نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۱۲۱ تا ۱۳۴

بررسی تاثیر اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ضدباکتریایی فیلم خوراکی کیتوزان

یاسر شهبازی[1*] و میرحسن موسوی[2]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۶

[1] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی
[2] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: yasser.shahbazi@yahoo.com

چکیده

در سال‌های اخیر، تحقیقات زیادی بر روی تولید و بکارگیری پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر در بسته‌بندی مواد غذایی صورت گرفته است، که این مسئله به دلیل افزایش نگرانی در مورد استفاده بی‌رویه از بسته‌بندی‌های پلاستیکی و همچنین به دلیل افزایش علاقه مردم برای بهبود کیفیت و ظاهر محصولات غذایی می‌باشد. بنابراین، هدف از این تحقیق، مطالعه اثرات عصاره متانولی پوست انار و اسانس کاکوتی کوهی، به صورت جداگانه و ترکیبی بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ضدباکتریایی فیلم خوراکی کیتوزان بود. آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی صورت گرفت. ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی شامل ضخامت، مقاومت به کشش، ازدیاد طول تا نقطه پارگی، میزان نفوذپذیری به بخار آب و رنگ فیلم‌های مورد مطالعه بررسی گردید. خواص ضدباکتریایی فیلم‌ها علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کلی* O157:H7 با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه، بهترین ویژگی ضدباکتریایی (هاله عدم رشد بین ۶/۱-۵/۵ میلی‌متر)، بیشترین میزان مقاومت به کشش (۵۹/۶ MPa)، ضخامت (۰/۰۸۱ میلی‌متر) و ازدیاد طول تا نقطه پارگی (۴۱/۶٪)، کمترین میزان نفوذپذیری به بخار آب (۲۱/۳ g mm/kPa h m^2) و همچنین کمترین میزان شفافیت (L^*=۴۵/۴۱) در فیلم کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی + ۱٪ عصاره متانولی پوست انار مشاهده گردید. بنابریافته‌های این مطالعه، فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره پوست انار دارای ویژگی‌های ضدباکتریایی، فیزیکی و مکانیکی مطلوبی می‌باشد که می‌تواند به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی و شیمیایی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اسانس کاکوتی، کیتوزان، عصاره پوست انار، فیلم خوراکی، بسته‌بندی

مقدمه

در کارخانجات مواد غذایی از فرآیندهای شیمیایی و فیزیکی مختلفی نظیر اشعه‌دهی، فشار هیدرواستاتیک بالا، استریلیزاسیون و غیره برای حفظ کیفیت مواد غذایی استفاده می‌شود. با این وجود، استفاده از یک بسته‌بندی مناسب همواره به عنوان آخرین مرحله فرآیند نگهداری پیش از مصرف ضروری می‌باشد (ال-وکیل و همکاران ۲۰۱۵). مطالعات مختلف نشان داده

است که با استفاده از سیستم‌های بسته‌بندی فعال می‌توان بار میکروبی مواد غذایی را کاهش و متعاقباً کیفیت محصول، تازگی و مدت زمان ماندگاری آن را افزایش داد (آرانسیبیا و همکاران ۲۰۱٤، نوذری و همکاران ۲۰۱۳، اجاق و همکاران ۲۰۱۰). استفاده از بیوپلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مزایای قابل توجهی همانند تجزیه‌پذیری، امکان تولید از ضایعات و سازگاری با محیط زیست را دارند. بیوپلیمرهای متداولی که در این زمینه مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از پروتئین‌ها، لیپیدها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌استرها. این ترکیبات می‌توانند به صورت جداگانه یا در ترکیب با یکدیگر استفاده شوند (کاکایی و شهبازی ۲۰۱٦، مرادی و همکاران ۲۰۱۲).

پلی‌ساکاریدها کربوهیدرات‌های با وزن ملکولی بالا هستند. پلی‌ساکاریدهای مختلفی مانند سلولز، پکتین، مشتقات نشاسته، جلبک‌های دریایی و صمغ‌ها در تولید فیلم بکار می‌روند (دهناد و همکاران ۲۰۱٤). کیتوزان پلی‌ساکاریدی کاتیونی است که از استیل‌زدایی کیتین بدست می‌آید، این ترکیب یکی از فراوانترین پلی‌مرهای طبیعی در موجودات زنده نظیر سخت‌پوستان، حشرات و قارچ‌ها می‌باشد (کاکایی و شهبازی، ۲۰۱٦). کیتوزان محلول در آب و غیرسمی بوده و دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی وسیعی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچ‌ها می‌باشد. میزان اثر این ماده به فاکتورهای مختلفی از قبیل میزان استیل‌زدایی و پلیمریزاسیون، نوع باکتری و شرایط محیطی (pH، دما و ترکیبات مغذی ماتریکس غذایی) بستگی دارد (نوذری و همکاران، ۲۰۱۳). کاربرد کیتوزان به عنوان یک ماده نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی توسط برخی از محققین مورد بررسی قرار گرفته شده است. این پژوهشگران اثرات ضدمیکروبی این ماده را با سایر روش‌های نگهداری مواد غذایی از قبیل اسانس‌های گیاهی و روش‌های مختلف بسته‌بندی مواد غذایی بررسی نموده‌اند (نوذری و همکاران ۲۰۱۳، اجاق و همکاران ۲۰۱۰).

باتوجه به افزایش تمایل به مصرف غذاهای تازه و همچنین محصولاتی که مواد افزودنی شیمیایی کمتری دارند، کاهش فرآیندهای اعمال شده بر مواد غذایی احتمال آلودگی میکروبی را افزایش می‌دهد (شهبازی و شاویسی ۲۰۱٦). با افزودن اسانس‌های مختلف فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی در پوشش‌های خوراکی افزایش می‌یابد، بدین ترتیب می‌توان احتمال آلودگی میکروبی و همچنین فساد شیمیایی مواد غذایی را کاهش داد (ولپ و همکاران ۲۰۱۳). جنس *Ziziphora* از خانواده *Lamiaceae* با نام عمومی کاکوتی کوهی شامل ٤ گونه علفی یک ساله و چندساله به نام‌های *Z. clinopoioides*، *Z. tenuior*، *Z. persica Bunge*، *Z. capitata* L. subsp. *capitat*، *Z. capitata* L. subsp. *orientalis* است که علاوه بر ایران در ترکمنستان، افغانستان، ارمنستان، پاکستان، آسیای مرکزی، سوریه، قفقاز و غرب سیبری می‌رویند (آقاجانی و همکاران ۲۰۰۸، بکچی و همکاران ۲۰۰۷). از زمان‌های قدیم از این گیاه به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی مختلف نظیر گوشت، پنیر و سوپ استفاده شده است (اوزتورک و همکاران ۲۰۰۷، بهروان و همکاران ۲۰۰۷). در طب مردم ایران گونه*Z. clinopoioides* به عنوان آرامبخش و مقوی معده مصرف می‌شود. همچنین، در رفع اختلالات قلبی، سرماخوردگی، افسردگی، اسهال، سرفه، میگرن و تب مورد استفاده قرار می‌گیرد (بکچی و همکاران ۲۰۰۷). بنابراین به دلیل خواص متعدد دارویی، اسانس این گیاه از نظر ترکیبات تشکیل‌دهنده و اثرات دارویی توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مهمترین ترکیبات ضدمیکروبی موجود در اسانس این گیاه ترکیبات فنولی نظیر Pulegone، 1,8-Cineole و Limonene می‌باشد (اوزتورک و همکاران ۲۰۰۷، بهروان و همکاران ۲۰۰۷).

انار یکی از قدیمی‌ترین میوه‌هایی است که از قدمت زیادی در کشور برخوردار است. ایران با تولید ۶۷۰ هزار تن در سال بزرگترین تولیدکننده انار در جهان محسوب می‌شود. این گیاه دارای خواص ضدمیکروبی فراوانی بوده و از گذشته دور مصارف گوناگونی در این زمینه داشته است (بصیری و همکاران ۲۰۱۵، خان و همکاران ۲۰۱۱). از طرف دیگر قسمت‌های مختلف انار شامل برگ‌ها، ریشه، دانه و بذر آن حاوی ترکیبات موثری می‌باشند که موجب شده است انار علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گسترده‌ای نیز داشته باشد (خان و همکاران ۲۰۱۱) مطالعات مختلف نشان داده است که پیشگیری از بسیاری از بیماری‌ها نظیر عوارض قلبی و حتی سرطان‌های مختلف با مقدار جذب و مصرف میوه‌ها و سبزیجات حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی همبستگی دارد (گیوالی و ابراهیم ۲۰۱۴، لو و همکاران ۲۰۱۱). مهمترین موادی که در پوست انار دارای خواص درمانی و تغذیه‌ای هستند، عبارتند از: اسید الاژیک، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، آنتوسیانیدین‌ها، فلاونون و فلاون‌های استروژنی. ویژگی‌های کاربردی پوست انار (به عنوان ماده آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروبی و طعم‌دهنده) موجب شده است استفاده از آن در بسته‌بندی مواد غذایی به عنوان یک ماده نگهدارنده و افزودنی در مواد غذایی در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گیرد (خان و همکاران، ۲۰۱۱، ژانگ و همکاران ۲۰۱۰).

با توجه به اینکه در مورد برخی محصولات خام نمی‌توان از فرآیندهای حرارتی استفاده نمود لذا استفاده از یک بسته‌بندی مناسب می‌تواند نقش موثری در تامین ایمنی و افزایش زمان نگهداری محصولات خام دامی ایفا نماید. تاکنون مطالعات مختلفی در رابطه با تهیه فیلم‌های ضدباکتریایی خوراکی حاوی اسانس‌ها انجام شده و در حال انجام است (آرانسیبیا و همکاران ۲۰۱۴، نوذری و همکاران ۲۰۱۳، اجاق و همکاران ۲۰۱۰، کاکایی و شهبازی ۲۰۱۶، مرادی و همکاران ۲۰۱۴، دهناد و همکاران ۲۰۱۴) ولی مطالعات اندکی در رابطه با فیلم‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار در دنیا صورت گرفته است (کاکایی و شهبازی ۲۰۱۶) و نتایج این پژوهش می‌تواند بعنوان مشوقی جهت کاربرد این فیلم‌ها در صنایع غذایی باشد. بنابراین، هدف از این تحقیق، مطالعه اثرات عصاره متانولی پوست انار و اسانس کاکوتی کوهی، به صورت جداگانه و ترکیبی بر خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ضدباکتریایی فیلم خوراکی کیتوزان بود.

مواد و روش‌ها

مواد

کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (۴۵۰ کیلودالتون) و میزان استیل‌زدایی ۸۵-۷۵٪ از شرکت سیگما (انگلستان) خریداری گردید. توین ۸۰، اسیداستیک و تمامی محیط کشت‌های مورداستفاده از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردید.

تهیه اسانس کاکوتی کوهی

گیاه کاکوتی در فصل بهار از شهرستان گیلانغرب، استان کرمانشاه جمع‌آوری و خشک گردید. تأیید علمی گونه و جنس گیاه با همکاری دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی صورت گرفت. تهیه اسانس از قسمت برگ گیاه با استفاده از روش تقطیر با آب به‌وسیله دستگاه کلونجر انجام شد. به‌منظور اسانس‌گیری، مقدار گیاه مورد استفاده در هر بار اسانس‌گیری ۱۰۰ گرم بود و اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت ادامه داشت. اسانس حاصل به رنگ سبز با بوی منحصربه‌فرد گیاه کاکوتی با سدیم سولفات بدون آب آب‌گیری و از فیلترهای سرسرنگی μ۰/۴۵m عبور داده شد و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای یخچال ($4^{o}c$) نگهداری گردید (کاکایی و شهبازی ۲۰۱۶).

شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه کاکوتی کوهی

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس گیاه کاکوتی کوهی با همکاری پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران شناسایی شد. اسانس گیاه موردنظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تزریق گردید تا نوع ترکیب‌های تشکیل‌دهنده آن مشخص شود. مشخصات دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Thermo Quest Finningan) شامل: ستون موبینه به طول ۳۰m، قطر داخلی ۲۵۰μm و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵μm از نوع Hp-5MS با برنامه دمایی ۵۰°c تا ۲۶۵°c و با افزایش تدریجی ۲/۵°c در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵°c به مدت ۱۰-۲ دقیقه بود. دمای محفظه تزریق ۲۶۵°c و سرعت گاز هلیوم (به‌عنوان حامل) ۱/۲ ml در هر دقیقه بود. طیف-سنج جرمی (مدل Thermo Quest Finningan) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰°c بود.

شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات با استفاده از برنامه کتابخانه نرم افزار وایلی[1] دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی صورت پذیرفت (شهبازی و شاویسی ۲۰۱۶).

تهیه عصاره متانولی پوست انار

میوه انار (*Punica granatum* L.) در فصل پاییز خریداری شد. پوست آن جدا و در دمای ۵۰°c در آون خشک گردید. پس از آسیاب کردن، میزان ۱ گرم از پودر پوست انار در ۲۰ml متانول حل شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی واتمن شماره ۳، عصاره در داخل دستگاه روتاری قرار داده شد. سپس، عصاره خشک و در دمای ۴°c نگهداری گردید (بصیری و همکاران ۲۰۱۵).

تهیه فیلم کیتوزان

برای تهیه فیلم کیتوزان، ۲ گرم از کیتوزان در ۱۰۰ml محلول اسیداستیک ۱٪ حل شد. برای دستیابی به پخش-شدن کیتوزان به‌صورت مناسب، کیتوزان به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق بر روی هیتر مجهز به همزن مغناطیسی همزده شد. سپس گلیسرول به میزان ۰/۷۵ml به ازای هر گرم کیتوزان به‌عنوان پلاستی‌سایزر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه محلول همزده شد. محلول کیتوزان با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۳ صاف شد تا مواد نامحلول از محلول گرفته شود. پس از تهیه محلول پایه فیلم کیتوزان، عصاره انار (غلظت صفر و ۱٪ وزنی/حجمی محلول کیتوزان) و اسانس کاکوتی کوهی (غلظت صفر و ۱٪ حجمی/حجمی محلول کیتوزان) به تنهایی و به صورت ترکیبی اضافه شد. جهت انحلال اسانس از توین ۸۰ به میزان ۰/۲۵ml به ازای هر ۱۰۰ml محلول کیتوزان استفاده گردید. در نهایت، محلول نهایی به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با دور ۱۳۰۰ دور بر دقیقه هموژن شد. ماده به‌دست‌آمده روی قالب‌های شیشه‌ای ریخته شد. بعد از بخارشدن حلال در دمای اتاق، فیلم‌های تهیه‌شده از قالب‌ها جدا و به مدت یک روز در آون با دمای حدود ۴۰°c قرار داده شدند. سپس به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا کاملاً خشک گردد. در این مطالعه، چهار گروه فیلم کیتوزان خالص، کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی، کیتوزان حاوی ۱٪ عصاره متانولی پوست انار و کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی + ۱٪ عصاره متانولی پوست انار تهیه گردید (اجاق و همکاران ۲۰۱۰).

[1] Wiley

تعیین ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی ترکیبات ضدمیکروبی

مشروط کردن و اندازه‌گیری ضخامت فیلم

قبل از انجام آزمون‌ها فیلم‌های تهیه‌شده توسط دستگاه رطوبت‌ساز در درجه حرارت ۲۵°c و رطوبت نسبی ۵۵٪ به مدت ٤٨ ساعت مشروط شدند.

ضخامت فیلم‌های تولیدشده با استفاده از میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱mm در حداقل ده نقطه تصادفی اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب (WVP[1])

برای انجام این آزمایش از روش ASTM E96-1995 استفاده شد. بدین منظور کلریدکلسیم بدون آب درون سلول‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری ریخته شد. بدین ترتیب به علت جاذب الرطوبه بودن کلریدکلسیم بدون آب، رطوبت نسبی درون سلول‌ها صفر می‌گردد. در مرحله بعد سلول‌ها به درون دسیکاتور حاوی کلرید سدیم اشباع منتقل شدند. کلرید سدیم اشباع در دمای °c ۲۵، رطوبت ۷۵٪ ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در ۲۵°c، منجر به شیب فشار بخاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال می‌گردد. این اختلاف فشار عامل انتقال بخار آب از فضای دسیکاتور به داخل سلول است. در مدت ٢٤ ساعت نمونه چندین مرتبه از دسیکاتور خارج و توزین شدند و تغییرات وزن سلول‌ها در این مدت با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. در تمام نمونه‌ها نمودار افزایش وزن به صورت تابعی از زمان رسم شد. از تقسیم کردن شیب خط کشیده شده بر سطح فیلم‌های مورد آزمون (دهانه سلول) نرخ انتقال بخار آب (WVTR[2]) بدست آمد. سپس میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (دهناد و همکاران ٢٠١٤):

$$WVP = WVTR/ (P (R_1-R_2)) \times X$$

X: ضخامت فیلم (m)

P: فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵°c

R_1: رطوبت نسبی در دسیکاتور

R_2: رطوبت نسبی در داخل سلول

لازم به ذکر است تحت شرایط آزمایش فوق، (P (R_1- R_2)) برابر با ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال می‌باشد.

رنگ‌سنجی

رنگ نمونه‌های فیلم با از دستگاه رنگ‌سنج ثبت شد. پارامترهای تعیین‌شده در این دستگاه شامل L^* یا روشنایی فیلم (از صفر نشان‌دهنده سیاهی تا ۱۰۰ نشان دهنده سفیدی)، a^* (از ۱۲۰- نشان‌دهنده سبز بودن تا ۱۲۰ نشان دهنده قرمز بودن) و b^* (از ۱۲۰- نشان‌دهنده آبی‌بودن تا ۱۲۰ نشان‌دهنده زرد بودن) فیلم است. قبل از انجام آزمایش با اندازه‌گیری رنگ فیلم‌ها با استفاده از یک پلیت سفید استاندارد (L^*=۹٤/۲٤ ،۰/۵۲- =a^*، b^*=٤/۱۹) دستگاه کالیبره و استاندارد شد. اختلاف رنگ (ΔE) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. ΔL، Δa و Δb اختلاف بین پارامترهای رنگ اندازه‌گیری شده فیلم‌ها با پلیت استاندارد سفید است (مرادی و همکاران، ۲۰۱۲):

$$\Delta E=\sqrt{(\Delta L^2+\Delta a^2+\Delta b^2)}$$

اندازه‌گیری ویژگی‌های مکانیکی

ویژگی‌های مکانیکی شامل مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی روی فیلم با استفاده از دستگاه Testometric (مدل M350-10CT، ساخت انگلستان) و با استفاده از روش شماره ASTM D882-91 اندازه گیری شد (اجاق و همکاران ۲۰۱۰).

ویژگی‌های ضدباکتریایی فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538)، *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 11774)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 19118)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC

[1] Water vapour permeability (WVP)
[2] Water vapor transmission rate (WVTR)

14028) و *اشریشیا کلی* O157:H7 (ATCC 10536) از آرشیو میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی تهیه و در داخل میکروتیوب-های استریل در دمای ۲۰°c- نگهداری گردید.

باکتری‌های موردمطالعه قبل از استفاده به صورت متوالی دو بار در محیط TSB[1] تجدید کشت شدند. کشت دوم با انتقال ۱۰۰µl از سوسپانسیون‌های باکتریایی به ۹ml از محیط مذکور تهیه و در دمای ۳۷°c و به مدت ۱۸ ساعت نگهداری گردید. برای تهیه دوز تلقیح باکتریایی (۱×۱۰^۸ CFU/ml) شمارش باکتریایی به روش کشت سطحی[2] انجام گردید. برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی ۱۰۰µl از هرکدام از سوسپانسیون‌های باکتریایی در داخل پلیت‌های میکروبیولوژیک ۹ سانتی-متری حاوی ۱۵ml محیط TSA[3] جامد تهیه شده تلقیح نموده و سپس در شرایط استریل یک عدد دیسک گرد از فیلم به قطر ۱۰ mm در هر پلیت قرار داده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°c انکوباسیون گردید. در نهایت جهت تعیین میزان بازدارندگی فیلم‌های مورد مطالعه مساحت هاله بازدارندگی مورد مطالعه با استفاده از کولیس تعیین گردید. همچنین پس از تعیین مساحت هاله، دیسک فیلم از روی پلیت برداشته و رشد یا عدم رشد ناحیه پوشیده شده با فیلم بصورت چشمی بررسی گردید (شهبازی و شاویسی ۲۰۱٦).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایشات در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. پس از انجام آزمایشات مختلف بر روی نمونه‌های فیلم کیتوزان حاوی عصاره متانولی پوست انار و اسانس کاکوتی کوهی، داده‌ها در نرم افزار اکسل ثبت شد. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱٦ استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار لحاظ گردید.

نتایج و بحث

آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی

از بین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس کاکوتی کوهی، ۲٤ ترکیب که ۹۹/٦۵٪ ترکیبات اسانس را شامل می‌گردید شناسایی شد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر (جدول ۱)، ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس متعلق به مونوترپن‌های هیدروکربنه (۱۱/۹۷٪)، مونوترپن‌های اکسیژنه (۸٦/۱٪)، سزکوئی ترپن‌های هیدروکربنه (۱٪/۰۷) و سزکوئی ترپن‌های اکسیژنه (۰٪/٤۳) بود. کارواکرول (٦۵٪/۲۲) بیشترین میزان را داشت و سپس ترکیباتی همچون تیمول (۱۹٪/۵۱)، گاما-ترپینن (٤٪/٦۳) و پاراسیمن (٤٪/۸٦) قرار داشتند. بیشترین ترکیبات شناسایی شده در هر گروه عبارتند از: مونوترپن‌های هیدروکربنه: گاما-ترپینن (٤٪/٦۳) و پاراسیمن (٤٪/۸٦)؛ مونوترپن‌های اکسیژنه: کارواکرول (٦۵٪/۲۲) و تیمول (۱۹/۵۱٪)؛ سزکوئی ترپن‌های هیدروکربنه: کاریوفیلن (۱/۰۷٪) و سزکوئی ترپن‌های اکسیژنه: کاریوفیلن اکسید (۰٪/۳۱). با توجه به اینکه ایران یکی از مهمترین مناطق رویش گیاه کاکوتی در دنیا محسوب می‌شود مطالعات مختلفی ترکیبات شیمیایی موجود در این اسانس را مورد ارزیابی قرار داده‌اند. بهروان و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند پولگون (٤٤٪/۵)، ترپینئول (۱٤٪/۵) و متیل استات (۱۰٪/۹) بیشترین ترکیبات شناخته شده در این گیاه است. همچنین در مطالعه صورت گرفته در ترکیه نشان داده شده که بیشترین ترکیبات موجود در این اسانس پولگون (۳۱/۸٦٪)، ۱،۸ سینئول (۱۲٪/۲۱)، لیمونن (۱۰٪/٤) و منتول (۹٪/۱) بوده است (اوزتورک و همکاران ۲۰۰۷). مشابه با نتایج این تحقیق آقاجانی و همکاران (۲۰۰۸) کارواکرول و تیمول را به عنوان بیشترین ترکیب

[1] Tryptic soy broth (TSB)
[2] Surface plate count
[3] Tryptic soy agar (TSA)

شناخته شده در اسانس گیاه کاکوتی کوهی جمع آوری شده از استان لرستان گزارش کردند.

بررسی چیت ساز و همکاران منجر به شناسایی ۲۲ ترکیب متفاوت در اسانس کاکوتی کوهی شده است که ٤ ترکیب بیش از نیمی از ترکیبات این اسانس را تشکیل داده است، این ٤ ترکیب به ترتیب پولگون (۲۹٪/۳)، منتول (۱۱٪/٦)، پیپریتون (۹٪/٤) و سینئول (٤٪/٥) بودند. تفاوت در ترکیبات شیمیایی اسانس گیاهان به فاکتورهای متعددی از قبیل روش اسانس‌گیری، شرایط جغرافیایی، آب و هوا و فصل، گونه گیاه، سن آن و نحوه خشک کردن گیاه بستگی دارد (گیلاوی و همکاران ۲۰۱٤، شهبازی و همکاران ۲۰۱٦).

جدول ۱- نتایج آنالیز اسانس کاکوتی کوهی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)	شاخص بازداری	نوع ماده
۱	*α*-Thujene	۰/۲٦	۱۱/۳۳	۹۲۷	MH[a]
۲	*α*-Pinene	۰/۲۷	۱۱/۷۱	۹۳٤	MH
۳	Camphene	۰/۱۳	۱۲/٦۱	۹٥۲	MH
٤	*β*-Pinene	۰/۰٦	۱٤/۰٦	۹۸۱	MH
٥	1-Octen-3-ol	۰/۰۸	۱٤/۳۲	۹۸٦	-
٦	Myrcene	۰/٥۱	۱٤/٦۲	۹۹۲	MH
۷	*α*-Phellandrene	۰/۱۳	۱٥/٥۸	۱۰۱۰	MH
۸	*α*-Terpinene	۰/۷۹	۱٦/۱۱	۱۰۲۱	MH
۹	*p*-Cymene	٤/۸٦	۱٦/٦۲	۱۰۳۰	MH
۱۰	Limonene	۰/۱	۱٦/۷۷	۱۰۳۳	MH
۱۱	*β*-Phellandrene	۰/۱۱	۱٦/۸۹	۱۰۳٦	MH
۱۲	*γ*-Terpinene	٤/٦۳	۱۸/۳۱	۱۰٦۳	MH
۱۳	*cis*-Sabinene hydrate	۰/۰۷	۱۹/۰۲	۱۰۷۷	OM[b]
۱٤	Terpinolene	۰/۰۸	۱۹/٦۹	۱۰۸۹	MH
۱٥	Linalool	۰/۱۳	۲۰/٥	۱۱۰٥	OM
۱٦	Borneol	۰/٦۱	۲٤/۳٦	۱۱۸۳	OM
۱۷	Terpinene-4-ol	۰/٤۸	۲٤/۷	۱۱۹۰	OM
۱۸	*α*-Terpineol	۰/۰۸	۲٥/٤۹	۱۲۰٦	OM
۱۹	Carvacrol, methyl ether	۰/۰٤	۲۷/۳۸	۱۲٤٦	MH
۲۰	Thymol	۱۹/٥۱	۲۹/٦۱	۱۲۹۳	OM
۲۱	Carvacrol	٦٥/۲۲	۳۰/٥۷	۱۳۱٥	OM
۲۲	*E*-Caryophyllene	۱/۰۷	۳٥/٤۷	۱٤۲۷	SH[c]
۲۳	Spathulenol	۰/۱۲	٤۲/۱۰	۱٥۹۰	OS[d]
۲٤	Caryophyllene oxide	۰/۳۱	٤۲۳۰	۱٥۹٥	OS
	جمع کل	۹۹/٦٥			

[a] Monoterpene hydrocarbons; [b] Oxygenated monoterpenes; [c] Sesquiterpene hydrocarbons; [d] Oxygenated sesquiterpenes

مشخصات ظاهری فیلم کیتوزان حاوی ترکیبات ضدمیکروبی

از لحاظ ظاهری، فیلم کیتوزان به رنگ سفید مایل به زرد و تا حدودی محکم بود و به راحتی از قالب جدا می‌شد. رنگ فیلم‌های حاوی عصاره پوست انار، قرمز

مایل به قهوه‌ای کم‌رنگ و مات بود. تغییر رنگ فیلم‌ها متاثر از میزان اسانس کاکوتی کوهی مورد استفاده نبود، بطوریکه فیلم کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی مشابه با فیلم‌های پایه اولیه مذکور سفید متمایل به زرد بودند.

ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی ترکیبات ضدمیکروبی

نتایج مربوط به ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، عصاره پوست انار و اسانس کاکوتی کوهی به تنهایی و توام تاثیر معنی‌داری بر ضخامت فیلم کیتوزان نداشتند ($P>0/05$). همانطور که در جدول ۲ ارائه شده است بیشترین میزان مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی در فیلم کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی + ۱٪ عصاره پوست انار مشاهده گردید (۵۹/٦ MPa و ٤۱/٦٪). نتایج این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۰) و مرادی و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد. افزایش میزان مقاومت به کشش و ازدیاد طول تا نقطه پارگی در فیلم‌های حاوی اسانس و عصاره به دلیل پیوندهای عرضی می‌باشد که بین فیلم کیتوزان و ترکیبات فنولی اسانس و عصاره ایجاد می‌شود (دهناد و همکاران ۲۰۱٤). در اسانس کاکوتی کوهی تیمول و کارواکرول و در پوست انار ترکیبات مختلفی نظیر پلی‌فنول، آلدهید فنولیک، مونوترپن‌ها، آمینواسیدها، استروئیدها و ترکیبات غیرآلی دیگر یافت می‌شود. به دلیل وزن بالای این ترکیبات و اتصالات ایجاد شده در فیلم میزان نرم شدن کاهش و میزان مقاومت آن‌ها در برابر تنش کششی افزایش پیدا می‌کند. از طرف دیگر به دلیل ماهیت آب‌گریز بودن اسانس و عصاره میزان رطوبت در این دسته از فیلم‌ها نسبت به گروه فیلم کنترل به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد که این مسئله به افزایش مقاومت فیلم در برابر تنش کششی و پارگی می‌افزاید (دهناد و همکاران ۲۰۱٤).

براساس نتایج مطالعه حاضر، افزودن اسانس و عصاره بصورت معنی‌داری موجب کاهش میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های مورد مطالعه گردید ($P<0/05$). در صورت استفاده از فیلم‌های ضدمیکروبی در غذاهای با رطوبت متوسط و بالا ارزیابی میزان نفوذپذیری به بخار آب ضروری می‌باشد. میزان انتقال بخار آب حجمی از بخار آب است که از یک سطح مشخص و در یک زمان خاص عبور می‌کند. این شاخص تحت تاثیر دو فاکتور قرار دارد: ۱- خصوصیت نفوذپذیری به بخار آب مورد استفاده در تهیه فیلم (به ویژه نوع پلیمر) و ۲- اختلاف غلظت بخار آب در دو سمت فیلم در حین آزمایش (مرادی و همکاران ۲۰۱۲). نتایج مطالعات مختلف نشان داده است هرچقدر میزان ترکیبات آب‌گریز از جمله اسیدهای چرب، اسانس و عصاره‌های طبیعی در فیلم افزایش یابد علاوه بر بهبود خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب کاهش می‌یابد که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد (ال-وکیل و همکاران ۲۰۱۵، مرادی و همکاران ۲۰۱۲، ولپ و همکاران ۲۰۱۵). همچنین، این شاخص به صورت معنی‌داری تحت تاثیر ساختمان شیمیایی، مورفولوژی فیلم، شرایط تهیه و نوع و غلظت مواد افزودنی قرار دارد. ترکیبات فنولی با قرارگرفتن در ماتریس کیتوزان ایجاد یکسری پیوند هیدروژنی و کووالانت با گروه‌های فعال کیتوزان می‌کنند. این پیوندهای هیدروژنی و کووالانت بین شبکه کیتوزان و ترکیبات فنولی موجب کاهش توانایی گروه‌های هیدروژنی برای تشکیل پیوند هیدروژنی با آب و در نهایت کاهش تمایل فیلم نسبت به آب می‌شود. چنین تداخلاتی بین ترکیبات فنولی و ماتریس فیلم، بر روی خصوصیات فیزیکی و مکانیکی، حلالیت و رهایش ترکیبات فعال نیز تاثیرگذار است (ال-وکیل و همکاران ۲۰۱۵).

پارامترهای رنگی فیلم‌های مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی به دلیل اثرات آن‌ها در مقبولیت مصرف‌کننده از اهمیت بالایی برخوردار است. مقایسه شاخص‌های رنگ در جدول ۳ ارائه شده است.

مطالعات سایر محققین نیز نشان داده است افزایش غلظت اسانس فلفل، دارچین و میخک موجب تاثیر معنی‌دار در رنگ فیلم بسته‌بندی مواد غذایی می‌شود (ال‌وکیل و همکاران ۲۰۱۵، ولپ و همکاران ۲۰۱۵).

همچنین، نتایج مطالعه مرادی و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان داد افزودن عصاره هسته انگور به فیلم کیتوزان در غلظت‌های ۱ و ۲٪ به همراه اسانس آویشن شیرازی ۱٪ موجب تغییر معنی‌دار در رنگ فیلم می‌گردد. بر اساس نتایج این مطالعه و پژوهش‌های سایر محققین، به هنگام مطالعه در زمینه فیلم‌های بسته‌بندی ارزیابی حسی آن‌ها به منظور مقبولیت ظاهری فیلم‌ها ضروری می‌باشد.

جدول ۲- خصوصیات ضخامت، مقاومت به کشش (TS)، ازدیاد طول تا نقطه پارگی و نفوذپذیری به بخار آب فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار

فیلم	ضخامت (mm)	TS (MPa)	ازدیاد طول تا نقطه پارگی (٪)	نفوذپذیری به بخار آب ($g\ mm/kPa\ h\ m^2$)
کیتوزان خالص	۰/۰۷۷±۰/۰۱^{a}	٤٧/٢±٨/٨^{b}	٢٩/٠±٨/٨^{c}	٢٥/٦٢±٠/٠٧^{a}
اسانس ۱٪	۰/۰۸۰±۰/۰۰^{a}	٣٩/٣±٢/٢^{c}	٢١/٢±١/٥^{d}	٢٤/٨± ٠/٠١^{b}
عصاره۱٪	۰/۰۸۱±۰/۰۳^{a}	٤٩/٩±١/٩^{b}	٣٤/٩±٠/٨^{b}	٢٣/٥± ٠/٠١^{c}
اسانس ۱٪+ عصاره۱٪	۰/۰۸۱±۰/۰۰^{a}	٥٩/٦±٥/٦^{a}	٤١/٦±١/٧^{a}	٢١/٣± ٠/٠١^{d}

$^{a-d}$ حروف مشابه در یک ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

شاخص b^* (شاخص زردرنگ بودن فیلم) به صورت معنی‌داری با افزودن غلظت‌های بیشتر اسانس و عصاره در فیلم‌های مورد مطالعه کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۵). برخلاف شاخص b^*، شاخص a^* (شاخص رنگ قرمز) با افزایش غلظت اسانس کاکوتی کوهی + عصاره پوست انار افزایش پیدا کرد. کمترین میزان شاخص L^* نیز در فیلم کیتوزان حاوی ۱٪ اسانس کاکوتی کوهی + ۱٪ عصاره پوست انار مشاهده گردید (٤٥/٤١). نتایج این مطالعه نشان داد تغییر رنگ فیلم متاثر از نوع و میزان اسانس و عصاره مورد استفاده، حتی در غلظت‌های پایین است.

جدول ۳- خصوصیات رنگی فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار

فیلم	L^*	a^*	b^*	ΔE
کیتوزان خالص	٨٨/٦٦±٠/١١^{a}	−١/٠±٧٦/٢^{c}	٢٩/٨١±٠/٠٥^{a}	١٩/٢٦
اسانس ۱٪	٨٤/٨٥±٢/٥^{a}	−٠/٠±١٢/٠٥^{b}	٢٨/١٥±٠/٧١^{a}	٢٥/٧٦
عصاره۱٪	٤٩/٩٣±٠/٥^{b}	١٦/٠±٠٩/١^{a}	٢٦/٢٤±٢/٧^{b}	٥٢/١٧
اسانس ۱٪+ عصاره۱٪	٤٥/٤١±٠/٢^{b}	١٦/٠±٠١/٦^{a}	٢٢/٨٧±٠/٢^{c}	٥٤/٨٠

$^{a-d}$: حروف مشابه در یک ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

ویژگی‌های ضدباکتریایی فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار

همانطور که در جدول ٤ نشان داده شده است، بیشترین میزان تاثیر فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و

عصاره متانولی انار روی باکتری‌های گرم مثبت (به ویژه *باسیلوس سرئوس*) و کمترین میزان تاثیر آن بر روی باکتری‌های گرم منفی (*سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کلی*) بود. فیلم کیتوزان خالص و کیتوزان حاوی ۱٪ عصاره متانولی پوست انار دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه تمامی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه بودند، با این وجود هاله عدم رشد مشاهده نگردید. بطورکلی، خواص ضدمیکروبی کیتوزان به دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی آن می‌باشد. در واقع مکانیسم اصلی تاثیر کیتوزان با تشکیل کمپلکس بین گروه آمین آن و بار منفی سیالیک اسید و گروه‌های فسفوریل ترکیبات لیپیدی موجود در غشای باکتری مرتبط می‌باشد (کاکایی و شهبازی ۲۰۱۶). عدم وجود هاله بازدارندگی در فیلم کیتوزان خالص و کیتوزان حاوی ۱٪ عصاره متانولی پوست انار را می‌توان به عدم انتشار کیتوزان و ترکیبات موثره عصاره متانولی پوست انار به محیط کشت مورد استفاده نسبت داد (اجاق و همکاران ۲۰۱۰).

جدول ۴- خواص ضدباکتریایی فیلم کیتوزان حاوی اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار

	هاله عدم رشد (میلی‌متر)			
باکتری	کیتوزان خالص	اسانس ۱٪	**عصاره**۱٪	اسانس ۱٪+ **عصاره**۱٪
اشریشیا کلی O157:H7	–	۰±۱/٤/۱	-	۰±٥/٤/۰
سالمونلا تیفی‌موریوم	–	۰±۳/٤/۰	-	۰±٥/٤/۰
لیستریا مونوسیتوژنز	–	۰±۲/٤/۲	–	۰±۱/٥/۱
باسیلوس سرئوس	–	۰±٤/٥/۱	–	٦/۰±٥/۲
باسیلوس سوبتیلیس	–	٦/۰±٤/۳	–	۷/۰±۳/۱
استافیلوکوکوس اورئوس	–	۰±۱/٥/۰	–	٦/۰±۱/۱

مطالعات معدودی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره پوست انار را به منظور کاربردی‌تر کردن هرچه بیشتر این ماده در مدل‌های غذایی مورد بررسی قرار داده‌اند: عصاره پوست انار نیز دارای اثرات ضدمیکروبی علیه بسیاری از عوامل بیماریزای منتقله از مواد غذایی می‌باشد. ژانگ و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که مهمترین دلیل تاثیرات ضدمیکروبی این عصاره وجود ترکیبات شیمیایی مختلفی از قبیل فلاونوئیدها و اسید فنولیک می‌باشد. خان و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند ترکیبات غالب عصاره اتانولی پوست انار (پلی‌فنول‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) دارای اثرات ضدمیکروبی علیه سویه‌های باکتریایی نظیر *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. شهیدی و همکاران (۲۰۰٤)، نشان دادند ترکیبات فنولی موجود در عصاره پوست انار با دناتوره‌کردن آنزیم‌های باکتریایی تاثیرات ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند. همچنین، این ترکیبات با اتصال به مواد معدنی، ویتامین‌ها و کربوهیدرات‌ها آن‌ها را از دسترس میکروارگانیسم‌ها خارج می‌سازند. همچنین، فنول‌ها می‌توانند به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل و منجر به تخریب و اختلال در در عملکرد آن گردند (خان و همکاران ۲۰۱۱، ژانگ و همکاران ۲۰۱۰).

برخی از مطالعات اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه کاکوتی را در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های مختلف غذایی بررسی کرده‌اند. بر اساس نتایج این مطالعات، اسانس کاکوتی کوهی دارای اثر ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم منفی نظیر *انتروباکتر آئروژنز*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا نومونیا*، *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا تیفی-موریوم* و باکتری‌های گرم مثبت همانند *باسیلوس*

سرئوس، *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (بکچی و همکاران ۲۰۰۷، چیت ساز و همکاران ۲۰۰۷، شهبازی ۲۰۱۵). در مطالعه اوزتورک و همکاران (۲۰۰۷)، اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه کاکوتی کوهی بومی ترکیه بر باکتری‌هایی نظیر *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* بررسی شده است. بر اساس نتایج این مطالعه این اسانس به صورت بسیار موثری از رشد باکتری‌های مذکور در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌نماید. سنبلی و همکاران (۲۰۱۰) و بهروان و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند اسانس گیاه کاکوتی دارای خواص ضدمیکروبی علیه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* می‌باشد.

مطالعات نشان داده‌اند استفاده همزمان از چند ترکیب دارای خاصیت ضدمیکروبی راهکاری مناسب برای کاهش میزان غلظت مورد استفاده مواد نگهدارنده طبیعی و افزایش اثرات ضدمیکروبی آن‌ها می‌باشد. در مطالعه حاضر، نیز بیشترین کاهش قابل ملاحظه و معنی‌دار در تعداد باکتری‌ها در گروه اسانس ۱٪ + عصاره ۱٪ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در این حالت میزان اثر ترکیبات ضدمیکروبی بر غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها و ایجاد حفره در این غشا افزایش می‌یابد که سبب اختلالات بیشتر در تبادل مواد مورد نیاز نظیر ATP می‌شود، همچنین تراوش مواد درون باکتری‌ها (مانند پتاسیم، فسفات غیرارگانیک، اسیدهای آمینه، روبیدیوم و گلوتامات) به بیرون و در نهایت مرگ آن‌ها سریعتر اتفاق می‌افتد (شهبازی و همکاران ۲۰۱۶، وارینر و همکاران ۲۰۰۹).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از اسانس کاکوتی و عصاره متانولی پوست انار می‌توان فیلم خوراکی فعال جدید به حوزه بسته‌بندی مواد غذایی معرفی نمود که دارای ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی و همچنین ضدمیکروبی بهتری نسبت به فیلم کیتوزان خالص می‌باشد. با مطالعه بیشتر بر ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی آن می‌توان یک بسته‌بندی مناسب برای حفظ ویژگی‌های کیفی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی معرفی کرد.

منابع مورد استفاده

Aghajani Z, Assadian F, Masoudi S, Chalabian F, Esmaeili A, Tabatabaei-Anaraki M and Rustaiyan A, 2008. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activities of the oil of *Ziziphora clinopodioides* and *Z. capitata* subsp. *capitata* from Iran. Chemistry of Natural Compounds 44(3): 387-389.

Arancibia M, Giménez B, López-Caballero M, Gómez-Guillén M and Montero P, 2014. Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. LWT-Food Science and Technology 59(2): 989-995.

ASTM, 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, Pp. 96-97. In: Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material

Basiri S, Shekarforoush SS, Aminlari M and Akbari S, 2015. The effect of pomegranate peel extract (PPE) on the polyphenol oxidase (PPO) and quality of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during refrigerated storage. LWT-Food Science and Technology 60(2): 1025-1033.

Behravan J, Ramezani M, Hassanzadeh M, Eskandari M, Kasaian J and Sabeti Z, 2007. Composition, antimycotic and antibacterial activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil from Iran. Journal of Essenttial Oil Bearing Plants 10(4): 339-345.

Bekhechi C, Bekkara FA, Abdelouahid DE, Liu K, Casanova J and Tomi F, 2007. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ziziphora hispanica* (L.) from Algeria. Journal of Essenttial Oil Bearing Plants 10(4): 318-323.

Dehnad D, Mirzaei H, Emam-Djomeh Z, Jafari SM and Dadashi S, 2014. Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. Carbohydrate Polymer 109: 148-154.

Chitsaz M, Pergar A, Naseri M, Kamalinajad M, Bazargan M, Mansouri S and Ansari F, 2007. Composition ofthe essential oil and antibacterial activity of alcoholic extract and oil of *Ziziphora clinopodiodes*. Lamon selected bacteria. Daneshvar Journal 14(68): 15-22.

El-Wakil NA, Hassan EA, Abou-Zeid RE and Dufresne A, 2015. Development of wheat gluten/nanocellulose/titanium dioxide nanocomposites for active food packaging. Carbohydrate Polymer 124: 337-346.

Gyawali R and Ibrahim SA, 2014. Natural products as antimicrobial agents. Food Control 46: 412-429.

Kakaei S and Shahbazi Y, 2017. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. LWT-Food Science and Technology 72: 432-438.

Khan JA and Hanee S, 2011. Antibacterial properties of *Punica granatum* peels. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 2(3): 23-27.

Lv F, Liang H, Yuan Q and Li C, 2011. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. Food Research International 44(9): 3057-3064.

Moradi M, Tajik H, Rohani SMR, Oromiehie AR, Malekinejad H, Aliakbarlu J and Hadian M, 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. LWT-Food Science and Technology 46(2): 477-484.

Nowzari F, Shábanpour B and Ojagh SM, 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry 141(3): 1667-1672.

Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH and Hosseini SMH, 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry 120(1): 193-198.

Ozturk S and Ercisli S, 2007. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food Control 18(5): 535-540.

Schulz H, Özkan G, Baranska M, Krüger H and Özcan M, 2005. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. Vibrational Spectroscopy 39(2): 249-256.

Shahbazi Y and Shavisi N. 2016. Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. LWT-Food Science and Technology 71: 364-369.

Shahbazi Y, 2015. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. Journal of Pathogens 1-7.

Sonboli A, Atri M and Shafiei S, 2010. Intraspecific variability of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. rigida from Iran. Chemistry & Biodiversity 7(7): 1784-1789.

Shahbazi Y, Shavisi N and Mohebi E, 2016. Effects of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin, both separately and in combination, to extend shelf life and control *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in raw beef patty during refrigerated storage. Journal of Food Safety 36: 227-236.

Shahbazi Y, Shavisi N and Mohebi E, 2016. Potential application of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as natural preservatives against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157:H7 in commercial barley soup. Journal of Food Safety 36: 435-441.

Shahidi F and Naczk M. Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press. 2004.
Volpe M, Siano F, Paolucci M, Sacco A, Sorrentino A, Malinconico M and Varricchio E, 2015. Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchusmykiss*) fillets. LWT-Food Science and Technology 60(1): 615-622.
Warriner K and Namvar A, 2009. What is the *hysteria* with *Listeria*? Trends in Food Science & Technology 20(6): 245-254.
Zhang L, Gao Y, Zhang Y, Liu J and Yu J, 2010. Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves. Scientia Horticulturae 123: 543-546.

Study on the effect of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and methanolic pomegranate peel extract on physical, mechanical and antibacterial properties of edible chitosan film

Y Shahbazi[1*] and MH Moosavy[2]

Received: January 29, 2017 Accepted: May 06, 2017
[1]Associate Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Razi University, Kermanshah, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Hygiene and Aquatic, University of Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email: yasser.shahbazi@yahoo.com

Abstract
In the recent years, numerous studies have been focused on the production and applying of biodegradable polymers due to concern regarding the environmental pollution caused by plastic packaging materials, and also increasing consumer's interest for improvement of quality and appearance of food products. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of methanolic pomegranate peel extract (PPE) separately and in combination with *Ziziphora clinopodioides* essential oil (ZEO) on the physical, mechanical and antibacterial properties of chitosan film. The analysis of the chemical composition of *Z. clinopodioides* essential oil was conducted by means of gas chromatography with mass spectrometry (GC-MS). Physical and mechanical properties of the investigated films including thickness, tensile strength, elongation at break, water vapour permeability (WVP) and color were examined. Antibacterial property of the films was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 using disk diffusion method. According to the results of the present study, the best antibacterial property (inhibition zone between 5.5-6.1 mm), highest tensile strength (59.6 MPa), thickness (0.081 mm) and elongation at break (41.6%), lowest WVP (21.3 g mm/kPa h m^2) and also lowest lightness (L^*= 45.41) were observed for chitosan film incorporated with ZEO 1% + PPE 1%. The chitosan film incorporated with ZEO and PPE have shown good antibacterial, physical and mechanical properties which can be barrier against bacterial and chemical contamination in food products.

Keywords: *Ziziphora clinopodioides* essential oil, Chitosan, Pomegranate peel extract, Edible film, Packaging