Food Hygiene, Vol. 11, No. 42, Summer 2021

"Research article" **DOI:10.30495/JFH.2021.1935286.1321**

The effect of biodegradable film based on polyvinyl acetate / gelatin containing angelica essential oil on increasing the shelf life of pita bread

Salimkhaniyan, M.[1], Nateghi, L.[2*], Zand, N.[3]

1. M. Sc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

*Corresponding author: leylanatheghi@iauvaramin.ac.ir

(Received: 2021/7/10 Accepted: 2021/9/26)

Abstract

The use of biodegradable films containing antimicrobial compounds for packaging is one of the effective methods in reducing environmental pollution and the safety of food products. This study aimed to investigate the effect of biodegradable films based on polyvinyl acetate/gelatin containing Angelica essential oil on increasing the shelf life of pita bread. Films based on polyvinyl acetate and gelatin were mixed with 0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20, 100/0 ratios and given Angelica essential oil with a concentration of 1250 µg/ml was added. Antimicrobial and mechanical properties were evaluated during 9 days of storage at 25 °C. The optimal film with the highest antimicrobial properties was selected for packing pita bread and its microbial features were compared with pita bread packed in polyethylene. The highest growth inhibition zone of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* belonged to the biodegradable film of 40% polyvinyl acetate and 60% gelatin. Thus, the film was selected for packaging pita bread. Loads of yeast and mold as well as the total bacteria in pita bread packed in the optimal biodegradable film were significantly less than a pita bread packed in polyethylene. With increasing gelatin and decreasing polyvinyl acetate, water vapor permeability, solubility, water absorption, oxygen permeability, and film thickness were increased. The use of biodegradable films containing antimicrobial compounds can be an effective step in reducing the microbial load and increasing the quality properties of bread during storage.

Conflict of interest: None declared.

Key word: Pita bread, polyvinyl acetate, gelatin, *Heracleum persicum* essential oil, biodegradable film

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2021.1935286.1321

اثر فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی وینیل استات/ ژلاتین حاوی اسانس گلپر بر افزایش زمان ماندگاری نان پیتا

مهسا سلیم خانیان[۱]، لیلا ناطقی[۲*]، نازنین زند[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
۳. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: leylanatheghi@iauvaramin.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۴/۱۹ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۷/۴)

چکیده

استفاده از فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی ترکیبات ضدمیکروبی برای بسته‌بندی یکی از روش‌های مؤثر در کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی و ایمنی در محصولات غذایی است. هدف از این تحقیق بررسی اثر فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی وینیل استات/ ژلاتین حاوی اسانس گلپر بر افزایش زمان ماندگاری نان پیتا بود. فیلم بر پایه پلی وینیل استات و ژلاتین با نسبت‌های ۰/۱۰۰، ۲۰/۸۰، ۴۰/۶۰، ۶۰/۴۰، ۸۰/۲۰، ۱۰۰/۰ با یکدیگر مخلوط شدند و اسانس گلپر با غلظت ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر افزوده شد. خواص ضدمیکروبی و مکانیکی آن‌ها طی ۹ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ارزیابی شد. سپس فیلم بهینه با بالاترین خاصیت ضدمیکروبی برای بسته‌بندی نان پیتا انتخاب گردید و خواص میکروبی آن با نان پیتا بسته‌بندی شده در پلی‌اتیلن طی دوره نگهداری مقایسه گردید. بالاترین میزان هاله عدم رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* متعلق به فیلم زیست‌تخریب‌پذیر پلی وینیل استات ۴۰ درصد و ژلاتین ۶۰ درصد بود. بنابراین فیلم مذکور برای بسته‌بندی نان پیتا انتخاب شد. میزان کپک و مخمر و شمارش کلی در نان پیتا بسته‌بندی شده در فیلم بهینه به‌صورت معنی‌داری کمتر از نان پیتا بسته‌بندی‌شده در پلی‌اتیلن بود. با افزایش میزان ژلاتین و کاهش پلی وینیل استات میزان نفوذ به بخار آب، حلالیت، جذب آب، نفوذ به اکسیژن و ضخامت فیلم‌ها افزایش یافت. استفاده از فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی ترکیبات ضدمیکروبی می‌تواند گام مؤثری بر کاهش بار میکروبی و افزایش خواص کیفی نان طی دوره نگهداری باشد.

واژه‌های کلیدی: نان پیتا، پلی ونیل استات، ژلاتین، اسانس گلپر، فیلم زیست‌تخریب‌پذیر

مقدمه

فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر با گردش آب، دی‌اکسید کربن، اکسیژن و نیتروژن در زنجیره غذایی، راه‌حل مناسبی برای رفع تأثیرات مخرب محیطی ناشی از تجمع مواد پلاستیکی و غیر تخریب‌پذیر می‌باشند (Romero-Bastida *et al*., 2005). در تولید فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر معمولاً بیوپلیمرها نظیر پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، صمغ‌ها و سایر ترکیبات به کار گرفته می‌شوند. بررسی‌ها نشان داد که ترکیب بیوپلیمرهای مختلف نسبت به استفاده از یک بیوپلیمر خالص، فیلمی با ویژگی‌های مطلوب‌تر تولید می‌کند زیرا در این حالت هم‌زمان می‌توان از کلیه خصوصیات مطلوب بیوپلیمرها بهره جست و همچنین اثرات نامطلوب و معایب یکدیگر را پوشش خواهند داد (Bodini *et al*., 2013). یکی از این بیوپلیمرهای پروتئینی، پروتئین ژلاتین است. ژلاتین یک پلی‌پپتید با وزن مولکولی بالا است که از هیدرولیز کنترل‌شده کلاژن حاصل از بافت‌های پیوندی، پوست، استخوان و تاندون‌ها مشتق می‌شود. مشخصه خاص ژلاتین میزان بالای آمینواسیدهای گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین و آب‌دوستی است (Barreto *et al*., 2003).

ژلاتین زیست‌سازگاری، شکل‌پذیری و قابلیت چسبندگی عالی از خود نشان می‌دهد و با تشکیل فیلم‌ها و پوشش‌هایی با ویژگی‌های مکانیکی و ممانعت کنندگی مناسب در برابر گازها در رطوبت نسبی پایین، می‌تواند به‌عنوان مواد بسته‌بندی زیستی به‌خوبی عمل کند. فیلم‌های ژلاتین شفاف، انعطاف‌پذیر و در عین‌حال محکم هستند (Pereda *et al*., 2011). بیوپلیمر دیگر، بیوپلیمر سنتزی پلی وینیل استات (PVA) است که محصول هیدرولیز پلیمر پلی وینیل استات است و محلول در آب می‌باشد. پلی وینیل استات خاصیت مناسبی برای تشکیل فیلم و ویژگی امولسیون‌کنندگی مطلوبی دارد و آماده‌سازی آسان، مقاومت در برابر مواد شیمیایی، خواص مکانیکی خوب و قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری، آن را به گزینه مناسبی جهت اختلاط با پلیمرهای طبیعی در تولید فیلم‌های مرکب تبدیل کرده است (Srinivasa *et al*., 2003). پلی ونیل استات نسبت به نفوذ حلال‌ها و روغن مقاوم است و مانند یک بازدارنده قوی در برابر اکسیژن و آروما عمل می‌کند (Paralikar *et al*., 2008). پلی وینیل استات به‌عنوان یک جزء در تولید فیلم‌های مرکب با پلیمرهای زیستی دیگر مانند کیتوزان، نشاسته، کربوکسی متیل سلولز، صمغ بادام‌هندی و پالپ چغندرقند مورد استفاده قرار گرفته است (Shen *et al*., 2015). وجود گروه‌های هیدروکسیل در نشاسته و پلی ونیل استات و در نتیجه برقراری پیوندهای هیدروژنی بین آن‌ها به‌طور بالقوه می‌تواند باعث افزایش قابلیت امتزاج‌پذیری و بهبود ویژگی‌های فیزیکی ترکیبات حاصل از آن‌ها شود (Majdzadeh-Ardakani and Nazari, 2010). فیلم‌های تولید شده با بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر توانایی حمل ترکیبات فعال را دارند و این امر به توسعه فناوری جدید در بسته‌بندی مواد غذایی به‌نام بسته‌بندی فعال منجر شده است (Mascheroni *et al*., 2010).

گلپر ایرانی با نام علمی *Heracleum persicum* گیاهی علفی، چندساله و از خانواده چتریان است. ساقه این گیاه ضخیم، منشعب و دارای شاخه‌هایی منتهی به گل‌آذین‌های چتری وسیع و گسترده بوده و کلیه بخش‌های آن معطر می‌باشد (Barzegari Firouzabadi

and Mirhosseini, 2012). این گیاه بومی ایران است و برای معطر ساختن برخی غذاهای سنتی به کار می‌رود (Rezayan and Ehsani, 2015). ترکیبات شیمیایی این گیاه شامل استات هکسیلیک (Hexyl acetate)، استات استیک، بوتیرات متیلیک، آنتول و اسیدهای مختلف دیگر است که بوی تند گلپر را سبب می‌شوند. بیشترین ماده موجود در این گیاه آنتول می‌باشد که ترکیبی معطر با کاربردهای تجاری فراوان در صنعت غذا و داروسازی است. بتاپینن حدود ۷ درصد از ترکیبات اسانس گلپر را تشکیل می‌دهد که خاصیت باکتریواستاتیکی دارد. همچنین اسانس این گیاه به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی، فنیل پروپانوئیدها و ترکیبات ترپنوئیدی می‌تواند واکنش‌های اکسیداسیون را به تأخیر بیندازد (Sedaghat Boroujeni *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای خواص فیزیکی، ضداکسایشی و میکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر پلی‌ساکارید سویا حاوی اسانس مرزه را بررسی و نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس مرزه به‌عنوان یک ماده ضدمیکروب و ضد اکسایش طبیعی، پتانسیل بالایی برای ساخت فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر دارد (Barzegar and Alizadeh, 2017). هدف از این پژوهش بررسی ویژگی‌های فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی وینیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر و اثر فیلم بهینه بر خواص میکروبی نان پیتا بسته‌بندی‌شده بود.

مواد و روش‌ها

- مواد مصرفی

از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، محیط کشت مولر-هینتون آگار، محیط کشت سابروز دکستروز آگار، قرص رینگر (Merck, Germany) اسانس گلپر و ژلاتین (آدونیس، ایران)، نمک تترازولیوم (سیگما ، ایران)، سرم فیزیولوژی (پارسیان، ایران)، پلی وینیل استات (پارس پلیمر خاوران، ایران)، گلیسرول (ثمن شیمی، ایران)، الکل اتیلن، دیسک آنتی‌بیوگرام (کیمیا، ایران) و اتانول (کیمیا، ایران) استفاده شد. کپک‌های *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* (ATCC 42710) و *آسپرژیلوس نایجر* (ATCC 16404) از انستیو پاستور تهران تهیه شدند.

- روش آماده‌سازی سوسپانسیون اسپور

بعد از فعال‌سازی کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* روی محیط پوتیتو دکستروز آگار شیب‌دار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز، ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به لوله آزمایش حاوی اسپور اضافه و با میله‌ی شیشه‌ای استریل سطح کشت جهت برداشت اسپور به‌آرامی خراش داده شد و به‌منظور حذف قطعات میسیلیوم، با استفاده از پشم‌شیشه استریل فیلتر شد. تعداد اسپور به‌وسیله هموسیتومتر شمارش و در 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند (Gandomi *et al.*, 2009).

- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس گلپر

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گلپر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) استریل با دمای ٤٥ درجه سلسیوس، حاوی غلظت‌های ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸، ٢٥٦ و ۵۱۲ میکروگرم/میلی‌لیتر اسانس گلپر تهیه و به ازای هر غلظت در سه پلیت توزیع شد. یک دیسک آنتی‌بیوگرام (با قطر ٦/٤ میلی‌متر) در مرکز هر پلیت قرار داده شد و با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور 10^6 میلی‌لیتر، تلقیح گردید. پلیت‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. زمانی‌که در گروه کنترل تمام قطر

پلیت توسط قارچ پوشانده شده، قطر کلنی‌ها در دیگر پلیت‌ها اندازه‌گیری گردید و کمترین غلظتی از اسانس که از رشد کپک جلوگیری نمود به‌عنوان MIC گزارش شد (Azizkhani *et al*., 2016).

- تعیین حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) اسانس گلپر

جهت تعیین حداقل غلظت‌کشندگی اسانس گلپر از چاهک‌های حاوی محیط کشت سابروز دکستروز آگار و باکتری و مخمر تلقیح شده که بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری و اضافه شدن نمک تترازولیوم، به رنگ قرمز تغییر ندادند را با استفاده از آنس حلقوی، به یک محیط کشت آگاردار عمومی مانند مولر هیلتون آگار (Mullen Hinton Agar) منتقل شد. بدین ترتیب کمترین غلظتی از اسانس که فاقد کلنی باکتری بود را به‌عنوان MBC بر اساس میکروگرم/میلی‌لیتر گزارش گردید (Azizkhani *et al*., 2016).

-آماده‌سازی فیلم زیست‌تخریب‌پذیر

فیلم‌ها با استفاده از روش قالب‌ریزی یا کاستینگ (Casting) تهیه شدند. ابتدا نسبت‌های مختلف حاوی غلظت‌های مختلف پلی وینیل استات و ژلاتین مطابق با جدول (۱) با هم مخلوط شدند و در آب مقطر حل شدند و به‌مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس با سرعت ٤۰۰ دور در دقیقه حرارت داده شدند. سپس اسانس گلپر با غلظت حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۲۵۰ µg/mL به فیلم‌ها اضافه شد. به‌منظور حذف ناخالصی‌ها و از بین بردن حباب‌ها، محلول‌ها را تحت خلأ هواگیری و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۳ صاف شد و در ادامه مقدار ۰/۵ درصد وزنی/وزنی گلیسرول اضافه شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کاملاً همگن شدند. فیلم‌های محلول درون یک صفحه شیشه‌ای که با تفلون یکدست درزبندی شده بود (با ابعاد ۳۰ در ۳۰ سانتی‌متر) که قبلاً با اتانول تمیز شده بود، ریخته شد. برای بهبود هواگیری و خروج حباب‌های باقی‌مانده احتمالی از یک شیکر به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق استفاده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ٤۰ درجه سلسیوس به‌مدت ٤ ساعت قرار داده شدند و خشک شدند تا فیلم‌های زیستی مورد نظر به‌دست آمد. فیلم‌های تهیه‌شده از صفحه جدا شدند و برای ارزیابی هاله عدم رشد برش داده شدند (Chang *et al*., 2009).

جدول (۱)- تیمارهای مورد استفاده برای تولید فیلم

تیمار	پلی وینیل استات (درصد)	ژلاتین (درصد)
۱	۱۰۰	۰
۲	۸۰	۲۰
۳	٦۰	٤۰
٤	٤۰	٦۰
٥	۲۰	۸۰
٦	۰	۱۰۰

- آزمون‌های انجام‌شده بر روی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر

آزمون نفوذ بـه بخارآب، اندازه‌گیری حلالیت، جذب آب فیلم، نفوذ به اکسـیژن و ضـخامت فیلم‌ها مطابق با روش اسـتفـاده شـده در تحقیقات قبلی تعیین گردید (Barzegar and Alizadeh, 2017).

- اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد فیلم زیست‌تخریب‌پذیر

فعالیت ضـدمیکروبی فیلم تهیه شـده با روش انتشار در آگار صـورت گرفت. ابتدا سـوسـپانسـیون میکروبی حاوی 1×10^{7} cfu/ml روی محیط کشـت مولر-هینتون آگـار بـه روش سـطحی کشـت داده شـد. فیلم‌های زیسـت‌تخریـب‌پـذیر به قطر ٦ میلی‌متر با اسـتفاده از چـاقوی دایره‌ای برش داده شـد و بـافاصـله معین از یکدیگر و دیواره پلیت روی محیط کشـت قرار گرفت. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به‌عنوان کنترل استفاده شـد. پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شـدند و قطر هاله عدم رشـد در اطراف دیسـک‌ها با کولیس (برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری شد (Alizadeh Behbahani and Fooladi, 2018) به‌منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد و توانایی انتشار تـرکـیـبـات ضـدمیکروبی اسـانس گلپر از فیلم زیسـت‌تخریب‌پذیر به‌وسـیله اندازه‌گیری هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید.

- بسته‌بندی نان پیتا در فیلم زیست تخریب‌پذیر

نـان پیتـا در کارگاه تولید نان تهیه گردید. برای تهیه خمیر ابتـدا شـکر (۱ درصـد)، نمـک (٤ درصـد)، بهبوددهنده (۰/۵ درصـد)، مخمر نانوایی (۲ درصـد) با همدیگر مخلوط شـدند. آب به مخلوط اضـافه و بعد از اختلاط کامل آب و آرد ۸ درصد روغن به آن اضافه شد. پس از تشکیل توده فرم‌پذیر خمیر، استراحت اولیه نمونه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. سـپس قطعاتی از خمیر به وزن تقریبی ٦٥٠ گرم چانه‌گیری، و مجدداً پس از ۱۰ دقیقـه اسـتراحت تخمیر میانی انجام شـد. در نهایت چـانـه‌هـای خمیر وارد اتـاقـک تخمیر گردید تا مرحله تخمیر نهایی در درجه حرارت ۳۰ درجه سـلسـیوس و رطوبت نسـبی ۸۰ درصـد به‌مدت ٦٠ دقیقه انجام شـد. چـانـه‌هـای نـان وارد فر گردان بـا دمـای ۲۰۰ درجـه سـلسـیوس گردید. بعد از اتمام عملیات پخت نان‌ها، نان‌ها بدون تماس مسـتقیم دسـت و توسـط چنگک استریل داخل کیسه‌های استریل قرار داده شدند و سریعاً بـه آزمـایشـگاه منتقل گردیدند. نان مورد نظر به ابعاد ۸×۸×۸ سانتی‌متر بریده شد و در فیلم زیست‌تخریب‌پذیر با بیشترین خاصیت ضدمیکروبی بسته‌بندی گردید و در به‌مدت ۹ روز در دمای ۲۵ درجه سـلسـیوس و رطوبت ۷۵ درصد نگهداری شدند.

- آزمون‌های میکروبی

شـمارش کپک و مخمر با محیط سـابورود دکستروز براث و محیط کشـت YGC به روش کشـت سـطحی به‌مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سـلسـیوس انجام شـد (ISIRI, 2395/1993).آزمون شـمـارش کلی میکروارگانیسم‌ها، با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگـار و پورپلیـت به مدت ٤٨ سـاعت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انجام گرفت (ISIRI, 5272/2007).

- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با کمک نرم‌افزار مینی‌تب ١٦ (Minitab) با ۹۵ درصد اطمینان استفاده شد.

یافته‌ها

- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی

نتایج به‌دست آمده از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس گلپر روی رشد دو کپک *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* در جدول (۲) آمده است. حداقل غلظت مهارکنندگی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* برابر با ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر بود. اما حداقل غلظت کشندگی *پنی‌سیلیوم* ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و *آسپرژیلوس* ۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود ($p < ۰/۰۵$).

جدول (۲)- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی (µg/ml) اسانس گلپر روی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

نوع باکتری	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی
آسپرژیلوس نایجر	۱۲۵۰[a]	۶۲۵[b]
پنی‌سیلیوم اکسپانسوم	۱۲۵۰[a]	۱۲۵۰[a]

a و b: حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون است.

- بررسی نفوذ به بخارآب، حلالیت و جذب آب فیلم‌ها

ارزیابی خصوصیات نفوذ بخارآب (متر/ثانیه)، درصد حلالیت، درصد جذب فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه غلظت‌های مختلف پلی وینیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر در جدول (۳) آمده است.

نتایج نشان داد با افزایش غلظت ژلاتین و کاهش میزان پلی وینیل استات در فیلم حاوی اسانس گلپر میزان نفوذپذیری به بخارآب، حلالیت و جذب آب به‌صورت معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) افزایش یافت. بالاترین میزان نفوذ بخارآب (متر/ثانیه)، درصد حلالیت و درصد جذب آب در میان فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی اسانس گلپر متعلق به تیمار حاوی (۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۱۰۰ درصد ژلاتین) و پایین‌ترین میزان متعلق به تیمار حاوی (۱۰۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۰ درصد ژلاتین) بود.

جدول (۳)- نتایج بررسی نفوذ بخارآب، حلالیت، جذب فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه غلظت‌های مختلف پلی وینیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر

پلی وینیل استات (درصد)	ژلاتین (درصد)	نفوذ بخارآب (m/s)	حلالیت (درصد)	جذب آب (درصد)
۱۰۰	۰	۰/۰۳±۰/۰[e]	۱۸/۵۸±۰/۸۱[f]	۷/۷۷±۱/۹۲[f]
۸۰	۲۰	۰/۰۳±۰/۰[d]	۲۷/۴۶±۰/۹۲[e]	۲۰/۰۰±۳/۳۳[e]
۶۰	۴۰	۰/۰۳±۰/۰[d]	۳۰/۸۵±۰/۸۵[d]	۳۸/۸۸±۱/۹۲[d]
۴۰	۶۰	۰/۰۳±۰/۰[c]	۳۵/۳۱±۰/۵۷[c]	۵۱/۱۱±۱/۹۲[c]
۲۰	۸۰	۰/۰۴±۰/۰[b]	۴۳/۷۱±۰/۶۰[b]	۷۰/۰۰±۳/۳۳[b]
۰	۱۰۰	۰/۰۴±۰/۰[a]	۵۱/۷۸±۰/۴۷[a]	۸۱/۱۱±۱/۹۲[a]

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده‌شده است.

a, b, c, d, e, f: حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

- بررسی نفوذ به اکسیژن و ضخامت فیلم‌ها

نتایج نفوذ اکسیژن و ضخامت فیلم‌های تهیه شده در جدول (٤) آمده است. طبق نتایج، با کاهش میزان پلی‌وینیل استات و افزایش ژلاتین میزان نفوذپذیری به اکسیژن به‌صورت معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) افزایش یافت. بالاترین میزان نفوذ اکسیژن به‌میزان ۱/۲٦٦ میلی‌اکی والان بر کیلوگرم متعلق به تیمار حاوی ۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۱۰۰ درصد ژلاتین و پایین‌ترین میزان (۰/۷۳۳ میلی اکی‌والان برکیلوگرم، متعلق به تیمار حاوی (۱۰۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۰ درصد ژلاتین بود. کاهش میزان پلی وینیل استات و افزایش ژلاتین میزان ضخامت فیلم اندکی افزایش یافت که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود.

بالاترین میزان ضخامت (۰/۱۵٦ میلی‌متر)، متعلق به تیمار حاوی (۱۰۰ درصد ژلاتین) و تیمار حاوی (۲۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۸۰ درصد ژلاتین) و پایین‌ترین میزان (۰/۱۵۰ میلی‌متر)، متعلق به تیمار حاوی (۱۰۰ درصد پلی‌وینیل استات و ۰ درصد ژلاتین) بود.

جدول (٤)- نتایج بررسی نفوذ اکسیژن، ضخامت فیلم زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه غلظت‌های مختلف پلی وینیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر

پلی وینیل استات (درصد)	ژلاتین (درصد)	نفوذ اکسیژن (meq/kqr)	قطر (mm)
۱۰۰	۰	۰/۷۳±۰/۱۱^{d}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}
۸۰	۲۰	۰/۸۰±۰/۰۰^{cd}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}
٦۰	٤۰	۰/۹۳±۰/۱۱^{bcd}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}
٤۰	٦۰	۱/۰۰±۰/۰۰^{bc}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}
۲۰	۸۰	۱/۱۳±۰/۱۱^{ab}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}
۰	۱۰۰	۱/۲٦±۰/۱۱^{a}	۰/۱۵±۰/۰۰^{a}

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

a, b, c, d: حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

- خاصیت ضدمیکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی اسانس گلپر

نتایج به‌دست‌آمده از هاله مهاری اسانس گلپر در برابر *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* در جدول (۵) آمده است. بالاترین قطر هاله مهاری روی *آسپرژیلوس* متعلق به تیمار حاوی ٤۰ درصد پلی ونیل استات و ٦۰ درصد ژلاتین و پایین‌ترین میزان هاله عدم رشد متعلق به تیمار حاوی ۱۰۰ درصد ژلاتین و تیمار حاوی ۱۰۰ درصد پلی ونیل استات بود. بنابراین تیمار دارای بالاترین خاصیت ضدمیکروبی به‌عنوان فیلم بهینه برای بسته‌بندی نان پیتا انتخاب گردید.

جدول (۵)- نتایج بررسی هاله عدم رشد (میلی‌متر) اسانس گلپر بر رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

پلی وینیل استات (درصد)	ژلاتین (درصد)	قطر هاله عدم رشد (mm)	
		آسپرژیلوس نایجر	*پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*
۱۰۰	۰	۵/۶۶±۰/۵۷^{b}	۷/۳۳±۰/۵۷^{c}
۸۰	۲۰	۶/۶۶±۰/۵۷^{ab}	۸/۳۳±۰/۵۷^{bc}
۶۰	۴۰	۷/۰۰±۰/۰۰^{ab}	۹/۰۰±۰/۰۰^{ab}
۴۰	۶۰	۷/۳۳±۰/۵۷^{a}	۱۰/۳۳±۰/۵۷^{a}
۲۰	۸۰	۶/۳۳±۰/۵۷^{ab}	۹/۶۶±۰/۵۷^{ab}
۰	۱۰۰	۵/۶۶±۰/۵۷^{b}	۸/۶۶±۰/۵۷^{bc}

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده‌شده است.

a, b, c: حروف متفاوت کوچک نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

- ارزیابی ویژگی‌های میکروبی نان پیتا

تغییرات میزان کپک و مخمر و شمارش کلی نان پیتا بسته‌بندی شده توسط فیلم بهینه و شاهد در جدول (۶) آمده است. طی زمان نگهداری میزان کپک و مخمر و شمارش کلی در هر دو نمونه نان پیتا روند افزایشی داشت. این افزایش در نان پیتا بسته‌بندی‌شده با فیلم بهینه روند کندتری داشت. به‌طوری‌که پس از ۹ روز نگهداری بالاترین میزان کپک و مخمر و شمارش کلی به‌ترتیب ۳۵ و ۴۲۰ CFU/g در نان پیتا بسته‌بندی شده بسته‌بندی معمولی و پایین‌ترین میزان کپک و مخمر و شمارش کلی به‌ترتیب ۱۵ و ۲۷۰ CFU/g در نان پیتا بسته‌بندی‌شده توسط فیلم بهینه مشاهده شد.

جدول (۶)- نتایج تغییرات جمعیت (CFU/g) کپک و مخمر و شمارش کلی نان پیتا بسته‌بندی‌شده توسط فیلم بهینه (پلی وینیل استات ۴۰ درصد و ژلاتین ۶۰ درصد حاوی اسانس گلپر) و شاهد

آزمون	نوع بسته‌بندی	زمان نگهداری (روز)			
		۱	۳	۵	۹
کپک و مخمر	معمولی	۰/۰۰±۰/۰۰^{aD}	۵/۰۰±۱/۰^{aC}	۲۰±۲/۱۴^{aB}	۳۵±۷/۲۸۱^{aA}
	فیلم زیست‌تخریب‌پذیر	۰/۰۰±۰/۰۰^{aC}	۰/۰۰±۰/۰^{bC}	۵±۱/۰۰^{bB}	۱۵±۱/۰۷۱^{bA}
شمارش کلی	معمولی	۰/۰۰±۰/۰۰^{aC}	۰/۰۰±۰/۰ ^{aC}	۲۹۰±۱۶/۵۷^{aB}	۴۲۰±۳۳/۵۷^{aA}
	فیلم زیست‌تخریب‌پذیر	۰/۰۰±۰/۰۰ ^{aC}	۰/۰۰±۰/۰ ^{aC}	۲۴۰±۱۱/۴۳^{bB}	۲۷۰±۱۹/۲۸^{bA}

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

a, b: حروف کوچک نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشد.

A,B, C, D: حروف متفاوت بزرگ نشانگر اختلاف معنی‌دار در هر سطر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس گلپر روی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* نشان داد اسانس گلپر می‌تواند اثر معنی‌داری بر مهار رشد دو کپک مذکور داشته باشد. بیش از ۵۰ درصد ترکیبات اسانس گلپر را ترپن‌های

اکسیژن‌دار تشکیل می‌دهند که می‌تواند دلیل خاصیت ضدقارچی آن باشد. مطالعات نشان داده که هر چه درصد ترپن‌های اکسیژنه در اسانس بالاتر باشد، خاصیت ضدقارچی اسانس‌ها بیشتر می‌شود.

در تحقیقی حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه روی *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* را به‌ترتیب ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت‌کشندگی اسانس را به‌ترتیب ٦٤ و ۲۵٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021). ارزیابی نتایج هاله عدم رشد نشان داد همه فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی اسانس گلپر دارای ویژگی‌های ضدمیکروبی متفاوتی روی کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* هستند. علت این تفاوت می‌تواند مربوط به نیروهای دافعه و جاذبه موجود بین ماده ضدمیکروبی و لایه فیلم باشد که می‌تواند ضریب انتشار را تحت تأثیر قرار دهد (Nateghi, 2017).

رفتارهای ضدمیکروبی متفاوت اسانس‌های روغنی بستگی به حلالیت آن‌ها در آب، ماتریکس مورد استفاده و ویژگی‌های چربی‌دوستی اسانس‌های روغنی دارد. ماهیت آب‌گریز اسانس‌های روغنی توانایی عبور از غشاء سلولی و میتوکندری را به آن‌ها می‌دهد لذا عبور بیشتر یون‌های H^+ و K^+ و تبادل یونی منجر به شکست ترکیبات سلولی و در نهایت مرگ سلول می‌شود (Van Long *et al*., 2016). در مطالعه‌ای گزارش کردند اثر ضدمیکروبی اسانس گلپر روی *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به ترکیبات ضدقارچی آمفوترسین، نیستاتین و کتوکونازول به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بوده است. آن‌ها علت این نتیجه را وجود ترکیبات فنلی نظیر آنتول، ترپینولن، ژرانیول، تیمول و کارواکرول در اسانس گزارش کردند (Hemati *et al*., 2010). در مطالعه دیگری گزارش کردند اسانس دارچین اثرات ضدکپکی یکسانی روی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم ایسلندیکوم* دارد و فعالیت ضدکپکی اسانس‌های روغنی در نتیجه وجود بسیاری از ترکیبات است که به‌صورت هم‌افزا عمل می‌نمایند و نسبت دادن فعالیت ضدکپکی به یک ترکیب یا گروهی از ترکیبات دشوار است (Ownagh *et al*., 2010). در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر عصاره اتانولی بره‌موم بر ویژگی‌های ضدمیکروبی فیلم مرکب نشاسته- ژلاتین و پلی وینیل الکل پرداختند و مشاهده گردید افزودن عصاره به فیلم مرکب حاوی نشاسته- ژلاتین و پلی وینیل الکل به‌طور معنی‌داری باعث افزایش قطر هاله عدم رشد می‌شود (Abedi *et al*., 2019). نتایج نشان داد با افزایش درصد ژلاتین میزان نفوذپذیری نسبت به بخارآب، حلالیت، جذب آب فیلم، نفوذپذیری به اکسیژن و میزان ضخامت فیلم‌ها افزایش یافت. از ویژگی‌های مهم پلی وینیل استات سطوح غنی از گروه‌های هیدروکسیلی دارند، با برقراری پیوند هیدروژنی، مولکول‌های آب را جذب می‌کنند و از سرعت انتشار آن می‌کاهند (Silvério *et al*., 2013). ظرفیت نهایی نفوذپذیری بخارآب به خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی تمامی ترکیبات افزوده شده به فیلم وابسته است و باعث بالا رفتن ارتباط سطحی ماتریکس و اسانس می‌شود. این پدیده مانع از بروز فعل‌وانفعال بین زنجیره‌های ژلاتین و مولکول آب می‌شود و در نتیجه مولکول‌های آب آزادانه از طریق فیلم منتقل و درصد نفوذپذیری بخار آب افزایش می‌یابد (Hong *et al*., 2009). ژلاتین یک ماده آب‌دوست است

و به‌شـدت با مولکول‌های آب پیوند برقرار می‌کند، این موضـوع باعث افزایش انتقال بخارآب از طریق فیلم‌های حـاوی مقـادیر بالاتر ژلاتین می‌شـود (Zhang *et al.*, 2007). علت افزایش نفوذپذیری به اکسیژن در فیلم‌های زیسـت‌تخریـب‌پذیر با کاهش میزان پلی وینیل الکل و افزایش میزان ژلاتین می‌تواند مربوط به حضور گروه‌های هیدورکسـیل در پلی وینیل الکل باشد که نسبت به نفوذ به حلال‌ها و اسـانس‌های روغنی مقاوم است و می‌تواند مـانند یک بازدارنده قوی در برابر ورود اکسـیژن عمل نماید (Paralikar *et al.*, 2008). بنابراین با کاهش میزان پـلـی وینیـل الکـل و افزایش میزان ژلـاتین در فیلم زیست‌تخریب‌پذیر موانع مربوط به ورود اکسیژن کاهش می‌یابد (Zeppa *et al.*, 2009). نفوذپذیری نسـبت به اکسـیژن افزایش می‌یابد (Heydari *et al.*, 2017). به بررسـی خواص کاربردی و ضـدمیکروبی فیلم‌های ترکیبی نشـاسته کاساوا و ژلاتین گاوی تقویت‌شده با نانو دی‌اکسـید تیتانیوم پرداختند و گزارش کردند با افزایش غلظـت نـانو دی‌اکسـید تیتانیوم، میزان نفوذپذیری به اکسـیژن کاهش معنی‌داری پیدا کرد. ضخامت فیلم روی ویژگی‌های ممانعتی، مکانیکی و همچنین شـفافیت فیلم مؤثر اسـت (Kurt and Kahyaoglu, 2014). نتـایج ضـخامت فیلم نشـان داد ضخامت فیلم‌ها در اثر افزودن ژلـاتین انـدکی افزایش یـافـت. ژلاتین به‌دلیل دارا بودن خاصـیت آب‌دوسـتی بالا با تعداد زیادی از مولکول‌های آب پیونـد هیـدروژنی برقرار کرده و بـاعـث افزایش ضـخامت فیلم می‌شـود (Salarbashi *et al.*, 2013). از طـرفـی دیـگـر افـزایـش ضـخـامـت در فیلم‌هـای زیسـت‌تخریـب‌پـذیر می‌تواند مربوط به افزایش زبری سـطحی در فیلم‌های زیسـت تخریب باشد. بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف گلیسرول بر ویژگی‌های فیلم بر پایه پلی وینیل اسـتات و صـمغ قدومه شـیرازی نشـان داد افزایش غلظـت گلیسـرول بـه‌طور معنی‌داری بـاعـث ضـخامت فیلم‌ها گردید (Monjazeb Marvdashti *et al.*, 2017).

بررسـی نتایج شمارش کپک و مخمر و شمارش کلی میکروارگـانیسـم‌هـا در نمونـه‌هـای نان پیتا طی ۹ روز نگهداری نشـان داد تعداد کپک و مخمر و شمارش کلی در نان پیتا بسـته‌بندی‌شـده در فیلم بهینه به‌صـورت معنی‌داری کمتر از نان بسـته‌بندی‌شـده در پلی‌اتیلن بود. علت آن می‌تواند مربوط به تأثیر ترکیبات ضـد میکروبی موجود در اسـانس گلپر نظیر اکیـل بوتـانوات (۳۶/۸۲ درصـد)، هگزیل بوتانوات (۱۶/۰۸ درصـد)، ۱-اکتانول (۱۳/۶۲ درصـد) و اکتیل هگزانوات (۸/۱۰ درصـد) در فیلم زیسـت‌تخریب‌پذیر باشـد که رشد کپک و مخمر و شـمـارش کلی را در نان پیتا به تأخیر انداخته اسـت (Miladinovic *et al.*, 2013). از طرفی چون بسته‌بندی پلی‌اتیلنی نسبت به بسته‌بندی حاوی ژلاتین و پلی وینیل الکـل رطوبـت را زیـاد نگـه می‌دارد بنابراین زمینه برای رشـد کپک و میکروب‌ها فراهم‌تر اسـت (Kechichian *et al.*, 2010). یـافتـه‌های مطالعه‌ای در زمینه فیلم‌های فعال پلی‌پروپیلن حاوی ۸ درصـد تیمول و کارواکرول نشان داد، آزادسازی آهسته کارواکرول و تیمول در طول دوره ماندگاری به درون فضـای بسته‌بندی (فضای خالی بـالـای بسـتـه) دلیـل اصـلی برای بروز ویژگی‌هـای ضـدمیکروبی این نوع بسـته‌بندی می‌باشـد. آن‌ها گزارش کردند آزادسـازی آهسـته اسانس‌ها از پلیمر به سطح نان بسیار مؤثرتر از افزودن مستقیم ترکیبات ضد میکروبی به داخل نان می‌باشـد، ضمناً غلظت اسانس با این روش در

طول دوره ماندگاری نان در سطح بالا حفظ می‌شود (Ramos *et al*., 2013). در مطالعه دیگری مشخص شد فیلم‌های گلیادین حاوی ۵ درصد سینام آلدهید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس باعث افزایش مدت‌زمان ماندگاری نان تا ۲۷ روز گردیده است. در حالی‌که در نان‌های بسته‌بندی‌شده با پوشش معمولی مدت‌زمان نگهداری ٤ روز بوده است (Balaguer *et al*., 2013).

با توجه به نتایج مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که پلی ونیل استات به‌عنوان یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر با کارایی قابل‌قبول دارای مصارف متعددی است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی است. از سوی دیگر به‌منظور بهبود ویژگی‌های کاربردی آن می‌توان از موادی مانند ژلاتین که دارای خاصیت‌هایی مانند حلالیت در آب، نفوذپذیری به بخارآب استفاده کرد و با افزودن مواد فعال استخراج‌شده از گیاهان طبیعی مانند اسانس گلپر نیز می‌توان کارایی ضدمیکروبی این نوع بسته‌بندی‌ها را تقویت نمود هدف کلی این پژوهش تهیه فیلم ترکیبی پلی ونیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر برای اولین بار، با ویژگی‌های مناسب فیلم برای بسته‌بندی نان بود که به دنبال آن بسته‌بندی با بهترین ویژگی‌های کاربردی تهیه گردد. استفاده از فیلم مذکور جهت بسته‌بندی نان علاوه بر کمک به حفظ محیط زیست باعث می‌شود نان پیتا طی دوره نگهداری در مقابل رشد کپک و مخمر و میکروارگانیسم‌ها بیشتر حفظ شود. در مجموع فیلم زیست‌تخریب‌پذیر حاوی پلی ونیل استات و ژلاتین حاوی اسانس گلپر به‌عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی می‌تواند جهت افزایش زمان نگهداری نان پیتا استفاده شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سرکار خانم دکتر امینی گرام برای مساعدت‌های بی‌دریغشان در انجام مراحل عملی پژوهش حاضر قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abedi, M.J., Esmailli, M. and Almasi, H. (2019). Investigation of the effect of propolis ethanolic extract on the physicochemical, microstructural, antioxidant and antimicrobial properties of starch-gelatin-polyvinyl alcohol blend film. Innovative Food Technologies, 6(4): 568-587. [In Persian]
- Alizadeh Behbahani, B. and Fooladi, A.A.I. (2018). Antibacterial activities, phytochemical analysis and chemical composition Makhlaseh extracts against the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. Microbial Pathogenesis, 114: 204-208.
- Azizkhani, M., Torian, F., and Beriri, M. (2016). Effects of *Ocimum basilicum* and *Salvia sclarea* essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus flavus* in Iranian white cheese. Iranian Food Science and Technology Research, 12(2): 286-295. [In Persian]
- Barreto, P.L.M., Pires, A.T.N. and Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. Polymer Degradation and stability, 79(1): 147-152.

- Barzegari Firouzabadi, F. and Mirhosseini, M. (2012). Effect of Persian hogweed (*Heracleum persicum*) on the morphological changes in mice testes and the level of hormone testosterone. Razi Journal of Medical Sciences, 19(99): 18-24. [In Persian]
- Balaguer, M.P., Lopez Carballo, G., Catala, R., Gavara, R. and Hernandez Munoz, P. (2013). Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. International Journal Food Microbiology, 166(3): 369-377.
- Bodini, R.B., Sobral, P.J.A., Favaro-Trindade, C.S. and Carvalho, R.A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. LWT-Food Science Technology, 51(1): 104-110.
- Barzegar, H. and Alizadeh, V. (2017). Characterization of physical, antioxidant and antimicrobial properties of biodegradable soluble soybean polysaccharide films containing *Satureja hortensis* essential oil. Iranian Food Science and Technology, 71(14): 35-45. [In Persian]
- Chang, R., Jian, R., Yu, J. and Ma, X. (2009). Fabrication and characterization of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. Journal of Food Chemistry, 120(3): 736–740.
- Gandomi, H., Misaghi, A., Akhondzadeh Basti, A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A., *et al*. (2009). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. Food Chemistry and Toxicology, 47(10): 2397-2400.
- Hong, Y.H., Lim, G.O. and Song, K.B. (2009). Physical properties of gelidium corneum-gelatin blend films containing grape fruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. Journal of Food Science, 74(1): 6-10.
- Hemati, A., Azarnia, M. and Angaji, A.H. (2010). Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). Middle-East Journal Science Research, 5(3): 174-176.
- Heydari, A., Samimi Hashjin, F. and Mohammadi Nafchi, A. (2017). Study of the functional and antimicrobial properties of combined cassava starch and bovine gelatin films reinforced with nano titanium dioxide. Journal of New Food Technologies, 5(3): 373-384. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2007). Method for counting molds and yeasts. ISIRI No. 997. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2007). Microbiology of food and animal feed - a comprehensive method for the general enumeration of microorganisms. ISIRI No. 5272. [In Persian]
- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P. and Tadini, C.C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. LWT - Food Science and Technology, 43(7): 1088-1094.
- Kurt, A. and Kahyaoglu, T. (2014). Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. Carbohydrate Polymers, 104: 50-58.
- Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L. and Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. Journal of Food Engineering, 98(3): 294-301.
- Majdzadeh-Ardakani, K. and Nazari, B. (2010). Improving the mechanical properties of thermoplastic starch/poly (vinyl alcohol)/clay nanocomposites. Composites Science and Technology, 70(10): 1557-1563.
- Miladinovic, D.L., Ilic, B.S., Mihajilov Krstev, T.M., Nikolic, D.M., Cvetkovic, O.G., Markovic, M.S., *et al*. (2013). Antibacterial activity of the essential oil of *Heracleum sibiricum*. Natral product communication, 8(9): 1309- 1311.
- Monjazeb Marvdashti, L., Yavarmanesh, M. and Koocheki, A. (2017). The effect of different concentrations of glycerol on properties of blend films based on polyvinyl alcohol-allysumhomolocarpum seed gum. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 12(5): 663- 677.

- Nateghi, L. (2017). Investigation of the quantity and release of nisin used in corn husk film on population reduction of *Micrococcus luteus*. Quarterly Journal of New Food Technologies, 4(16): 123-141. [In Persian]
- Ownagh, A., Hasani, A., Mardani, K. and Ebrahimzadeh, S. (2010). Antifungal effects of thyme, Agastache and Satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. Veterinary Research Forum, 1(2): 99-105.
- Paralikar, S.A., Simonsen, J. and Lombardi, J. (2008). Poly (vinyl alcohol)/cellulose nanocrystal barrier membranes. Journal of Memberane Science, 320(1-2): 248-258.
- Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A. and Martucci, J.F. (2011). Chitosangelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. Food Hydrocolloids, 25(5): 1372- 1381.
- Ramos, M., Beltran, A., Valdes, A., Peltzer, M., Jimenez, A., Garrigos, M., *et al*. (2013). Active packaging for fresh food based on the release of carvacrol and thymol. Chemistry and Chemical Technology, 7(3): 295-303.
- Rezayan, A. and Ehsani, A. (2015). Evaluation of the chemical compounds and antibacterial properties of the aerial parts of Persian *Heracleum persicum* essence. Journal of Babol University Medical Science, 17(6): 26-32. [In Persian]
- Romero-Bastida, C.A., Bello-Perez, L.A., Garcia, M.A., Martino, M.N., Solorza-Feria, J. and Zaritzky, N.E. (2005). Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches. Carbohydrate Polymers, 60(2): 235–244.
- Rahmati-Joneidabad, M. and Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the antifungal effect of *Froriepia subpinnata* essential oil on *Aspergillus niger* (black mold) and *Botrytis cinerea* (gray mold) grape poisoning agent: A study "in vitro". Iranian Food Science and Technology, 17(108): 75-83.
- Srinivasa, P., Ramesh, M., Kumar, K. and Tharanathan, R. (2003). Properties and sorption studies of chitosan– polyvinyl alcohol blend films. Carbohydrate Polymers, 53(4): 431-438.
- Silvério, H.A., Neto, W.P.F. and Pasquini, D. (2013). Effect of incorporating cellulose nanocrystals from corncob on the tensile, thermal and barrier properties of poly (vinyl alcohol) nanocomposites. Journal of Nanomaterials, 142: 126-136.
- Sedaghat Boroujeni, L., Hojat eslami, M., Keramat, J. and Ghasemi Pirbalouti, A. (2013). Antioxidant effect of Snow Angelica (*Heracleumlasiopetalum Boiss*) essential oil on chemical properties of potato chips. Journal of Herbal Drugs, 3(4): 249-256. [In Persian]
- Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R., *et al*. (2013). Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. Food Chemistry, 146: 614-622. [In Persian]
- Shen, Z., Ghasemlu, M. and Kamdem, D.P. (2015). Development and compatibility assessment of new composite film based on sugar beet pulp and polyvinyl alcohol intended for packaging applications. Journal Applied Polymer Science, 132(4): 41354.
- Van Long, N.N., Joly, C. and Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. International Journal of Food Microbiology, 220, 73–90.
- Zhang, S., Wang, Y., Herrlng, J.L. and OH, J.H. (2007). Characterization of edible film fabricated with channel catfish gelatin extract using selected pretreatment methods. Journal of Food Science, 72(9): 498-503.
- Zeppa, C., Gouanve, F. and Espuche, E. (2009). Effect of a plasticizer on the structure of biodegradable starch clay nanocomposites: thermal, water sorption, and oxygen barrier properties. Journal of Applied Polymer Science, 112(4): 2044-2056.