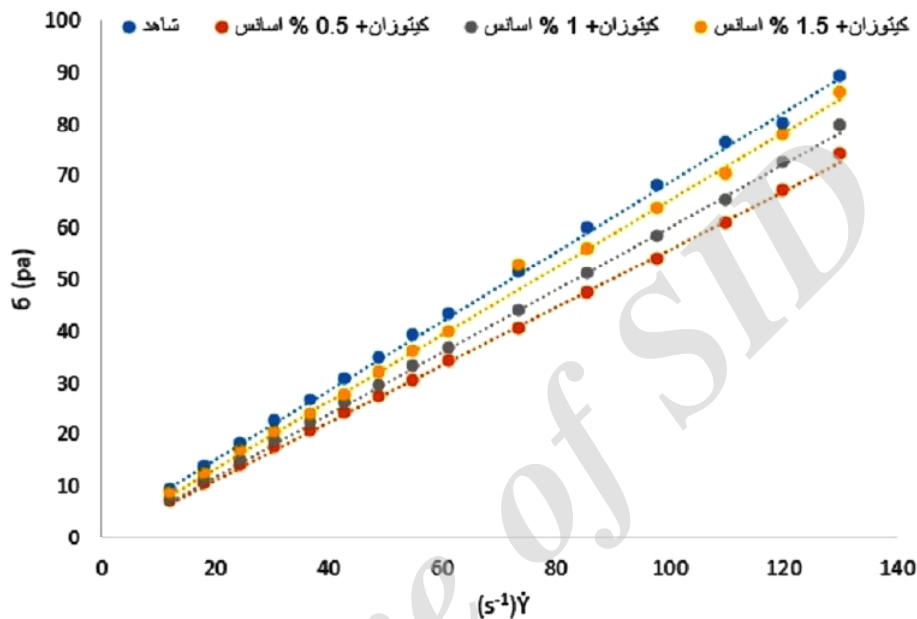
جدول (1) تاثیر غلظت اسانس اکالیپتوس گلوبولوس در فیلم زیست فعال کیتوزان بر مهار رشد باکتریایی در فاز بخار

| نوع میکروارگانیسم | فیلم حاوی 0/5 درصد اسانس | فیلم حاوی 1 و 1/5 درصد اسانس |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|
| اشرشیا کلی | --- | +++ |
| سالمونلا اینترتیدیس | --- | +++ |
| باسیلوس سرئوس | --- | +++ |
| استافیلوکوکوس اورئوس | --- | +++ |

--- قطر هاله بازدارندگی رشد مشاهده نشد. +++ دارای محدوده بازدارندگی و کاهش قابل ملاحظه دانسیته میکروبی در سطح پلیت

جدول (2) ویژگی‌های محلول تشکیل دهنده فیلم (FFD): دانسیته، pH، ضرایب k و n و ضریب همبستگی

| محلول فیلم | pH | ρ (kg/m ³) | n | k | r ² |
|----------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|
| شاهد | 4/56 ± 0/7 ^a | 1001/84 ± 0/57 ^a | 0/883 ± 0/003 ^b | 0/718 ± 0/01 ^a | 0/997 |
| کیتوزان + 0/5٪ اسانس | 4/77 ± 0/22 ^a | 1000/33 ± 0/13 ^a | 0/919 ± 0/01 ^a | 0/613 ± 0/027 ^b | 0/998 |
| کیتوزان + 1٪ اسانس | 4/95 ± 0/08 ^b | 998/2 ± 0/37 ^b | 0/911 ± 0/004 ^{ab} | 0/631 ± 0/029 ^b | 0/997 |
| کیتوزان + 1/5٪ اسانس | 5/33 ± 0/29 ^c | 910/11 ± 0/4 ^c | 0/924 ± 0/02 ^a | 0/608 ± 0/008 ^b | 0/997 |



شکل (1) رفتار جریان محلول‌های تشکیل دهنده فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس

ترکیب شده با اسانس اکالیپتوس بود. ضخامت فیلم ترکیب شده با اسانس اکالیپتوس در سطح 1/5 درصد 0/080 میلی‌متر بود که در مقایسه با نمونه شاهد (0/050 میلی‌متر) افزایش یافت و در تطابق با نتایج سایر محققان بود [20, 40, 41] اما با تحقیق صورت گرفته روی اسانس درخت چای و کیتوزان مطابقت نداشت [22].

(فیلم کیتوزان حاوی 1/5 درصد اسانس اکالیپتوس) کاهش یافت. در واقع افزودن اسانس اکالیپتوس به فیلم کیتوزان سبب شکل‌گیری باندهای کووالانسی و کاهش دسترس‌پذیری بین گروه‌های عاملی آمین و هیدروکسیل زنجیره کیتوزان و اسانس و محدود شدن واکنش‌های آب-پلی‌ساکارید به‌وسیله باندهای هیدروژنی گردید و در نتیجه مقدار رطوبت فیلم کیتوزان کاهش یافت [30]. ترکیبات غیرقطبی موجود در اسانس اثر دفع‌کننده روی ملکول‌های آب دارند و منجر به ایجاد تغییراتی در سطح ساختار ملکولی و کاهش فشردگی ساختار سطحی فیلم می‌شوند که این تغییرات ساختاری در تصاویر میکروسکوپ الکترونی (شکل 2) قابل مشاهده است.

با توجه به خاصیت آب‌دوستی کیتوزان، افزودن اسانس اکالیپتوس گلوبولوس به پلیمر کیتوزان با نسبت‌های مختلف حجمی/حجمی سبب کاهش حلالیت فیلم گردید و در مقایسه

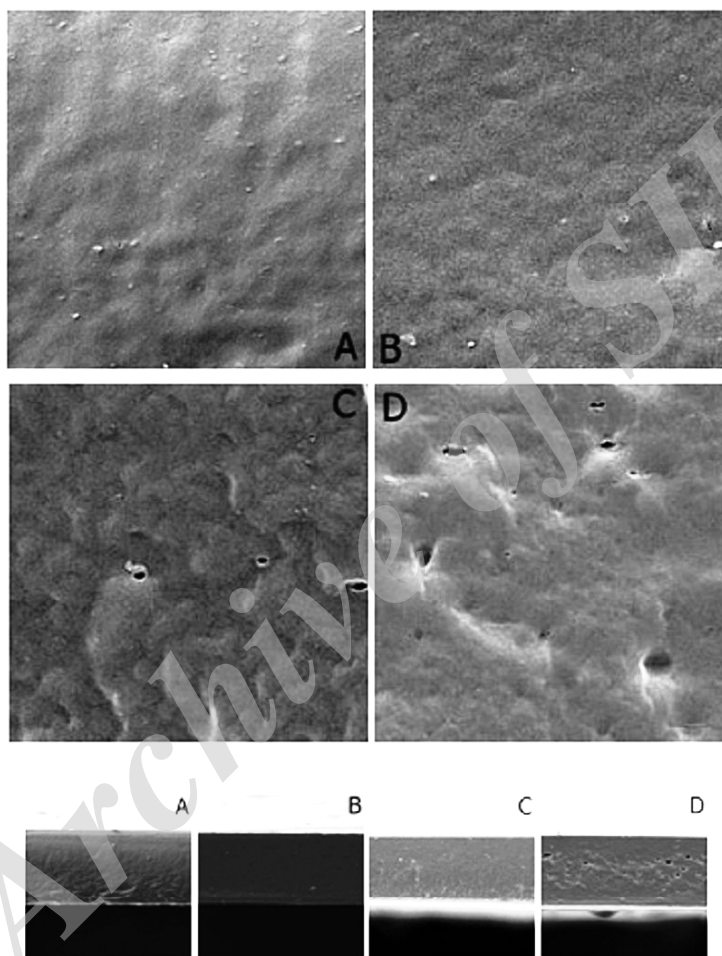
تاثیر افزودن اسانس بر خواص فیزیکی فیلم کیتوزان در جدول (3) نشان داده شده است. محتوی رطوبت و حلالیت فیلم با افزودن اسانس به کیتوزان کاهش یافت که نتیجه به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج سایر محققان مطابقت داشت [27, 40, 42]. با افزایش غلظت اسانس اکالیپتوس، محتوی رطوبت از 22/48 درصد (نمونه شاهد) به 13/2 درصد

4-3- محتوای رطوبت و حلالیت

میکروسکوپ الکترونی (شکل 2) قابل مشاهده است.

جدول (3) خواص فیزیکی فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی نسبت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس

| فیلم | ضخامت (میلی‌متر) | حلالیت در آب (درصد) | محتوای رطوبت (درصد) | نفوذپذیری به بخار آب ($10^{-11} \text{gm}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1} \times$) |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| شاهد | $0/050 \pm 0/009$ ^b | $26/07 \pm 1/54$ ^a | $22/48 \pm 1/14$ ^a | $10/96 \pm 0/47$ ^a |
| کیتوزان + 0/5٪ اسانس | $0/061 \pm 0/01$ ^b | $23/94 \pm 1/66$ ^{ab} | $18/03 \pm 2/00$ ^{ab} | $10/03 \pm 0/3$ ^{ab} |
| کیتوزان + 1٪ اسانس | $0/068 \pm 0/007$ ^{ab} | $19/63 \pm 1/22$ ^{bc} | $15/43 \pm 0/7$ ^{bc} | $9/11 \pm 0/7$ ^{bc} |
| کیتوزان + 1/5٪ اسانس | $0/080 \pm 0/008$ ^a | $15/88 \pm 2$ ^c | $13/2 \pm 0/9$ ^c | $8/18 \pm 0/68$ ^c |



شکل (2) تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس گلوبولوس (حجمی-حجمی).
A شاهد - B 0/5 درصد اسانس - C 1 درصد اسانس - D 1/5 درصد اسانس

با نمونه کنترل حلالیت فیلم کیتوزان حاوی 1/5 درصد اسانس در حدود 39 درصد کاهش یافت و همسو با این نتایج، حلالیت فیلم کیتوزان-درچین و لیمو به ترتیب 57/29 و 78/61 درصد بود که در مقایسه با فیلم کنترل کاهش قابل توجه‌ای نشان داد و اتصالات عرضی در ماتریکس فیلم کیتوزان منجر به کاهش حلالیت گردید و فیلمی با تمایل کم برای جذب آب تولید شد که این ویژگی سبب حفظ تمامیت محصول و مقاومت آن به آب خواهد شد [40]. حلالیت و محتوای رطوبت دو فاکتور مهم فیلم‌های زیست تخریب پذیر می‌باشند که بر مقاومت فیلم به آب به‌ویژه در محیط‌های مرطوب تاثیرگذار می‌باشند [40]. حلالیت پذیری فیلم به انتشار آب، به گروه‌های آمینی و کربوکسیلی، تفکیک و جدایی باندهای هیدروژنی و یونی

وابسته است [43].

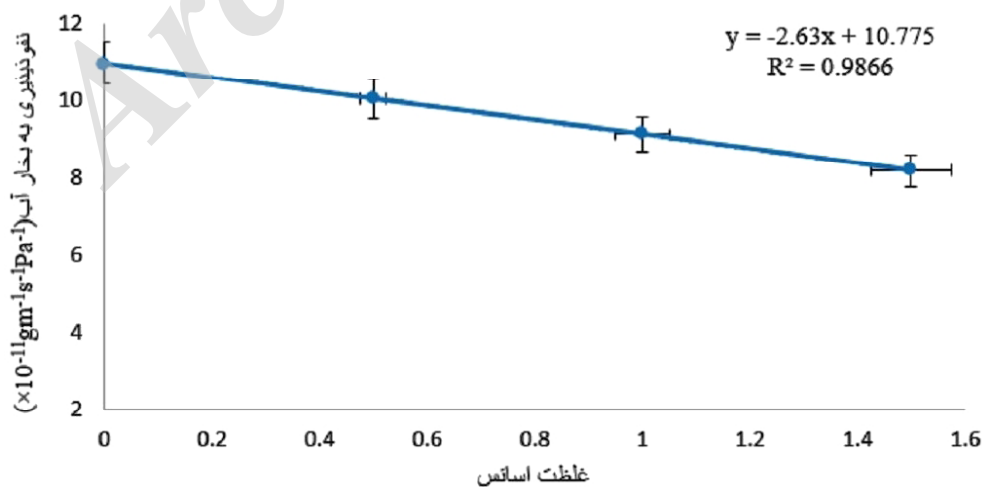
آب تابع نسبت اسانس به کیتوزان است و به صورت خطی با افزایش مقدار اسانس کاهش می‌یابد و بیش‌ترین کاهش نفوذپذیری به بخار آب به میزان 25 درصد با افزودن 1/5 درصد اسانس حاصل گردید.

3-5- نفوذپذیری به بخار آب

یکی از نقش‌های اصلی بسته‌بندی محافظت از غذا به وسیله ممانعت و یا کاهش انتقال رطوبت و شکل‌گیری مانعی برای جلوگیری و یا کاهش تماس غذا با محیط بیرون می‌باشد. با افزایش ترکیبات آب‌گریز نفوذپذیری به بخار آب کاهش می‌یابد، زیرا انتقال بخار آب از طریق بخش‌های آب‌دوست فیلم رخ می‌دهد. بنابراین نفوذپذیری به بخار آب به نسبت بین ترکیبات آب‌گریز و آب‌دوست فیلم وابسته است [44]. همان طوری که در جدول (3) نشان داده شده است نفوذپذیری به بخار آب فیلم با افزودن اسانس از 10/96 (فیلم شاهد) به 8/18 (فیلم حاوی 1/5 درصد اسانس اکالیپتوس) کاهش یافت که با نتایج به دست آمده از پژوهش پنگ و لی، زیوانویچ و همکاران، وارگاس و همکاران و سانچز-گزالس و همکاران مبنی بر کاهش نفوذپذیری به بخار آب با افزودن اسانس مطابقت داشت [22, 40, 45, 46]. به دلیل ماهیت آب‌گریزی و خاصیت لیپیدی اسانس‌ها، این ترکیبات سبب افزایش خاصیت ممانعت‌کنندگی فیلم می‌شوند [47]. فاز لیپیدی فیلم فاکتور خمیدگی (پیچ خوردگی) برای انتقال ملکول‌های آب در شبکه فیلم و عبور از سطح مقطع فیلم را افزایش می‌دهد. فاکتور خمیدگی هنگامی که نسبت فاز روغنی افزایش می‌یابد بیش‌تر می‌شود [48]. شکل (3) نشان می‌دهد که نفوذپذیری به بخار

3-6- اندازه‌گیری رنگ و نور

کدورت و رنگ فیلم دو فاکتور مهم برای ظاهر عمومی و پذیرش مصرف‌کننده می‌باشند. شفافیت فیلم خاصیت وابسته و مهمی است، زیرا تاثیر مستقیمی روی ظاهر محصول پوشش داده شده می‌گذارد. بر اساس جدول (4) فیلم کیتوزان با شاخص $a^* + b^*$ (15/97) و کدورت (2/01) به مقدار کمی زرد رنگ و کدر می‌باشد و هر سه پارامتر L^* ، a^* و b^* تحت تاثیر افزودن اسانس قرار گرفتند. با افزودن اسانس، شاخص b^* و کدورت به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش اما شاخص L^* کاهش یافت و باعث کاهش شفافیت فیلم و تغییر رنگ به سمت قرمز (+a) و زرد (+b) گردید. تفاوت در رنگ می‌تواند به ماهیت زرد رنگ اسانس نسبت داده شود. تفاوت در مقدار کدورت بین نمونه‌های فیلم مربوط به ساختار درونی فیلم در طی فرایند خشک کردن و ساختار محلول اولیه تشکیل دهنده آن (مثل حجم فاز پراکنده و اندازه قطرات روغن) می‌باشد [49]. همسو با نتایج به دست آمده از این تحقیق، افزودن اسانس درخت چای به کیتوزان باعث کاهش جلا فیلم گردید و هم‌چنین تابع غلظت اسانس می‌باشد [22]. نتایج مشابه این تحقیق به وسیله



شکل (3) نفوذپذیری به بخار آب فیلم زیست فعال کیتوزان حاوی نسبت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس در دمای 20 درجه سلسیوس

سایر محققان روی فیلم‌های کامپوزیت محتوی لیپید گزارش شده است [49، 50].

شد. فاکتورهایی نظیر منبع کیتوزان، اسانس، متوسط مقدار اسید مورد استفاده برای حل کردن پلیمر و شرایط آزمایش روی خاصیت مکانیکی فیلم موثر می‌باشند. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با سایر محققان زمانی که اسانس به ماتریکس کیتوزان افزوده شد هم راستا بود [45، 46].

مطابق با نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، سانچز-گنزالز و همکاران گزارش دادند که مقاومت به کشش فیلم کیتوزان با ترکیب اسانس نارنج کاهش یافت [22]. هم‌چنین حسینی و همکاران گزارش کردند که افزودن اسانس آویشن به کیتوزان سبب کاهش مقاومت به کشش و افزایش درصد طول فیلم در نقطه شکست گردید [32]، اما بر اساس گزارش اجاق و همکاران مقاومت به کشش فیلم با افزودن اسانس دارچین

3-7- خواص مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس

تاثیر اسانس اکالیپتوس گلوبولوس روی خواص مکانیکی فیلم مورد ارزیابی و نتایج در جدول (5) نشان داده شده است. همان‌طوری که نشان داده شده است فیلم شاهد مقاومت به کشش بالاتری نسبت به سایر نمونه‌های فیلم دارد و افزودن اسانس اکالیپتوس منجر به افزایش درصد طول فیلم و الاستیسیته آن‌ها و کاهش مقاومت به کشش فیلم گردید، زیرا اسانس سبب قطع و گسستگی ساختار منظم پلیمر کیتوزان



شکل (4) رنگ نمونه‌های فیلم کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس اکالیپتوس گلوبولوس (حجمی-حجمی). A شاهد- B 0/5 درصد اسانس- C 1 درصد اسانس- D 1/5 درصد اسانس

جدول (4) خواص رنگی و نوری فیلم کیتوزان ترکیب شده با اسانس

| کدورت | b* | a* | L* | فیلم |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| 2/01 ± 0/6 ^c | 15/97 ± 1/55 ^d | -0/1 ± 0/01 ^c | 86/35 ± 0/65 ^a | شاهد |
| 3/79 ± 0/21 ^b | 22/59 ± 0/41 ^c | 0/02 ± 0/08 ^c | 85/9 ± 0/1 ^a | کیتوزان + 0/5٪ اسانس |
| 4/36 ± 0/36 ^b | 26/35 ± 1 ^b | 1/21 ± 0/06 ^b | 81/5 ± 0/13 ^b | کیتوزان + 1٪ اسانس |
| 5/2 ± 0/2 ^a | 31/15 ± 0/5 ^a | 2/01 ± 0/09 ^a | 78/8 ± 0/19 ^c | کیتوزان + 1/5٪ اسانس |

جدول (5) خواص مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس

| فیلم | مقاومت به کشش (MPa) | درصد طول شدن | مقاومت به سوراخ شدن (N) | مقاومت به تغییر شکل (mm) |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| شاهد | 36/7 ± 0/3 ^a | 21/58 ± 0/27 ^d | 20/99 ± 0/9 ^a | 6/41 ± 0/39 ^a |
| کیتوزان + 0/5٪ اسانس | 34/5 ± 0/5 ^b | 25/24 ± 0/5 ^c | 19/61 ± 0/64 ^b | 4/6 ± 1 ^b |
| کیتوزان + 1٪ اسانس | 30 ± 2 ^c | 28/03 ± 0/61 ^b | 16/25 ± 0/21 ^c | 4/5 ± 0/13 ^b |
| کیتوزان + 1/5٪ اسانس | 26/68 ± 0/32 ^d | 35/74 ± 0/72 ^a | 14/52 ± 0/4 ^d | 3/94 ± 0/43 ^b |

میکروسکوپی نهایی که به وسیله محلول‌های مختلف تشکیل دهنده فیلم پس از خشک کردن شکل می‌گیرد، تحت تاثیر نظم ساختاری ترکیب‌های مختلف سوسپانسیون اولیه (اسانس و کیتوزان) و توسعه آن‌ها در طی فرایند خشک کردن می‌باشد. مطابق با نتایج به دست آمده از این تحقیق، سانچز-گنزالس و همکاران گزارش دادند افزودن اسانس درخت چای به کیتوزان به دلیل دوفازی شدن سبب ناپیوستگی‌های شبکه پلیمر گردید و تعداد قطرات روغن با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت. قطرات اسانس هنگامی که نسبت اسانس به کیتوزان افزایش یافت به طور کامل درون محلول فیلم هموزن گردیدند، اما در زمان خشک شدن فیلم در قسمت بالایی فیلم تجمع یافته و حالتی از انعقاد رخ داد [22].

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش خواص ضد میکروبی، فیزیکی، مکانیکی و ریزساختاری فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس گلوبولوس علیه *اشرشیا کلی*، *سالمونلا اینترتیدیس*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اساس قطر هاله و تبخیر اسانس در محیط جامد مطلوب بود. ایجاد اتصالات گسترده بین زنجیره‌های در فیلم‌های حاوی اسانس اکالیپتوس منجر به تغییراتی همانند کاهش محتوی رطوبت، حلالیت در آب، نفوذپذیری به بخار آب و افزایش درصد طول فیلم و ضخامت گردید. تصاویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده تاثیر اسانس بر ساختار فیلم‌های حاوی غلظت‌های متفاوت اسانس اکالیپتوس از لحاظ وجوه حفره، شکل سطحی و الگوی فشردگی به ویژه در سطح 1/5 درصد در مقایسه با نمونه شاهد را تایید کرد و همین تغییر ساختار باعث گردید خواص مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس تضعیف گردد در حالی که خواص فیزیکی فیلم نظیر حلالیت، محتوای رطوبت و نفوذپذیری به بخار آب بهبود یابد. این پژوهش نشان داد فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس اکالیپتوس پتانسیل بالای در جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا دارند و از آن‌ها می‌توان برای افزایش طول عمر مواد غذایی استفاده نمود.

افزایش، اما درصد افزایش طول در نقطه شکست کاهش یافت [20]. هم‌چنین بر اساس گزارش سانچز-گنزالس و همکاران افزودن اسانس درخت چای (2-0/5 درصد) سبب کاهش قابل ملاحظه‌ای در مدول الاستیسیته، مقاومت به کشش و تغییر شکل در نقطه شکست می‌گردد و زمانی که 2 درصد اسانس درخت چای به محلول فیلم افزوده شد به علت تخریب شبکه فیلم بیش‌ترین کاهش (بالتر از 50 درصد) در همه پارامترهای مکانیکی رخ داد. خواص مکانیکی ضعیف فیلم کیتوزان حاوی اسانس درخت چای به دلیل نظم ساختاری فاز چربی درون ماتریکس پلیمر می‌باشد. بنابراین ناپیوستگی ساختاری و تخریب شبکه فیلم به دلیل افزودن اسانس سبب تضعیف خواص مکانیکی فیلم‌های کامپوزیتی می‌گردد [22]. قدرت کششی و افزایش طول فیلم مربوط به ساختار میکروسکوپی و نیروهای بین ملکولی می‌باشد [51]. بر اساس تحقیقات صورت گرفته، فعل و انفعالات در ماتریکس پلیمر با افزودن اسانس‌های مختلف، متفاوت است. با این حال، ترکیبات کیتوزان، وجود پلاستی سایزر و هموزنیزاسیون و شرایط تهیه فیلم تاثیر فراوانی بر خواص مکانیکی فیلم دارند [40].

3-8- ارزیابی شکل شناسی فیلم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل (2) شکل شناسی سطح و مقطع عرضی نمونه‌های فیلم را نشان می‌دهد که تفاوت‌های بارزی با یکدیگر دارند. فیلم کیتوزان دارای سطح یکسان و بدون ترک می‌باشد، اما زمانی که اسانس به ویژه در غلظت 1/5 درصد به فیلم کیتوزان افزوده شد ساختمان میکروسکوپی به طور قابل توجهی تغییر کرد (شکل D) و منجر به شکل گیری ساختاری غیریکسان گردید و قطرات روغن در شبکه پلیمر به دام انداخته شدند. در طی تبخیر حلال قطرات روغن به مقدار اندکی کشیده و بزرگ‌تر و از شکل کروی خارج شدند و بر اساس گزارش محققان به علت نیروهای تغییر شکل و نیروهای کششی ایجاد شده در طی تجمع زنجیره‌های پلیمر هنگام تبخیر حلال می‌باشد [22]. به دلیل ماهیت امولسیون آب/روغن با افزایش مقدار اسانس برخورد بین قطرات بیش‌تر و در نتیجه اندازه آن‌ها بزرگ‌تر و هم‌چنین میزان انعقاد افزایش می‌یابد [39]. ساختار

- [10] Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Eng. Rev.*, 3(1), 1-16.
- [11] Preedy, V. R. (Ed.). (2015). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. *Academic Press.UK.* 930P.
- [12] Keay, R.W.J. (1989). Tree of Nigeria. Oxford Science Publications, Oxford, UK. Pg 78. *KFDA.* (2011). Korea food additive code. Korea Food and Drug Administration (KFDA). Available at http://www.mfds.go.kr/fa/ebook/egongjeon_intro.html; http://fa.kfda.go.kr/standard/egongjeon_standard_view.jsp?SerialNo¼130&GoCa¼2&currPage¼41&stext¼ chitosan Accessed on 08.01.13.
- [13] صمصام شریعت، ه.؛ معطر، ف. (1370) گیاهان و داروهای طبیعی، انتشارات موسسه مشعل اصفهان. ص 432
- [14] Ayepola, O. O., Adeniyi, B. A. (2008). The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). *J. Applied Sci. Res.*, 4(11), 1410-1413.
- [15] Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N. A. B., Mabrouk, S., ben Salem, Y., Salah, K. B. H., Khouja, M. L. (2012). Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC complementary and alternative medicine.*, 12(1), 1.
- [16] Mohammed, G., Abe Ayotunde, S., Bashir, I., Aji, B. M., Aliyu, S., Hauwa, M. (2012). Comparative evaluation of ethno-medicinal use of two species of *Eucalyptus* plant as an antimicrobial agent. *Int. J. Sci. Technol.*, 2(8), 548-550.
- [17] Melo, M. S., Guimarães, A. G., Santana, M. F., [1] Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future., *Trends Food sci. Technol.*, 14(3), 71-78.
- [2] Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M. G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V., Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *J. Food Bio. Technol.*, 3(3), 434-440.
- [3] Davidson, P. M., Taylor, T. M., Schmidt, S. E. (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *In Food microbial.*, pp. 765-801.
- [4] Rhim, J. W., Ng, P. K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Crit Rev. Food Sci. Nut.*, 47(4), 411-433.
- [5] Peter, M. G. (1995). Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. Mac Sci.*, 32(4), 629-640.
- [6] Zivanovic, S., Davis, R. H., Golden, D. A. (2014). Chitosan as an antimicrobial in food products. *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*, 153.
- [7] Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.*, 10(2), 37-51.
- [8] Ali, A., Noh, N. M., Mustafa, M. A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food pack and shelf life.*, 3, 56-61.
- [9] Kristo, E., Koutsoumanis, K. P., Biliaderis, C. G. (2008). Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hyd.*, 22(3), 373-386.

- LWT-Food Sci. Tech.*, 38(8), 859-865.
- [25] Quintavalla, S., & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.*, 62(3), 373-380.
- [26] Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., López-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P. (2012). Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *Int. J. Food Microbiol.*, 157(2), 195-201.
- [27] Hafsa, J., ali Smach, M., Khedher, M. R. B., Charfeddine, B., Limem, K., Majdoub, H., & Rouatbi, S. (2016). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing Eucalyptus globulus essential oil. *LWT- Food Sci. Technol.*, 68, 356-364.
- [28] ASTM (2003). Annual book of ASTM standards. Pennsylvania: American Society for Testing and Materials.
- [29] Salehi, F., & Kashaninejad, M. (2014). Effect of different drying methods on rheological and textural properties of Balangu seed gum. *Dry Technol.*, 32(6), 720-727.
- [30] Park, S. I., Zhao, Y. (2004). Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *J. Agric. Food Chem.*, 52(7), 1933-1939.
- [31] ASTM (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882 Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- [32] حسینی، س.؛ رضوی، س.؛ موسوی، س. (1388) بررسی خواص فیزیکی، مکانیکی، ضدباکتریایی و ریز ساختاری فیلم‌های تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس‌های آویشن و دارچین، مجله الکترونیک فراوری و نگهداری مواد غذایی. شماره 2، ص 47-68.
- [33] Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burman-*
- Siqueira, R. S., De Lima, A. D. C. B., Dias, A. S., Almeida, J. R. (2011). Anti-inflammatory and redox-protective activities of citronellal. *Biotech. Res.*, 44(4), 363-368.
- [18] Becerril, R., Gómez-Lus, R., Goni, P., López, P., Nerín, C. (2007). Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chem.*, 388(5-6), 1003-1011.
- [19] Fernández-Pan, I., Maté, J. I., Gardrat, C., Coma, V. (2015). Effect of chitosan molecular weight on the antimicrobial activity and release rate of carvacrol-enriched films. *Food Hyd.*, 51, 60-68.
- [20] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem.*, 122(1), 161-166.
- [21] Gómez-Estaca, J., de Lacey, A. L., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol.*, 27(7), 889-896.
- [22] Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J. Food Eng.*, 98(4), 443-452.
- [23] 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 Sci.*, 82(3), 338-345.
- [24] Pranoto, Y., Rakshit, S. K., Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin.

- (2006). Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. *Bio.*, 82(2), 176-187.
- [44] Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biol. Tec.*, 45(2), 254-264.
- [45] Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.*, 70(1), M45-M51.
- [46] Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hyd.*, 23(2), 536-547.
- [47] Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., Cháfer, M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hyd.*, 23(8), 2102-2109.
- [48] Pérez-Gago, M. B., Krochta, J. M. (2001). Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *J. Agr. Food Chem.*, 49(2), 996-1002.
- [49] Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., Chiralt, A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hyd.*, 19(1), 53-61.
- [50] Trezza, T. A., Krochta, J. M. (2000). The gloss of edible coatings as affected by surfactants, lipids, relative humidity, and time. *J. Food Sci.*, 65(4), 658-662.
- [51] Atarés, L., Bonilla, J., Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *J. Food Eng.*, 100(4), 678-687.
- nii): activity against foodborne pathogenic bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, 55(14), 5484-5490.
- [34] کشیری، م.؛ مقصدلو، ی.؛ خمیری، م.؛ بهروز، ر. (1393). ارزیابی خواص ضدباکتریایی فیلم زیست فعال زئین حاوی اسانس آویشن شیرازی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره 50، ص 195-206.
- [35] Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.*, 21(6), 703-714.
- [36] Liu, H., Du, Y., Yang, J., Zhu, H. (2004). Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. *Carbohydr Polym.*, 55(3), 291-297.
- [37] Holappa, J., Hjalmsardóttir, M., Másson, M., Rúnarsson, Ö., Asplund, T., Soininen, P., Järvinen, T. (2006). Antimicrobial activity of chitosan N-betainates. *Carbohydr Polym.*, 65(1), 114-118.
- [38] Rao, M. A. (1977). Rheology of liquid foods-A review. *J. Texture Studies.*, 8(2), 135-168.
- [39] McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques. *CRC press.*, p.352.
- [40] Peng, Y., Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hyd.*, 36, 287-293.
- [41] Hosseini, M. H., Razavi, S. H., Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J. Food Process Preserv.*, 33(6), 727-743.
- [42] Ma, Q., Zhang, Y., Zhong, Q. (2016). Physical and antimicrobial properties of chitosan films incorporated with lauric arginate, cinnamon oil, and ethylenediaminetetraacetate. *LWT-Food Sci. Technol.*, 65, 173-179.
- [43] Mathew, S., Brahmakumar, M., Abraham, T. E.