



## بررسی خواص فیزیکی، مکانیکی، ضدباکتریایی و ریزساختاری فیلم‌های خوراکی تولیدشده از کیتوزان محتوی اسانس‌های آویشن و دارچین

سیدمحمدهاشم حسینی<sup>۱</sup>، سیده‌های رضوی<sup>۲</sup> و سیدمحمدعلی موسوی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران، <sup>۲</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی،

دانشگاه تهران، <sup>۳</sup> استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۲۰

### چکیده

افزودن مستقیم ترکیبات ضد میکروبی به بسته‌بندی مواد غذایی، یکی از انواع بسته‌بندی‌های فعال می‌باشد. در این پژوهش، فیلم‌های خوراکی کیتوزان محتوی اسانس‌های آویشن و دارچین، در سه سطح غلظتی ۰/۵ درصد، ۱ درصد و ۱/۵ درصد تولیدشده و خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور بررسی تغییرات ریزساختاری ناشی از افزودن اسانس‌ها، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها تهیه گردید. اثر بازدارندگی فیلم‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت، بیش از باکتری‌های گرم منفی بود. فیلم‌های محتوی اسانس آویشن در مقایسه با نمونه‌های محتوی اسانس دارچین اثر بازدارندگی بیش‌تری را در برابر باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند. افزودن اسانس آویشن به فیلم‌های کیتوزان محتوی رطوبت، درصد انحلال در آب، نرخ عبور بخار آب و درصد افزایش طول فیلم‌ها را در لحظه پاره شدن افزایش داد؛ در حالی که افزودن اسانس دارچین منجر به افزایش مقاومت کششی فیلم‌ها، کاهش محتوای رطوبت و درصد انحلال آن‌ها در آب شد. به نظر می‌رسد که خواص بی‌نظیر فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس دارچین ناشی از ایجاد اتصالات سراسری به وسیله ترکیبات موجود در اسانس دارچین در شبکه فیلم بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مویذ نتایج به دست آمده در این پژوهش بودند. نتایج نشان دادند که اسانس آویشن و دارچین از مواد ضد میکروبی مناسب برای تولید فیلم‌ها و پوشش‌هایی از جنس کیتوزان با خواص ضد میکروبی، برای بسته‌بندی مواد غذایی مختلف می‌باشند.

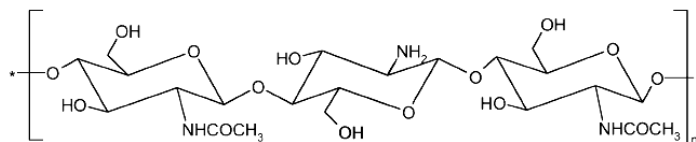
**واژه‌های کلیدی:** فیلم خوراکی، کیتوزان، آویشن، دارچین، خواص ضد میکروبی، خواص مکانیکی

\* مسئول مکاتبه: srazavi@ut.ac.ir

## مقدمه

رشد میکروبی بر روی سطح از عوامل عمده فساد مواد غذایی می‌باشد. امروزه پیشرفت‌های زیادی در مواد پلیمری مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی روی داده است. برخی از این فیلم‌ها حاوی مواد ضد میکروبی بوده و بنابراین عمر نگهداری مواد غذایی را افزایش می‌دهند (سیراگوسا و دیکسون، ۱۹۹۲). این گونه فیلم‌ها به محض تماس با سطح ماده غذایی از رشد میکروبی جلوگیری می‌کنند. در بین مواد مختلف، بیوپلیمرها (پلیمرهای زیستی) از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند.

کیتوزان یک نوع چندقندی است که از واحدهای گلوکز آمین و ان-استیل گلوکز آمین (با اتصالات بتا ۱ و ۴) تشکیل شده است. کیتوزان از استیل‌زدایی کیتین، یکی از فراوان‌ترین پلیمرهای طبیعی، به دست می‌آید (کما و همکاران، ۲۰۰۲). ساختار کیتوزان در شکل ۱ نشان داده شده است. ثابت شده است که کیتوزان یک ماده غیرسمی، زیست تجزیه پذیر، زیست سازگار<sup>۲</sup> و نیز دارای خواص ضد میکروبی است (وانگ، ۱۹۹۲؛ کما و همکاران، ۲۰۰۲). خاصیت ضد میکروبی کیتوزان ناشی از گروه‌های آمینی با بار مثبت است. این گروه‌ها با غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها که دارای بار منفی است واکنش می‌دهند. این واکنش منجر به نشت اجزاء پروتئینی و سایر اجزاء درون سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌شود (شهیدی و همکاران، ۱۹۹۹).



شکل ۱- ساختار کیتوزان.

کاربرد مواد نگهدارنده شیمیایی دارای عوارض جانبی زیادی است؛ بنابراین امروزه گرایش زیادی به استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی وجود دارد. یکی از انواع این نگهدارنده‌ها، ادویه‌جات و عصاره‌های آن‌ها می‌باشند. اسانس‌ها و ترکیبات آن‌ها دارای طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی می‌باشند (پاکاسوتی و کیل، ۲۰۰۲؛ کیم و همکاران، ۱۹۹۵). ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی

1- Biodegradable

2- Biocompatible

اسانس‌ها نقش مهمی در تعیین فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بازی می‌کنند و به‌طور عمده ترکیبات با گروه‌های فنلی مؤثرترند (درمن و دینز، ۲۰۰۰). در بین اسانس‌های مختلف اسانس پونه‌کوهی، میخک، آویشن، دارچین و مریم‌گلی دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی می‌باشند (سیدیم و ساریکوس، ۲۰۰۶؛ هالی و پاتل، ۲۰۰۵؛ برت، ۲۰۰۴). به‌دلیل اثرات نامطلوب افزودن مستقیم اسانس بر ویژگی‌های حسی ماده غذایی، افزودن آن به فیلم‌های خوراکی می‌تواند جایگزین مناسبی برای بسته‌بندی مواد غذایی باشد. ردریگوئز و همکاران (۲۰۰۰) فیلم‌های خوراکی ضد میکروبی را به‌وسیله افزودن لیزوزیم، نیسین و EDTA به فیلم‌های تولیدشده از ایزوله پروتئین آب پنیر تولید نموده و خواص آن را مورد بررسی قرار دادند. فیلم‌های حاوی نیسین و لیزوزیم در بازداری از *Brochothrix thermosphacta* مؤثر بودند اما در جلوگیری از رشد *L. monocytogenes* تأثیری نداشتند. افزودن EDTA به فیلم‌های تولیدشده خواص بازدارندگی را در مقابل *L. monocytogenes* بهبود داد. چا و همکاران (۲۰۰۲) ترکیبات ضد میکروبی مختلفی شامل لیزوزیم، نیسین، عصاره دانه گریپ‌فروت و EDTA را به درون فیلم‌های آلژینات سدیم و کاپا کاراگینان اضافه نمودند. در هر دو نوع فیلم ترکیب عصاره دانه گریپ‌فروت و EDTA بالاترین خاصیت ضد میکروبی را از خود نشان داد. فیلم‌های آلژینات سدیم در مقایسه با روکش‌های کاپا کاراگینان در سطوح غلظت یکسان از مواد ضد میکروبی، نواحی بازدارندگی بزرگ‌تری را نمایان کردند. این پدیده به این علت بود که فیلم‌های آلژینات سدیم در حالت کلی بسیار آب‌دوست بودند؛ بنابراین آب را به سرعت جذب می‌کردند و متورم می‌شدند. بنابراین مواد ضد میکروبی موجود در فیلم‌های آلژینات سدیم سریع‌تر از روکش‌های کاپا کاراگینان مهاجرت می‌کردند. نواحی بازدارندگی حاصل از افزودن لیزوزیم شفافیت زیادی نداشت زیرا لیزوزیم بیشتر باکتریواستاتیک می‌باشد. فیلم‌های کاپا کاراگینان خواص مکانیکی قدرتمندی را نشان دادند. این خواص قابل مقایسه با مقاومت کششی فیلم‌های پلی‌اتیلن بودند. به‌طور کلی با افزودن مواد ضد میکروبی به درون فیلم‌ها مقاومت کششی و نیز میزان افزایش طول در لحظه پاره شدن کاهش یافت. علت این امر شکسته شدن شبکه روکش در نتیجه افزودن مواد ضد میکروبی بود. ماده کلاته‌کننده به‌کار رفته در این پژوهش (EDTA) توانست نفوذپذیری غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی را تغییر داده و آن‌ها را به ترکیبات ضد میکروبی حساس‌تر نماید. پرانوتو و همکاران (۲۰۰۴) روغن سیر را به درون فیلم‌های خوراکی آلژینات سدیم اضافه نمودند و تأثیر ضد میکروبی این فیلم‌ها را بر روی ۴ گونه باکتری بیماری‌زا در مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که روغن سیر بر روی ۴ گونه باکتری بیماری‌زا

دارای اثر ضد میکروبی است. افزودن روغن سیر به درون روکش‌های آلژیناتی در مقادیر بیشتر از ۰/۲ درصد دارای اثر ضد میکروبی قدرتمندی بود. در این سطح غلظت تأثیر معنی‌داری بر روی خواص فیزیکی و مکانیکی روکش‌های تولیدشده مشاهده نگردید. اثر معنی‌دار در سطوح دیگری از غلظت مشاهده شد. به‌عنوان مثال مقاومت کششی و میزان افزایش طول در لحظه پاره شدن به ترتیب با افزودن ۰/۳ درصد و ۰/۴ درصد روغن سیر به‌طور معنی‌داری تغییر یافت. نفوذپذیری در مقابل بخار آب نیز با افزودن ۰/۴ درصد روغن سیر کاهش پیدا کرد. نتایج این پژوهش نشان داد که روغن سیر دارای پتانسیل بالایی برای استفاده در تولید روکش‌های خوراکی آلژینات سدیم با خاصیت ضد میکروبی می‌باشد. پرانتو و همکاران (۲۰۰۵) روغن سیر، سوربات پتاسیم و نیسین را به درون فیلم‌های کیتوزان اضافه نمودند و سپس خواص ضد میکروبی فیلم‌ها و نیز خواص فیزیکی و مکانیکی آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. این محققان از طیف‌های به‌دست آمده از آنالیز FTIR برای تعیین برهم‌کنش‌های احتمالی بین گروه‌های عاملی کیتوزان و مواد ضد میکروبی استفاده نمودند. مقاومت کششی فیلم‌ها در اثر افزودن سوربات پتاسیم و نیسین نسبت به افزودن روغن سیر با شدت بیشتری کاهش یافت. همچنین سوربات پتاسیم و نیسین نفوذپذیری فیلم‌ها را در برابر بخار آب افزایش دادند. روغن سیر اثر معنی‌داری بر روی نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب نداشت. در این پژوهش روغن سیر اثری بر روی باکتری‌های گرم منفی نداشت. در میان باکتری‌های گرم مثبت *L. monocytogenes* بیش‌ترین حساسیت را به روغن سیر داشت و پس از آن *S. aureus* و *B. cereus* بالاترین حساسیت را به روغن سیر داشتند. در این پژوهش از روی طیف‌های به‌دست آمده با آنالیز FTIR مشخص گردید که به هنگام افزودن روغن سیر به فیلم‌های کیتوزان تغییری در گروه‌های کاری کیتوزان روی نداده است و بنابراین خواص فیزیکی و مکانیکی تغییر چندانی نمی‌کند. سوربات پتاسیم، گروه‌های کاری کیتوزان را تغییر داد و بنابراین خواص فیزیکی و مکانیکی روکش‌های تولیدشده تغییر کرد. نیسین تقریباً شبیه به روغن سیر بود و بنابراین خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها حاوی نیسین به‌میزان کمی تغییر کرد و اثرات بازدارندگی به‌واسطه در دسترس بودن نیسین فعال آزاد روی داد. سیدیم و ساریکوس (۲۰۰۶) اسانس‌های ارگانو، رزماری و روغن سیر را در چهار سطح غلظت (۴-۱ درصد) درون فیلم‌های تولیدشده از پروتئین آب پنیر اضافه نمودند. در این پژوهش فیلم‌های تولیدشده از پروتئین آب پنیر که حاوی روغن ارگانو بودند؛ بالاترین خاصیت ضد میکروبی را نشان دادند و روغن ارگانو در سطح غلظت بالاتر از ۲ درصد توانست در مقابل تمامی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر بازدارندگی

نشان دهد. فیلم‌های حاوی روغن سیر نیز خواص ضد میکروبی از خود نشان دادند. فیلم‌های حاوی روغن رزماری در این پژوهش هیچ نوع خاصیت ضد میکروبی نشان ندادند. در این پژوهش لاکتوباسیل‌ها بالاترین مقاومت را از خود نشان داده و پس از آن‌ها گروه باکتری‌های گرم منفی بالاترین مقاومت را داشتند.

اهداف کلی این پژوهش بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های خوراکی تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس‌های آویشن و دارچین بود. همچنین اثرات افزودن اسانس بر ویژگی‌های یاد شده، از جنبه ریز ساختاری فیلم‌ها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده و روش نگهداری آن‌ها: باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، *Salmonella* PTCC1431، *Staphylococcus aureus* PTCC1298، *Listeria monocytogenes* PTCC1298 و *Pseudomonas aeruginosa* *enteritidis* بودند. دو باکتری اول از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و دو باکتری دیگر از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند. باکتری‌ها روی محیط نوترینت آگار شیب‌دار (مرک آلمان) کشت داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور حفظ قابلیت زیستی باکتری‌ها، هر ۲۰ روز کشت مجدد آن‌ها صورت گرفت. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* هر ۱۰ روز کشت مجدد داده شد. هنگام تهیه کشت مایع از باکتری‌ها یک لوپ پر از هر نمونه باکتری برداشته شده و در شرایط کاملاً سترون در ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع Brain Heart Infusion (مرک آلمان) کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰-۱۴۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت در یک دستگاه گرم‌خانه شیکردار (استوارت انگلیس) گرم‌خانه‌گذاری شد. در نهایت عمل رقیق کردن کشت‌ها با استفاده از آب مقطر استریل تا رسیدن به جمعیت میکروبی مورد نیاز برای کشت سطحی صورت گرفت. هنگام کشت سطحی جمعیت میکروبی  $10^6-10^0$  cfu/ml بود.

تهیه فیلم‌های خوراکی محتوی اسانس‌ها: کیتوزان تولید شده از پوسته کیتینی خرچنگ (درجه استیل زدایی ۸۰ درصد، سیگما 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، ۵ تا ۶ ساعت بود. از یک همزن مغناطیسی برای انحلال کیتوزان استفاده شد. محلول کیتوزان حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ تحت خلاء صاف شد تا ناخالصی‌ها و مواد

نامحلول موجود در آن حذف شوند. سپس گلیسرول (سیگما آمریکا) به میزان ۰/۷۵ میلی لیتر بر گرم کیتوزان به محلول اضافه شد. از گلیسرول به عنوان ماده بهبوددهنده برای شکل گیری و جلوگیری از شکنندگی فیلم‌ها استفاده گردید. مدت زمان لازم برای انحلال و توزیع یکنواخت گلیسرول ۳۰ دقیقه بود. اسانس‌های آویشن و دارچین تهیه شده از شرکت گیاه اسانس (گرگان) در سه سطح غلظتی ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد به محلول کیتوزان اضافه شده و با استفاده از یک مخلوط‌کن در دور ۷۰۰۰rpm به مدت ۱/۵ دقیقه به طور یکنواخت درون محلول توزیع گردیدند. محلول‌های تشکیل دهنده فیلم تحت خلاء در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد هواگیری شدند. سپس ۴۰ میلی لیتر از این محلول‌ها توسط پی‌پت در مرکز پلیت‌های شیشه‌ای به قطر ۱۴/۵ سانتی‌متر به آرامی ریخته شد. سپس پلیت‌ها در یک سطح کاملاً تراز قرار داده شدند تا نمونه‌ها خشک شده و فیلم‌ها تشکیل شوند. مدت زمان لازم برای خشک شدن نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۶ ساعت بود. فیلم‌های خشک شده به آرامی از پلیت‌ها جدا شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد تا رسیدن به تعادل رطوبتی (وزن ثابت) و انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. برای تأمین رطوبت ۵۰ درصد از دسیکاتورهای حاوی محلول اشباع نیترات منیزیم (مرک آلمان) استفاده گردید. نمونه‌های کنترل فاقد اسانس نیز تهیه شده و در همان شرایط نگهداری شدند.

**بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی:** برای تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی از روش نفوذ ماده ضد میکروبی در محیط آگاردار<sup>۱</sup> استفاده شد. فیلم‌های تولید شده با استفاده از یک قالب به دیسک‌هایی به قطر ۱۰ میلی‌متر تبدیل شدند. قبل از قرار دادن دیسک‌ها روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از ۰/۱ میلی لیتر کشت مایع هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش ( $10^6-10^0$  cfu/ml) صورت گرفت. دیسک‌ها در شرایط استریل روی محیط Brain Heart Infusion Agar قرار داده شدند. پلیت‌ها سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اختلاف مساحت هاله‌های تشکیل شده از مساحت دیسک‌ها به عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی در نظر گرفته شد (سیدیم و ساریکوس، ۲۰۰۶). در مواردی که هاله‌ای تشکیل نشده بود یعنی فعالیت ضد میکروبی وجود نداشت، اختلاف مساحت برابر صفر در نظر گرفته شد. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری‌ها بر سطح پلیت برای هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش یک پلیت کشت داده شده فاقد

#### 1- Agar Diffusion Method

فیلم، در نظر گرفته شد. همچنین از یک پلیت فاقد باکتری برای اطمینان از عدم آلودگی محیط‌های کشت استفاده گردید.

#### اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم‌ها

**اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها:** ضخامت فیلم‌های تولیدشده با استفاده از یک میکرومتر با دقت  $0/01$  میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها برای آزمایش‌های مکانیکی ضروری بود. برای حصول اطمینان از صحت مقادیر اندازه‌گیری شده، ضخامت نمونه‌ها هم‌زمان با تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی مجدداً اندازه‌گیری شد.

**اندازه‌گیری میزان رطوبت فیلم‌ها:** پس از آن‌که فیلم‌ها به تعادل رطوبتی رسیدند، تکه‌های فیلم وزن شده و درون کپسولی که قبلاً به وزن ثابت رسیده بود قرار داده شدند. سپس در آن با دمای  $110$  درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت حرارت داده شدند. سپس از روی میزان کاهش وزن نمونه‌ها نسبت به نمونه اولیه، درصد رطوبت تعیین شد. در این آزمایش تبخیر گلیسرول و اسانس‌ها از درون فیلم ناچیز در نظر گرفته شدند.

**اندازه‌گیری نرخ عبور بخار آب<sup>۱</sup> از درون فیلم‌ها:** برای انجام این آزمایش از روش شماره E96 مصوب ASTM (۱۹۹۵) استفاده گردید. به این منظور مقداری کلرید کلسیم بدون آب درون ظرف‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری<sup>۲</sup> ریخته شد. سپس سطح ظرف‌ها به وسیله فیلم و با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شد (شکل ۲). به این ترتیب به علت جاذب الرطوبه بودن کلرید کلسیم بدون آب، رطوبت نسبی درون سلول‌ها  $0$  درصد شد. سپس سلول‌ها به درون دسیکاتور حاوی آب نمک اشباع منتقل شدند. آب نمک اشباع در دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد رطوبت  $75$  درصد ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد منجر به شیب فشار بخاری معادل  $1753/55$  پاسکال گردید. تغییرات وزن سلول‌ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت  $0/0001$  گرم اندازه‌گیری شد. در تمام نمونه‌ها با رسم منحنی تغییرات وزن نسبت به زمان، یک خط راست برحسب (گرم بر ثانیه . متر<sup>۲</sup>) و ضریب تعیین‌کنندگی ( $R^2 > 0/99$ ) حاصل شد. نرخ عبور بخار آب معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول‌ها ( $0/0287$  مترمربع) بود. برای هر نمونه فیلم، یک سلول اندازه‌گیری نفوذپذیری فاقد

1- Water Vapor Transmission Rate (WVTR)

2- Diffusion Cell

کلرید کلسیم، که توسط فیلم پوشانده شده بود به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به این ترتیب رطوبتی که جذب فیلم شده و از درون آن عبور نکرده بود، اندازه گیری شد.



شکل ۲- سلول اندازه گیری نرخ عبور بخار آب از درون فیلم‌ها.

اندازه گیری حلالیت فیلم‌ها در آب: پس از تعیین میزان رطوبت موجود در هر فیلم میزان مواد جامد موجود در آن قابل تعیین بود. با توجه به این مسأله، تکه‌های فیلم را پس از توزین، درون ۵۰ سی‌سی آب مقطر انداخته و به مدت ۶ ساعت عمل هم‌زدن آرام در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس مخلوط فیلم و آب بر روی یک کاغذ صافی که قبلاً به وزن ثابت رسیده و دقیقاً توزین شده بود صاف شد. کاغذ صافی به همراه نمونه تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درصد حلالیت فیلم‌ها در آب از رابطه (۱) محاسبه گردید.

$$(1) \quad \text{درصد حلالیت} = \frac{\text{وزن روکش خشک پس از غوطه‌وری} - \text{وزن ماده خشک اولیه موجود در روکش}}{\text{وزن ماده خشک اولیه موجود در روکش}} \times 100$$

اندازه گیری رنگ سطحی فیلم‌ها: برای اندازه گیری رنگ سطحی، فیلم‌ها بر روی یک پلیت سفید (مرجع) قرار گرفته و سپس میزان رنگ آن‌ها با استفاده از دستگاه رنگ‌سنج (Minolta CR 300 ژاپن) اندازه گیری شد. برای محاسبه اختلاف رنگ نمونه‌ها با پلیت سفید با استفاده از داده‌های به دست



آمده شامل سه فاکتور  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  (مربوط به مرجع) و نیز سه فاکتور  $L$ ،  $a$  و  $b$  (مربوط به هر نمونه)، از رابطه (۲) استفاده شد.

$$(۲) \quad \text{اختلاف رنگ فیلم‌ها} = (L^* - L)^2 + (a^* - a)^2 + (b^* - b)^2$$

**اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها:** آزمایش‌های کشش با استفاده از دستگاه Testometric (مدل M350-10CT انگلستان) و با استفاده از روش شماره D882-91 مصوب ASTM (۱۹۹۶) انجام گرفت. فیلم‌ها به شکل مستطیلی به ابعاد  $9 \times 1$  سانتی‌متر مربع بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵ سانتی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۳۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. براساس روش استاندارد و نیز به علت ضخامت کم نمونه‌ها و کوچک بودن فک دستگاه، نیازی به استفاده از نمونه‌های دمبلی شکل نبود. فاکتورهایی شامل حداکثر نیرو و درصد افزایش طول در نقطه پاره شدن<sup>۱</sup> (تغییر طول نمونه تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰) از روی منحنی‌های نیرو-تغییر شکل حاصل شدند. مقاومت کششی فیلم‌ها<sup>۲</sup> نیز از رابطه (۳) محاسبه شد:

$$(۳) \quad \text{ضخامت فیلم} \times \text{عرض فیلم} / \text{حداکثر نیرو} = \text{مقاومت کششی فیلم‌ها}$$

**بررسی ریزساختار فیلم‌های تولیدشده:** برای تهیه تصاویر میکروسکوپی از سطح فیلم‌ها آن‌ها به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. در آماده‌سازی نمونه‌ها برای تصویربرداری از مقطع عرضی، ابتدا نمونه‌ها را در ازت مایع شکسته و سپس از سمت مقابل قسمت شکسته شده به کمک چسب نقره بر روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. پایه‌ها در یک دستگاه پوشش‌دهنده/پاشنده تا نقطه بحرانی خشک شده و به مدت ۵ دقیقه با طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها به وسیله یک میکروسکوپ الکترونی روبشی با کاربری ۲۰ کیلووات و در بزرگ‌نمایی‌های مختلفی انجام گرفت.

**تجزیه و تحلیل آماری:** برای انجام آزمایش‌های میکروبی در هر سطح غلظت اسانس، آزمایش ۳ بار انجام شد و در هر بار آزمایش ۳ دیسک بر روی سطح محیط کشت قرار داده شد. آزمایش‌های میکروبی به صورت فاکتوریل  $2 \times 4 \times 5$  در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تکرار انجام گرفت. در این پژوهش در آزمایش‌های میکروبی اثر سه فاکتور نوع اسانس در ۲ سطح و غلظت اسانس در ۴ سطح (شامل کنترل) و تعداد باکتری‌ها در ۴ سطح بررسی شدند. سایر آزمایش‌ها نیز به صورت فاکتوریل  $2 \times 4$  در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفتند. اثر عوامل مورد بررسی با استفاده از تجزیه

1- Elongation at Break

2- Tensile Strength

و تحلیل واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن، با استفاده از نرم‌افزار MSTATC در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

### نتایج و بحث

خواص ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی تولید شده: در جدول ۱ اثر ضد میکروبی فیلم‌های تولید شده (اختلاف مساحت هاله شفاف ایجاد شده از مساحت دیسک) علیه باکتری‌های مورد آزمایش نشان داده شده است. زمانی که مواد ضد میکروبی به درون فیلم افزوده می‌شوند این ترکیبات به درون آگار نفوذ کرده و خواص ضد میکروبی خود را نشان می‌دهند. به علت فعالیت ضد میکروبی بیشتر آویشن در مقایسه با دارچین، فیلم‌های کیتوزان حاوی آویشن خواص ضد میکروبی بالاتری نشان دادند. افزودن اسانس آویشن در مقادیر بالاتر از ۰/۵ درصد حجمی - حجمی منجر به ایجاد نواحی شفاف بازدارندگی در اطراف فیلم‌ها شد. غلظت ۰/۵ درصد اسانس آویشن در مقابل *Pseudomonas aeruginosa* اثر بازدارندگی نشان نداد. با افزایش غلظت اسانس، مساحت ناحیه بازدارندگی به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش پیدا کرد. فعالیت ضد میکروبی آویشن ناشی از وجود دو ترکیب تیمول و کارواکرول می‌باشد. کارواکرول و تیمول غشاء خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشاء سیتوپلاسمی به ATP می‌شوند (کزنتینو و همکاران، ۱۹۹۹). خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ آن می‌شود. همان‌گونه که قبلاً اشاره شد فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس دارچین نواحی بازدارندگی کوچک‌تری را در مقایسه با فیلم‌های حاوی اسانس آویشن نشان دادند. علاوه بر اختلاف در میزان فعالیت ضد میکروبی دو اسانس، افت فعالیت ضد میکروبی در فیلم‌های حاوی اسانس دارچین در مقایسه با فیلم‌های حاوی اسانس آویشن به علت ایجاد اتصالات شیمیایی بین گروه‌های عاملی کیتوزان و اسید اگزالیک موجود در اسانس دارچین بود. این ترکیب به عنوان عامل ایجادکننده اتصال سراسری بین زنجیرهای کیتوزان عمل کرده و منجر به فشردگی شبکه فیلم شد. این شبکه فشردگی مانع از آزادسازی مواد ضد میکروبی از درون فیلم شده و اثر بازدارندگی کوچک‌تری نشان داده شد. فشردگی شبکه فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس دارچین در بخش مربوط به نتایج خواص فیزیکی و مکانیکی مورد بررسی بیشتری قرار می‌گیرد. ترکیب بازدارنده اصلی در اسانس دارچین سینام آلدئید می‌باشد. مکانیزم اثر ضد میکروبی سینام آلدئید جلوگیری از تولید آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز و نیز تخریب دیواره سلولی می‌باشد (ترسکی و همکاران، ۱۹۸۹). در مقالات مختلف (پرانوتو و همکاران، ۲۰۰۵؛ سیدیم و ساریکوس،

۲۰۰۶) غلظت‌های متفاوتی از اسانس‌ها به‌کار برده شده است که علت آن جنس گیاه، روش تهیه اسانس، غلظت ترکیبات مؤثر درون اسانس و همچنین نوع ماده تشکیل‌دهنده فیلم می‌باشند.

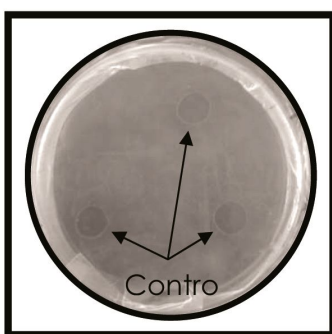
جدول ۱- خواص ضد میکروبی فیلم‌های تولید شده.

مساحت ناحیه بازدارندگی (میلی متر مربع)		غلظت اسانس در محلول تشکیل‌دهنده فیلم	نوع باکتری
اسانس آویشن	اسانس دارچین		
<sup>d</sup> A	<sup>d</sup> A	کنترل	<i>L. monocytogenes</i>
<sup>c</sup> B	<sup>c</sup> A	۰/۵ درصد	(Gram +)
<sup>b</sup> B	<sup>b</sup> A	۱ درصد	
<sup>a</sup> B	<sup>a</sup> A	۱/۵ درصد	
<sup>d</sup> A	<sup>d</sup> A	کنترل	<i>S. aureus</i>
<sup>c</sup> B	<sup>c</sup> A	۰/۵ درصد	(Gram +)
<sup>b</sup> B	<sup>b</sup> A	۱ درصد	
<sup>a</sup> B	<sup>a</sup> A	۱/۵ درصد	
<sup>c</sup> A	<sup>d</sup> A	کنترل	<i>S. enteritidis</i>
<sup>c</sup> B	<sup>c</sup> A	۰/۵ درصد	(Gram +)
<sup>b</sup> B	<sup>b</sup> A	۱ درصد	
<sup>a</sup> B	<sup>a</sup> A	۱/۵ درصد	
<sup>a</sup> A	<sup>c</sup> A	کنترل	<i>P. aeruginosa</i>
<sup>a</sup> A	<sup>c</sup> A	۰/۵ درصد	(Gram -)
<sup>a</sup> B	<sup>b</sup> A	۱ درصد	
<sup>a</sup> B	<sup>a</sup> A	۱/۵ درصد	

- میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف کوچک یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0.05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

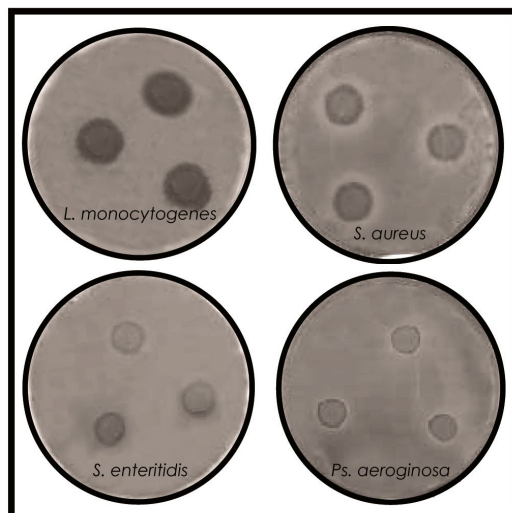
- میانگین‌هایی که در مورد یک باکتری در دو ستون کنار یکدیگر، با حروف بزرگ یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0.05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

اسانس‌ها به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در برابر باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی بودند. علت این پدیده تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است؛ اما دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با وجود ضخامت کم‌تر، پیچیدگی بیشتری داشته و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی‌ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد. همچنین دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای غشاء خارجی<sup>۱</sup> است که سطح خارجی دیواره را می‌پوشاند. مجموعه این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌شود (پرانوتو و همکاران، ۲۰۰۵؛ بلک، ۱۹۹۶). با افزایش غلظت هر کدام از اسانس‌ها، اثر بازدارندگی به‌طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش یافت. همان‌گونه که از جدول ۱ مشخص است در بین باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش *L. monocytogenes* ضعیف‌ترین و *P. aeruginosa* مقاوم‌ترین میکروارگانیزم در برابر اسانس‌ها بودند. نتایج مشابهی به‌وسیله سایر محققان به‌دست آمده است (پینتوره و همکاران، ۲۰۰۲؛ ویلکینسون و همکاران، ۲۰۰۵). همان‌گونه که ذکر شد کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی است. با وجودی که در زیر سطح فیلم‌ها هیچ رشدی مشاهده نگردید، اما فیلم‌های کنترل (فاقد اسانس) هاله‌ای نشان ندادند (شکل ۳). علت این پدیده آن است که ماهیت ضد میکروبی کیتوزان یک ویژگی ذاتی (دارماچی و ایزومیموتو، ۱۹۹۴) است، که به‌علت وجود گروه‌های آمینی با بار مثبت می‌باشد. بنابراین اثر ضد میکروبی بدون مهاجرت ماده فعال رخ داده و تنها از رشد باکتری‌هایی که در تماس مستقیم با سطح فیلم بودند، جلوگیری گردید. شکل ۴ نشان‌دهنده اثر بازدارندگی فیلم‌های خوراکی حاوی ۱/۵ درصد اسانس آویشن در مقابل باکتری‌های مورد آزمایش می‌باشد.



شکل ۳- اثر بازدارندگی فیلم‌های کنترل کیتوزان.

1- Outer Membrane



شکل ۴- اثر بازدارندگی فیلم‌های خوراکی حاوی ۱/۵ درصد اسانس آویشن.

**خواص فیزیکی فیلم‌های تولیدشده:** تأثیر افزودن اسانس آویشن و دارچین بر خواص فیزیکی فیلم‌های خوراکی کیتوزان در جدول ۲ ارایه شده است. فیلم‌های به‌دست آمده ضخامت کمی داشته و به آسانی از سطح پلیت‌ها جدا شدند. ضخامت فیلم‌ها بین ۰/۰۶۰ تا ۰/۰۷۷ میلی‌متر متغیر بود. با افزودن اسانس آویشن محتوای رطوبت فیلم‌ها به‌علت تخریب شبکه فیلم افزایش یافت. این تخریب منجر به افزایش تعداد مولکول‌های آبی شد که به‌وسیله اتصالات هیدروژنی بین زنجیرهای پلیمری حضور داشتند. افزودن اسانس آویشن در سطح غلظتی ۰/۵ درصد میزان رطوبت فیلم‌ها را از ۱۷/۸۰ درصد به ۲۶/۶۱ درصد افزایش داد. افزودن اسانس آویشن در سطح غلظتی ۱/۵ درصد در فرمولاسیون محلول تشکیل‌دهنده فیلم منجر به کاهش محتوای رطوبت فیلم شد که به‌علت افزایش آب‌گریزی آن بود. میزان رطوبت فیلم‌های محتوی اسانس دارچین به‌صورت معنی‌داری ( $P < ۰/۰۵$ ) کم‌تر از فیلم‌های محتوی اسانس آویشن بود. این پدیده به‌علت تشکیل اتصالات کووالانسی بین زنجیرهای کیتوزان بود. ایجاد این اتصالات منجر به کاهش گروه‌های هیدروکسیل و آمین آزاد موجود در شبکه فیلم شده و بنابراین میزان اتصالات هیدروژنی موجود بین مولکول‌های آب و گروه‌های عاملی زنجیرهای پلیمری را کاهش داد و کاهش اتصالات هیدروژنی منجر به کاهش میزان رطوبت فیلم‌های حاوی اسانس دارچین شد. با افزایش غلظت اسانس دارچین محتوای رطوبت به‌طور معنی‌داری ( $P < ۰/۰۵$ ) کاهش یافت.

جدول ۲- خواص فیزیکی فیلم‌های خوراکی تولیدشده.

اسانس دارچین	اسانس آویشن	غلظت اسانس در محلول تشکیل دهنده فیلم	خواص فیزیکی
۰/۰۶۰ <sup>c</sup> A	۰/۰۶۰ <sup>c</sup> A	کنترل	ضخامت (میلی متر)
۰/۰۶۲ <sup>c</sup> A	۰/۰۶۲ <sup>c</sup> A	۰/۵ درصد	
۰/۰۶۹ <sup>b</sup> A	۰/۰۶۶ <sup>b</sup> B	۱ درصد	
۰/۰۷۷ <sup>a</sup> A	۰/۰۷۳ <sup>a</sup> B	۱/۵ درصد	
۱۷/۸۰ <sup>a</sup> A	۱۷/۸۰ <sup>c</sup> A	کنترل	میزان رطوبت (درصد)
۱۵/۳۹ <sup>b</sup> B	۲۶/۶۱ <sup>a</sup> A	۰/۵ درصد	
۱۲/۸۳ <sup>c</sup> B	۲۷/۴۲ <sup>a</sup> A	۱ درصد	
۹/۳۶ <sup>d</sup> B	۲۳/۳۳ <sup>b</sup> A	۱/۵ درصد	
۲/۳۳ <sup>c</sup> A	۲/۳۳ <sup>d</sup> A	کنترل	نرخ عبور بخار آب ( $10^{-3} \times \text{گرم}^{-1} \text{ثانیه}^{-2} \text{متر}$ )
۳/۴۰ <sup>a</sup> B	۵/۷۱ <sup>a</sup> A	۰/۵ درصد	
۲/۷۶ <sup>b</sup> B	۵/۴۶ <sup>b</sup> A	۱ درصد	
۲/۴۲ <sup>c</sup> B	۵/۰۸ <sup>c</sup> A	۱/۵ درصد	
۲۵/۹۷ <sup>a</sup> A	۲۵/۹۷ <sup>c</sup> A	کنترل	میزان حلالیت (درصد)
۲۵/۱۶ <sup>a</sup> B	۳۰/۹۳ <sup>a</sup> A	۰/۵ درصد	
۱۸/۴۷ <sup>b</sup> B	۳۰/۶۲ <sup>a</sup> A	۱ درصد	
۱۴/۲۱ <sup>c</sup> B	۲۸/۳۷ <sup>b</sup> A	۱/۵ درصد	
۱۵/۲۱ <sup>d</sup> A	۱۵/۲۱ <sup>c</sup> A	کنترل	اختلاف رنگ کلی ( $\Delta E$ )
۲۸/۴۴ <sup>c</sup> A	۱۵/۰۲ <sup>c</sup> B	۰/۵ درصد	
۳۲/۷۲ <sup>b</sup> A	۱۷/۳۹ <sup>b</sup> B	۱ درصد	
۳۸/۰۵ <sup>a</sup> A	۱۹/۴۰ <sup>a</sup> B	۱/۵ درصد	

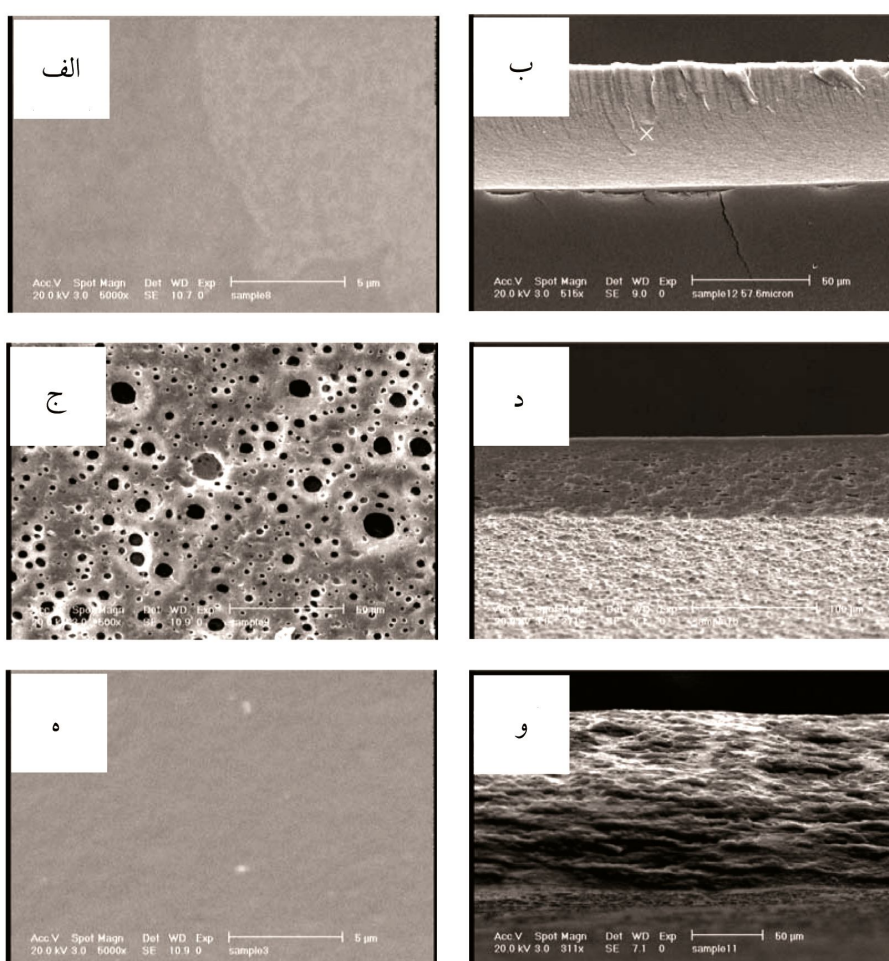
- میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف کوچک یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0.05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

- میانگین‌هایی که در دو ستون کنار یکدیگر، با حروف بزرگ یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0.05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

فیلم‌های کنترل کتیوزان فشرده بوده و سطحی صاف، بدون حفره یا ترک داشتند (شکل ۵- الف و ۵- ب). نرخ عبور بخار آب در فیلم‌های کنترل کتیوزان ۲/۳۳ (گرم بر ثانیه . متر<sup>۲</sup>) بود. نتایج مشابهی به وسیله محققان دیگر به دست آمده است (گارسیا و همکاران، ۲۰۰۴؛ کانر و همکاران، ۱۹۹۸؛ ونگ و همکاران، ۱۹۹۲). با وجودی که ماهیت آب‌گریز اسانس‌ها می‌توانست ویژگی‌های آب‌دوستی- آب‌گریزی فیلم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد؛ اما فاکتورهای فیزیکی اثر عمده‌ای بر روی نرخ عبور بخار آب از درون فیلم‌ها داشتند. همان‌گونه که در شکل ۵- ج و ۵- د نشان داده شده است، فیلم‌های محتوی اسانس آویشن دارای ساختاری باز و اسفنجی شکل بودند. سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها پوشیده از حفرات زیادی بود. به نظر می‌رسد که ساختار اسفنجی شکل ایجاد شده در این فیلم‌ها ناشی از برهم خوردن ساختار منظم زنجیرهای پلیمری ناشی از ترکیبات موجود در اسانس آویشن بود. این پدیده نرخ عبور بخار آب از میان فیلم‌های خوراکی را به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش داد، اگرچه با افزایش غلظت اسانس آویشن تا سطح غلظت ۱/۵ درصد، به علت افزایش آب‌گریزی فیلم‌ها نرخ عبور بخار آب کاهش یافت. فیلم‌های خوراکی حاوی اسانس دارچین، دارای یک ساختار صفحه‌مانند و متراکم بودند (شکل ۵- ه). همچنین مقطع عرضی این فیلم‌ها نشان داد که، این صفحات به صورت لایه‌هایی مجزا روی یکدیگر قرار گرفته‌اند (شکل ۵- و). اسانس دارچین به طور یکنواخت به درون فیلم‌های کتیوزان افزوده شده بود. اگرچه افزودن اسانس دارچین نیز تا حدودی نرخ عبور بخار آب را افزایش داد اما این افزایش در مقایسه با افزودن اسانس آویشن به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کمتر بود. آن‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، در مقایسه با نمونه کنترل، افزودن اسانس دارچین در سطح غلظتی ۱/۵ درصد، اثر معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بر روی نرخ عبور بخار آب از درون فیلم نداشت.

فیلم‌های کنترل کتیوزان حلالیت کمی (کمتر از ۲۶ درصد پس از ۶ ساعت غوطه‌وری) در آب داشتند. نتایج مشابهی به وسیله گارسیا و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است. با وجود ماهیت آب‌گریز اسانس آویشن، افزودن این اسانس به فیلم‌های خوراکی حلالیت فیلم‌ها را به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش داد که به علت تخریب شبکه فیلم بود. این پدیده موجب تسریع نفوذ آب به درون فیلم طی غوطه‌وری و افزایش حلالیت فیلم شد. افزودن اسانس دارچین در سطح غلظتی ۱ درصد و ۱/۵ درصد در مقایسه با فیلم کنترل به ترتیب منجر به کاهش حلالیت فیلم‌ها در آب به میزان ۲۵ درصد و ۴۵ درصد شد. این پدیده ناشی از ایجاد اتصالات سراسری توسط اسانس دارچین و ایجاد گروه‌های

آمیدی یا استری بود. ایجاد اتصالات سراسری در فیلم کیتوزان، منجر به کاهش گرایش پلیمر به آب شده و فیلمی با حلالیت کمتر در آب تولید نمود. این نوع فیلم برای پوشش مواد غذایی که سطحی مرطوب دارند (مانند ماهی) می‌تواند بسیار مفید باشد. ایجاد اتصالات سراسری به وسیله اسید سیتریک (اسید پلی‌کربوکسیلیک) در پلیمر ترکیبی کیتوزان- هیدروکسی پروپیل متیل سلولز توسط مولر و همکاران (۲۰۰۴) بررسی شده است.



شکل ۵- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌های تولید شده (الف) و (ب) فیلم کنترل، (ج) و (د) فیلم حاوی ۱ درصد اسانس آویشن، (ه) و (ز) فیلم حاوی ۱ درصد اسانس دارچین.



فیلم‌های کنترل کیتوزان از نظر ظاهری به رنگ زرد کم‌رنگ بودند. شفافیت فیلم‌ها با افزودن اسانس‌ها به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کاهش یافت. مقدار اختلاف رنگ کلی فیلم‌های کنترل ( $\Delta E$ ) برابر ۱۵/۲۱ بود. نتایج مشابهی به‌وسیله سایر محققان به‌دست آمده است (پرانوتو و همکاران، ۲۰۰۵؛ گارسیا و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش اسانس دارچین در مقایسه با آویشن مقدار  $\Delta E$  را به‌میزان بیش‌تری افزایش داد. اگرچه شدت رنگ زرد در فیلم‌های تولیدشده در این پژوهش نسبتاً بالا بود اما تغییرات رنگ طی نگهداری (ترزا و کروچتا، ۲۰۰۰) مانند آنچه در فیلم‌های تولیدشده از مواد پروتئینی (به‌علت واکنش میلارد) و فیلم‌های تولیدشده از مواد لیپیدی (به‌علت پدیده تند شدن) ایجاد می‌شود در فیلم‌های تولیدشده در این پژوهش روی نمی‌دهد.

**خواص مکانیکی فیلم‌های تولیدشده:** تأثیر افزودن اسانس‌ها بر روی ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌های کیتوزان در جدول ۳ ارایه شده است.

جدول ۳- خواص مکانیکی فیلم‌های خوراکی تولید شده.

اسانس دارچین	اسانس آویشن	غلظت اسانس در محلول تشکیل‌دهنده فیلم	خواص مکانیکی
۱۲/۲۰ <sup>d</sup> A	۱۲/۲۰ <sup>a</sup> A	کنترل	
۱۵/۹۳ <sup>c</sup> A	۷/۱۸۲ <sup>b</sup> B	۰/۵ درصد	مقاومت کششی فیلم (مگاپاسکال)
۱۹/۸۹ <sup>b</sup> A	۶/۸۹۷ <sup>b</sup> B	۱ درصد	
۲۱/۳۵ <sup>a</sup> A	۵/۵۵۹ <sup>c</sup> B	۱/۵ درصد	
۲۵/۳۱ <sup>a</sup> A	۲۵/۳۱ <sup>c</sup> A	کنترل	
۱۴/۳۲ <sup>b</sup> B	۳۵/۴۰ <sup>a</sup> A	۰/۵ درصد	افزایش طول فیلم در لحظه پاره شدن (درصد)
۱۰/۸۴ <sup>c</sup> B	۳۴/۶۲ <sup>a</sup> A	۱ درصد	
۶/۹۶ <sup>d</sup> B	۲۹/۸۶ <sup>b</sup> A	۱/۵ درصد	

- میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف کوچک یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

- میانگین‌هایی که در دو ستون کنار یکدیگر، با حروف بزرگ یکسان نشان‌دار شده‌اند براساس آزمون دانکن، در سطح  $P < 0/05$  با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

میزان مقاومت کششی فیلم کنترل کیتوزان برابر ۱۲/۲ مگاپاسکال بود. مقادیر مقاومت کششی فیلم‌های حاوی اسانس آویشن به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) کم‌تر از فیلم‌های کنترل بود. کاهش مقاومت کششی به علت تخریب شبکه فیلم در نتیجه افزودن اسانس آویشن بود. نتایج مشابهی به وسیله سایر محققان گزارش شده است (پرانوتو و همکاران، ۲۰۰۵؛ چا و همکاران، ۲۰۰۲). افزودن اسانس آویشن منجر به افزایش درصد افزایش طول فیلم‌ها در لحظه پاره شدن گردید. بنابراین الاستیسیته فیلم‌ها افزایش یافت که علت آن افزایش میزان رطوبت موجود در فیلم‌ها بود. تأثیر رطوبت در ادامه مورد بررسی قرار می‌گیرد. افزودن اسانس دارچین به فیلم‌های کیتوزان مقادیر مقاومت کششی را به طور معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) افزایش داد. همان‌گونه که قبلاً ذکر شد ایجاد یک برهم‌کنش قوی بین پلیمر کیتوزان و اسانس دارچین منجر به ایجاد اتصالات سراسری شده و بنابراین حجم آزاد<sup>۱</sup> و قابلیت تحرک ملکولی پلیمر را کاهش داد. این پدیده منجر به ایجاد ساختار صفحه مانند (شکل ۵-ه) شده و آرایش این صفحات به صورت لایه‌هایی بر روی یکدیگر (شکل ۵-و) سبب افزایش مقاومت کششی و کاهش درصد افزایش طول فیلم‌ها در لحظه پاره شدن گردید. از عوامل مؤثر دیگر می‌توان به میزان رطوبت موجود در فیلم‌ها اشاره کرد. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقدار رطوبت فیلم‌های حاوی اسانس دارچین در مقایسه با نمونه‌های حاوی اسانس آویشن و نمونه کنترل کمتر بود. براساس مطالعات پاپلین و همکاران (۲۰۰۴)، آب یک ماده پلاستی‌سایزر همیشگی و غیرقابل کنترل در فیلم‌های تولیدشده از هیدروکلوئیدها بوده و توانایی اصلاح ساختار پلیمرهای طبیعی را دارا می‌باشد. بنابراین مقادیر کمتر آب در فیلم‌های حاوی اسانس دارچین منجر به افزایش تنش و کاهش کرنش در این گونه فیلم‌ها گردید.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش خواص فیزیکی، مکانیکی، ضد میکروبی و ریزساختاری فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس‌های آویشن و دارچین مورد بررسی قرار گرفت. فیلم‌های حاوی اسانس آویشن نواحی بازدارندگی بزرگ‌تری را در مقایسه با فیلم‌های حاوی اسانس دارچین نشان دادند. ایجاد اتصالات گسترده بین زنجیری در فیلم‌های حاوی اسانس دارچین، منجر به تغییرات متضادی همانند فعالیت ضدباکتریایی محدودتر و نیز کاهش محتوای رطوبت، حلالیت در آب، نرخ عبور بخار آب و درصد

افزایش طول فیلم‌ها در مقایسه با نمونه‌های حاوی اسانس آویشن شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که ریزساختار فیلم‌های حاوی اسانس‌های مختلف از لحاظ وجود حفره، شکل سطحی و الگوی فشردگی متفاوت می‌باشند. پژوهش‌های بیشتری در مورد سایر اسانس‌ها و نیز کاربرد فیلم‌ها بر روی مواد غذایی مدل، مورد نیاز می‌باشند.

### منابع

- ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E 96-95. Annual book of ASTM, American Society for Testing and Material: Philadelphia, PA.
- ASTM. 1996. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual book of ASTM, American Society for Testing and Material: Philadelphia, PA.
- Black, J.G. 1996. Microbiology: principles and application. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, Pp: 80-82.
- Burt, S.A. 2004. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Caner, C., Vegano, P.J., and Wiles, J.L. 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer and storage. *Journal of Food Science*, 63: 1049-1053.
- Cha, D.S., Choi, J.H., Chinnan, M.S., and Park, H.J. 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and  $\kappa$ -carrageenan. *LWT*, 35: 715-719.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., and Deschamps, A. 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67: 3. 1162-1169.
- 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.
- Darmadji, P., and Izumimoto, M. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38: 243-254.
- 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.
- Garcia, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N., and Zaritzky, N.E. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymer*, 56: 339-345.
- Holley, R.A., and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials (Review). *Food Microbiology*, 22: 273-292.

- Kim, J., Marshall, M.R., and Wei, C. 1995. Antimicrobial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2839-2845.
- Moller, H., Grelier, S., Pardon, P., and Coma, V. 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6585-6591.
- Packiyasothy, E.V., and Kyle, S. 2002. Antimicrobial properties of some herb essential oils. *Food Australia*, 54: 4. 384-387.
- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., and Casanova, J. 2002. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from ardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 15-19.
- Pouplin, M., Redl, A., and Gontard, N. 1999. Glass transition of wheat gluten plasticized with water, glycerol, or sorbitol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 538-543.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., and Salokhe, V.M. 2004. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38: 267-272.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., and Salokhe, V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT*, 38: 859-865.
- Rodrigues, E.T., and Han, J.H. 2000. Antimicrobial whey protein films against spoilage and pathogenic bacteria. Proceedings of the IFT annual meeting; Dallas, Tex.; June 10-14, Chicago; Institute of Food Technologists, 191p.
- Seydim, A.C., and 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.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.J. 1999. Food application of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 2. 37-51.
- Siragusa, G.R., and 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.
- Thoroski, J., Blank, G., and Biliaderis, C. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 52: 6. 399-403.
- Trezza, T.A., and Krochta, J.M. 2000. Color stability of edible coatings during prolonged storage. *Journal of Food Science*, 65: 1166-1169.
- Wang, G.H. 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55: 11. 916-919.

- 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.
- Wong, D.W.S., Gastineau, F.A., Gregorski, K.S., Tillin, S.J., and Pavalth, E. 1992. Chitosan lipid films: microstructure and surface energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 540-544.



## Studies on physical, mechanical, antibacterial and microstructural properties of chitosan edible films containing thyme and cinnamon essential oils

S.M.H. Hosseini<sup>1</sup>, \* S.H. Razavi<sup>2</sup> and S.M.A. Mousavi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. Student, Dept. of Food Science and Technology, University of Tehran,

<sup>2</sup>Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, University of Tehran

<sup>3</sup>Professor, Dept. of Food Science and Technology, University of Tehran

### Abstract

Combining antimicrobial agents directly into a food packaging is a form of active packaging. In this study chitosan-based edible films containing thyme and cinnamon essential oils at 0.5%, 1%, and 1.5% v/v were prepared to examine their antibacterial, physical and mechanical properties. Scanning electron microscopy was carried out to explain structure-property relationships. Films were more effective against gram-positive bacteria than gram-negatives. Films containing thyme essential oil revealed larger inhibition zones than those of containing cinnamon essential oil against bacteria tested. Incorporating thyme essential oil into chitosan-based films increased moisture content, solubility in water, water vapor transmission rate and elongation at break of edible films. Cinnamon-enriched films had opposite changes such as increase in tensile strength and decrease in moisture content and solubility in water. It is postulated that the unique properties of the cinnamon essential oil added films could suggest the cross-linking effect of cinnamon essential oil within the chitosan matrix. Electron microscopy images confirmed the results obtained in this study. The results of this study showed that thyme and cinnamon essential oils have a good potential for using with chitosan to make antimicrobial films and coatings for various food applications.

**Keywords:** Edible film; Chitosan; Thyme; Cinnamon; Antimicrobial properties; Mechanical properties

---

\* Corresponding Author; Email: srazavi@ut.ac.ir