

بررسی ویژگی‌های مکانیکی، فیزیکی و ضد میکروبی فیلم زیست تخریب پذیر غنی شده با اسانس میخک حاصل از فلس ماهی سفید

عباس مهجوریان^۱، محمدرضا سعیدی اصل^{۲*}، مسعود رضایی^۳، سیدعلی مرتضوی^۴، پیمان آریایی^۵

۱. دانش آموخته دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

۳. استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۴. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۵. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: mrezasaeidi@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۷ پذیرش نهایی: ۹۷/۲/۱۲)

چکیده

فرآورده‌های جانبی حاصل از عمل‌آوری ماهی، منبع مناسبی از کلاژن می‌باشد. فیلم پروتئینی زیست تخریب‌پذیر از طریق افزودن اسانس میخک در غلظت‌های ۰،۱/۰،۵ و ۱/۵ درصد (نسبت وزنی به وزنی پروتئین) به ژلاتین فلس ماهی سفید ساخته شده و خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی شامل مقاومت کششی، درصد افزایش طول، درصد رطوبت، نفوذپذیری به بخار آب، زاویه تماس، حلالیت و ویژگی‌های رنگ سطحی و آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی فیلم‌ها بررسی شد. فیلم‌های ژلاتینی بر اساس غلظت‌های مختلف اسانس میخک تهیه و مورد آزمون قرار گرفتند. همراهی اسانس میخک در محدوده ۰ تا ۱/۵ درصد، میزان مقاومت کششی فیلم‌ها را کاهش داد. نفوذپذیری به بخار آب با بیشتر شدن میزان اسانس میخک از ۰/۵ درصد افزایش یافت. از طرفی دیگر، حلالیت فیلم و شاخص روشنایی کاهش پیدا نمود، بنابراین با افزودن اسانس میخک، میزان عبور نور در محدوده مرئی کمتر گردید. فیلم‌های غنی شده با اسانس میخک، تأثیر ممانعت‌کنندگی وابسته به دوز را در برابر استافیلوکوکوس آرتوس، لیستریا مونوسایتوژنز و اشریشیا کولای از خود نشان دادند. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی ایجاد شکاف‌های ریز در فیلم‌های غنی شده با اسانس را مشخص نمود، عاملی که در ایجاد خصوصیات فیزیکی فیلم‌های به‌دست آمده نقش مهمی را ایفا می‌کند. فیلم‌های ژلاتینی غنی شده با اسانس میخک، می‌تواند در بسته‌بندی فعال مورد استفاده قرار گرفته، اما خصوصیات آن باید اصلاح شود. فیلم ژلاتینی حاوی ۱ درصد اسانس میخک دارای بهترین خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی بود.

واژه‌های کلیدی: کولاژن، فیلم زیست تخریب‌پذیر پروتئینی، ژلاتین فلس ماهی سفید، فعالیت ضد میکروبی

مقدمه

ژلاتین به‌عنوان با ارزش‌ترین ترکیبات پروتئینی بوده که با داشتن خصوصیات منحصر بفرد، دارای کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، دارویی، پزشکی و بهداشتی می‌باشد ژلاتین در صنایع غذایی در تولید ژله‌های قنادی، بستنی، ماست، شربت‌های طعم‌دار و سوپ‌های کنسرویکاربرد دارد از نظر تکنولوژیکی در محصولات مختلف، باعث افزایش الاستیسیته، قوام و پایداری می‌شود (Gilsenan and Murphy, 2000). تاریخچه تولید ژلاتین در امریکا به سال ۱۸۵۰ برمی‌گردد، اما پس از آن‌که در سال ۱۹۳۰ پوست خوک نیز جزء مواد اولیه به‌کار گرفته شد، رشد چشم‌گیری پیدا نمود (Reppond and Wasson, 1993). ژلاتین گونه‌های ماهی دارای خصوصیات متفاوتی هستند. آن‌ها نقطه ذوب و دمای ژلاتیناسیون پایین‌تری نسبت به ژلاتین پستانداران دارند (Gomez-Gullian *et al.*, 2002). با این وجود، برخی از ژلاتین‌های دریایی، ویسکوزیته بیشتری را نسبت به ژلاتین پستانداران نشان دادند (Leuenberger, 1991). کلاژن به‌عنوان یک ترکیب غالب در پوست ماهیان می‌باشد. این ترکیب در پوست، استخوان و فلس ماهیان به مقدار زیادی وجود دارد. تقاضا برای ژلاتین و کلاژن در صنایع مختلف به‌طور قابل توجهی در حال افزایش است. فراورده‌های جانبی ماهی دارای پتانسیل بالایی از نظر کلاژن هستند. اگر چه اکثر ژلاتین ماهیان دارای استحکام ژل (Gel strength) بالایی نیستند، اما می‌توانند در ریز پوشینه کردن (Microcapsulation) طعم‌ها و ویتامین‌ها و فیلم‌های خوراکی مورد استفاده قرار گیرند. فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی می‌توانند از انواع گسترده‌ای از مواد خام شامل هیدروکلوئیدها (پلی

ساکاریدها، پروتئین‌ها)، چربی‌ها و کامپوزیت (ترکیبی ساخته شده از دو طبقه قبلی) تهیه شوند که در بسیاری از موارد فرآورده‌های جانبی صنایع مختلف هستند. پوشش‌ها یا مستقیماً برای نگهداری ماده غذایی به‌کار گرفته می‌شوند و یا فیلم‌هایی از آن‌ها ساخته می‌شود که برای بسته‌بندی سطح غذا استفاده می‌شوند. اسانس‌های گیاهی از جمله ترکیبات طبیعی هستند که خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی آن‌ها توسط محققین مختلف به اثبات رسیده است. این دسته از مواد، حاوی ترکیبات مؤثری هستند که نحوه عملکرد آن‌ها در سلول باکتری اختصاصی است. به‌نظر می‌رسد فعالیت ضد میکروبی آن‌ها اساساً به دلیل ماهیت آب‌گریزشان باشد. بنا براین به‌کارگیری این ترکیبات طبیعی در صنایع غذایی می‌تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های مصنوعی باشد، اما هزینه به‌کارگیری و دیگر مشکلات از قبیل شدت بو، سمیت بالقوه، انتشار غیرکنترل شده این مواد به داخل فرآورده‌های غذایی و هم‌چنین غیرفعال شدن بخشی از ترکیبات فعال آن‌ها به دلیل واکنش با مواد غذایی، استفاده از این ترکیبات را در بخش نگهداری غذا محدود می‌کند. یک استراتژی جالب برای کاهش دوز مصرفی اسانس با حفظ اثر بخشی آن‌ها می‌تواند همراهی این ترکیبات طبیعی با فیلم‌های خوراکی باشد (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011). اضافه کردن اسانس به پوشش‌های خوراکی به آن‌ها ویژگی ضد میکروبی و ضد اکسیدانی می‌بخشد. گیاه میخک حاوی ترکیبات شیمیایی صمغ-تانن به‌مقدار ۳-۱۰ درصد موم، ماده‌ای قابل تبلور، بدون رنگ و بو به‌نام کاریوفیلن و نیز اسانس میخک می‌باشد. ترکیبات اسانس میخک را، پروپیلن گلیکول (۱۹/۲۹٪)،

بنزوتیوفن (۱۷/۶۷٪) و بتاکاریوفیلن (۸/۰۱٪) را تشکیل می‌دهند. اسانس میخک حاوی مقادیر بالایی از اوژنول (*Eugenol*) (۲۸/۲۹٪) بوده که ۱ درصد آن را استیل اوژنول تشکیل داده و ارزش تجاری اسانس میخک نیز بستگی به مقدار درصد همین ماده دارد (Burt, 2004). بهترین نوع اسانس، اسانسی است که از غنچه‌های ناشکفته میخک به دست می‌آید. اسانس میخک دارای بویی قوی و کمی مطبوع بوده و طعمش کمی سوزاننده می‌باشد (Chaieb et al., 2007). قرار گرفتن این ترکیب در مقابل هوا باعث تیرگی رنگ و تغلیظ آن می‌شود. با توجه به این که ژلاتین ماهی به عنوان یک جایگزین بهتر برای ژلاتین‌های طیور و پستانداران از نقطه نظرهای اخلاقی و مذهبی است.

به همین دلیل تعداد زیادی از گونه‌های ماهیان مختلف به عنوان ماده خام برای استخراج ژلاتین مورد بررسی قرار گرفته‌اند و ویژگی‌های ژلاتین‌های استخراج شده از این منابع هم مورد آزمایش قرار گرفته است. خصوصیات رئولوژیکی ژلاتین استخراج شده از پوست فیل ماهی ایرانی مورد بررسی قرار گرفت (Mahjoorian et al., 2013). ترکیب پلی فنول چای بار شده بر روی نانو ذرات کیتوزان به مقدار زیادی مقاومت کششی (TS) و نفوذپذیری در برابر اکسیژن (OP) فیلم ژلاتین را کاهش داده، اما نفوذپذیری بخار آب (WVP) افزایش یافت و بر روی شفافیت فیلم اثر منفی گذاشت (Bao et al., 2009). بازدارندگی فیلم ژلاتینی غنی شده با اسانس میخک بر روی گروهی از باکتری‌ها در محیط کشت بررسی گردیده و مشخص گردید که فیلم ژلاتینی به تنهایی فاقد خاصیت ضد میکروبی بوده، ولی فیلم ژلاتینی حاوی اسانس میخک دارای خاصیت

بازدارندگی قوی بر روی باکتری‌های سودوموناس فلورونوسانس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لیستریا اینوکوا و اشیریشیاکولای می‌باشد، که میزان این تأثیر ضد میکروبی قوی‌تر از تأثیر فیلم ترکیبی ژلاتین-کیتوزان حاوی اسانس میخک بود (Gómez-Estaca et al., 2009). ماهی سفید از خانواده کپور ماهیان، یکی از انواع ماهی‌های شمال ایران بوده که در دریای خزر و رودخانه‌های استان‌های گیلان و مازندران یافت می‌شود. این ماهی از پایان بهار تا آغاز پاییز خم‌ریزی کرده، معمولاً با پوست مصرف و فلس آن بعد از پاک کردن آن دور ریخته می‌شود. این فلس دارای منبع خوبی از کلاژن بوده که می‌تواند در تولید استفاده گردد. طبق گزارش اداره شیلات استان مازندران در سال ۹۵، حدود ۵۰ میلیون ماهی سفید از دریای خزر صید شده که با در نظر گرفتن این مطلب که حدود ۸ درصد وزن ماهی سفید را فلس تشکیل دهد، حجم بالایی از ماده غنی از کولاژن سالانه بوجود آمده که می‌تواند در تولید ژلاتین از آن بهره جست. هدف این پژوهش، امکان‌سنجی تولید و بررسی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی حاصله از ژلاتین ماهی سفید غنی شده با اسانس میخک بود. تاکنون تحقیقی در مورد استخراج و بررسی خصوصیات فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های ژلاتینی حاصل از فلس ماهی سفید چاپ نشده است.

مواد و روش‌ها

- مواد

گلیسرول (Sigma-aldrich, USA)، توئین ۸۰ درجه مطلق کلسیم (Merck, Germany)، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Merck, Germany)، هیدروکسید سدیم (NaOH) (Merck, Germany)، اسانس میخک (باریچ اسانس، ایران)، محیط کشت برای هارت اینفوژن آگار (Brain heart infusion (BHI) agar (Merck, Germany)، محیط کشت مولر هیتتون آگار (Muller Hinton Agar) (Sharlu, Spain)، سرم فیزیولوژی ۹ درصد (موسسه رازی، ایران)، باکتری‌های استافیلوکوکوس آریوس (PTCC 1431)، سودوموناس اتروژینوزا (PTCC 1151)، اشرشیاکولای (PTCC 3315) و لیستریا مونو سائتوژنز (PTCC 1163). تمام معرف‌ها و محلول‌های شیمیایی، دارای درجه خلوص آزمایشگاهی (Analytical Grade) بودند.

- روش استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید

ابتدا فلس ماهی سفید از بازارهای محلی شهرستان محمودآباد تهیه گردیده، سپس با آب شسته و با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. سپس با آب فراوان، فلس‌ها کاملاً شستشو داده شده و در آب‌کش قرار گرفته تا آب از آن خارج گردد. در نهایت فلس‌ها در بسته‌های پلاستیکی منتقل و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در طول مدت آزمایشات نگهداری شدند. ابتدا فلس ماهی سفید از شب تا صبح در دمای ۵ تا ۷ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفت. سپس به نسبت ۱ به ۴ در محلول هیدروکسید سدیم ۰/۳ درصد در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه در دمای یخچال مورد تیمار قرار گرفت. هیدروکسید

سدیم باعث تجزیه ترکیبات غیرکلاژنی و رنگ‌دانه‌های روی فلس شد. بعد از این مرحله فلس‌ها متورم شده، در ادامه عملیات خنثی‌سازی با شستن فلس‌ها با آب فراوان (Top water) تا زمانی ادامه پیدا نموده که زمانی که به pH نمونه‌ها حدود ۸ برسد. عملیات معدنی‌زدایی با قرار دادن نمونه‌ها در محلول ۰/۴ مولار EDTA و به مدت ۳۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد عملیات استخراج ژلاتین از فلس ماهی سفید در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. در انتها محلول ژلاتینی به دست آمده، با عبور از پارچه توری و سپس از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ فیلتر نموده و در مرحله آخر عملیات خشک کردن با استفاده از آون تحت خلأ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تا زمانی که ورقه‌های ژلاتینی تشکیل گردد، ادامه یافت (Limpisophon et al., 2009).

- تهیه فیلم‌های ژلاتینی غنی شده با اسانس میخک

ابتدا پودر ژلاتین در غلظت ۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور انحلال بیشتر در آب غوطه‌ور گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت‌دهی شد. اسانس میخک به مقادیر مورد نظر به فیلم اضافه شده و سپس توئین ۸۰ (Tween 80) به میزان ۰/۲ درصد و گلیسرول به میزان ۰/۵ درصد به ترتیب به عنوان امولسی‌فایر و پلاستیسی‌سایزر به محلول فیلم‌ها افزوده گردیدند. در ادامه با استفاده از همورنیزاتور (ای کی ای، مالزی) محلول فیلم با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت دو دقیقه همگن‌سازی شده و نیز به منظور حباب‌گیری به مدت ۶ ساعت روی مگنت با سرعت کم قرار داده شد. محلول‌ها در پلیت‌های ۸ و ۱۵ سانتی‌متری به مدت ۳۲

$h \text{ m}^2$) طبق رابطه (۱) قابل محاسبه است. درون سلول‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و سپس سطح سلول به وسیله فیلم با استفاده از گریس پوشانده شد و سلول‌ها درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۱۰۰٪ ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل $2/337 \times 10^3$ پاسکال ایجاد می‌کند (McHughet al., 1993).

$$WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P} \quad (1)$$

میزان عبور بخار آب از فیلم WVTR (g mm/kPa h m^2) = میانگین ضخامت فیلم بر حسب میلی‌متر L - اندازه‌گیری ضخامت روکش‌ها
ضخامت روکش‌های تولید شده با استفاده از یک کولیس با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ضخامت روکش‌ها برای آزمایشات مکانیکی ضروری است (Hosseini et al., 2009).

- میزان حلالیت فیلم در آب (Film solubility in water)
ابتدا نمونه‌هایی از هر نوع فیلم (1×4 سانتی‌متر مربع) به دقت (۰/۰۰۰۱ گرم) وزن شده و در آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. فیلم‌ها دوباره توزین شده تا ماده خشک اولیه آن‌ها تعیین گردد (W_i). سپس فیلم‌ها در لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط غوطه‌ور شدند و با استفاده از یک شکر (۱۰۰ دور در دقیقه) مخلوط گردیدند. در ادامه محلول از

ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا خنک گردند (Gómez-Estaca et al., 2009).

-سنجش خواص فیلم‌های تولیدی

- تعیین ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها

به منظور تعیین خواص مکانیکی فیلم‌ها شامل استحکام کششی (Tensile strength) (MPa) و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی (Elongation at break) از روش آزمایش استاندارد ASTM D882-09 استفاده شد. ابتدا فیلم‌ها به مدت ۴۸ ساعت داخل رطوبت‌ساز با رطوبت 50 ± 4 ٪ قرار گرفتند. فیلم‌ها به شکل مستطیل به ابعاد 2×10 سانتی‌متر بریده شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵ سانتی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. نمونه‌ها در دستگاه یونیورسال با سرعت ۵ میلی‌متر بر دقیقه تحت بار ۶۰ نیوتن کشیده شدند. حداقل ۵ تکرار برای هر فیلم صورت گرفت. میانگین اعداد حاصله \pm انحراف معیار برای هر نمونه گزارش گردید.

- نفوذپذیری در برابر بخار آب (Water vapor permeability)

آزمون میزان عبور بخار آب فیلم‌ها بر طبق روش استاندارد ASTM E96/E96M-05 انجام شد. فیلم‌ها بر روی یک فنجان شیشه‌ای با قطر دهانه ۴۹ میلی‌متر حاوی ۶ میلی‌لیتر آب مقطر (رطوبت نسبی ۱۰۰٪) چسبانده شدند. سپس فنجان‌ها در داخل یک دسیکاتور محتوی سیلیکاژل (رطوبت نسبی تقریباً ۰٪) در دمای محیط قرار داده شدند و اجازه داده شد فیلم‌ها به مدت ۲ ساعت قبل از وزن کردن فنجان‌ها به تعادل برسند. سپس فنجان‌ها در فواصل ۲ ساعت طی ۱۰ ساعت وزن شدند. میزان نفوذپذیری در برابر بخار آب (g mm/kPa)

بر طبق این معادله مقادیر بالای T نشان دهنده شفافیت کم‌تر و درجه بالاتر تیرگی است.

- تعیین میزان آبدوستی

- آبگریزی فیلم‌ها

زاویه تماس (Contact angle analysis) (θ) سطح فیلم با استفاده از دستگاه سنجش زاویه تماس اندازه‌گیری شد. با کمک میکروسرنج (Micro syringe) در حدود ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر و بدون یون بر روی یک سطح افقی فیلم‌ها قرار داده شد. مقادیر زاویه تماس در طی مدت زمان ۱ دقیقه اندازه‌گیری شد. ۵ تکرار روی هر فیلم در دمای 23 ± 5 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Ojagh et al., 2010).

- ریخت‌شناسی (Morphology) فیلم‌ها

به‌منظور مشاهده مورفولوژی سطح (Surface) فیلم‌های تهیه شده، نوارهای باریکی از فیلم خشک شده در نیتروژن مایع غوطه‌ور و سپس به‌صورت دستی شکسته شد. تکه‌های فیلم به کمک چسب دوطرفه به نگهدارنده آلومینیومی (Aluminum stub) چسبانده شدند. پس از آن فیلم‌ها با لایه نازکی از طلا پوشانده شدند و سپس در داخل میکروسکوپ الکترونی روبشی قرار گرفتند. عملیات عکس‌برداری در پژوهشکده پلیمر و پتروشیمی ایران انجام گردید. برای پوشش‌دهی با طلا از روش کندو پاشی استفاده شد.

- سنجش خواص ضد میکروبی فیلم‌ها

به‌منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های تولیدی از روش نفوذ در محیط آگار استفاده گردید. به این منظور ابتدا یک لوپ از هر یک از ۴ گونه باکتری لیستریا مونوسایتوژنز، اشیریشیا کولای، استافیلوکوکوس ارئوس و سودوموناس اثرورینوزا برداشته شده و در

کاغذ صافی واتمن شماره ۱ که از پیش وزن شده بود، عبور داده شد تا ذرات حل نشده از محلول جدا گردد. سپس کاغذ صافی در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و مجدداً توزین گردید (W_f). درصد حلالیت فیلم با استفاده از رابطه (۲) تعیین شد.

$$FS\% = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100 \quad (2)$$

W_i = وزن فیلم خشک اولیه (گرم)

W_f = وزن فیلم خشک نهایی (گرم)

- مقدار رطوبت (Moisture content)

مقدار رطوبت به‌وسیله خشک کردن تکه‌های کوچکی از فیلم در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. وزن فیلم‌ها قبل و بعد از خشک کردن در آون ثبت شد. مقدار رطوبت به‌صورت درصد از دست رفتن وزن بر اساس وزن اولیه محاسبه گردید. ۳ تکرار برای هر نوع فیلم انجام شد و میانگین مقدار \pm انحراف معیار برای هر نمونه گزارش گردید.

- کدورت (Turbidity)

خواص دیواره‌ای فیلم‌ها در مقابل نور فرابنفش (UV) و نور مرئی در طول موج‌هایی با دامنه ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر تعیین شد. میزان کدورت فیلم‌ها با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد.

$$T = \text{Abs}600/x \quad (3)$$

که در آن T کدورت فیلم، Abs600 جذب در ۶۰۰ نانومتر و x ضخامت فیلم (میلی‌متر) است.

بازتاب نور شاخص‌های رنگی شامل L^* (روشنایی) a^* (سبزی) و b^* (زردی) اندازه‌گیری و یادداشت شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی از آزمون‌های فیزیکی و مکانیکی و ضدمیکروبی تیمارهای مختلف پس از کنترل نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogrov-Smirnov) توسط نرم‌افزار SPSS، به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر از تجزیه واریانس یک‌طرفه جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید. در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن نیز استفاده شد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل خطای مجاز برای رد H_0 ، ۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

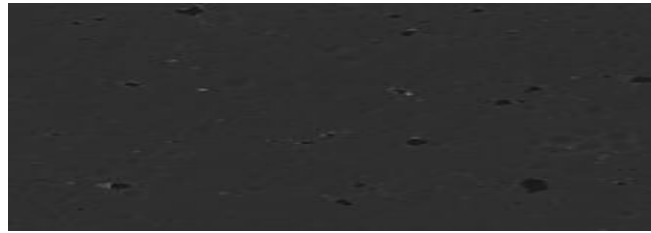
شکل (۱) الف و ب به ترتیب تصاویر میکروسکوپ الکترونی فیلم‌های ژلاتینی حاوی ۱/۵ درصد اسانس میخک و سطح فیلم ژلاتینی خالص (شاهد) را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود فیلم شاهد، سطحی صاف و بدون شکاف داشته، در حالی که فیلم حاوی ۱/۵ درصد اسانس میخک سطح فیلم دارای ترک (منفذ) بوده که ممکن است در نتیجه تبخیر اسانس در طول فرایند خشک کردن فیلم باشد. افزودن اسانس میخک تأثیر متفاوتی روی فیلم‌های تولیدی گذاشته، بدین صورت که نمای سطحی ژلاتین بعد از افزودن اسانس، دارای منافذ و ترک‌های ریز متعددی گردید. هم‌چنین از یک‌نواختی ساختار سطحی فیلم کاسته شد

لوله‌های حاوی ۱۰ سی سی محیط کشت BHI افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا تعداد باکتری‌ها به اندازه کافی افزایش یابد. سپس از طریق سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه محیط کشت از باکتری جدا گردید و از طریق میزان جذب با طیف‌سنج مری-فرابنفش تعداد باکتری‌ها به 10^8 رسانده شد. میزان جذب به‌عنوان شاخصی از بار باکتریایی استفاده گردید. به این صورت که پس از کشت جذب‌های مختلف مشخص گردید که جذب $0.1 - 0.08$ معادل 10^8 (سی‌اف‌یو بر گرم) بار باکتریایی است. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع حاوی هر باکتری بر روی محیط مولر هیتتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد. سپس دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر از فیلم‌ها که از قبل در شرایط استریل تهیه شده بود بر روی پلیت‌های دیگر قرار داده شدند. در نهایت پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. اختلاف قطر هاله‌های تشکیل شده از قطر دیسک‌ها به‌عنوان شاخص فعالیت ضدمیکروبی پوشش‌ها در نظر گرفته شد (Gómez-Estaca et al., 2010).

- سنجش رنگ فیلم‌های تولیدی

برای اندازه‌گیری رنگ نمونه‌های فیلم از دستگاه هانتربل (Hunter Lab, Color Flex, USA) استفاده شد. نمونه‌های فیلم در قطعات (۴×۴ سانتی‌متر مربع) برش داده شده و بر روی پلیت سفید رنگ استاندارد قرار داده شدند. رنگ‌سنج ابتدا با استفاده از صفحه سیاه و سفید کالیبره گردید و در ادامه نمونه‌ها به داخل دستگاه منتقل و مورد آزمون قرار می‌گیرند. بر اساس

که این موارد در ادامه باعث کاهش مقاومت مکانیکی و افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تولیدی شد.



(الف)



(ب)

شکل (۱) - (الف) فیلم ژلاتینی حاوی ۱/۵ درصد اسانس میخک؛ (ب) فیلم ژلاتینی خالص

تماس در فیلم‌های خالص ژلاتینی به میزان ۳۰/۹۲ درجه بوده و این مقدار با افزایش غلظت اسانس میخک روند افزایشی نشان داد ($p < 0/05$). بیشترین میزان زاویه تماس در فیلم ژلاتینی حاوی ۱/۵ درصد اسانس به میزان ۴۸/۳۴ درجه اندازه‌گیری شد. درصد حلالیت در فیلم شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از فیلم‌های ژلاتینی حاوی درصد‌های مختلف اسانس بود ($p < 0/05$). به طوری‌که این میزان در فیلم‌های خالص ژلاتینی به میزان ۸۸/۵۱٪ بوده ولی با افزایش غلظت اسانس تا سطح ۱/۵ درصد این میزان به ۵۶/۹۸٪ کاهش یافت.

- خواص فیزیکی فیلم‌ها (درصد رطوبت، نفوذپذیری به بخار آب در صد، زاویه تماس و حلالیت)

در جدول (۱) درصد رطوبت، نفوذپذیری به بخار آب، زاویه تماس و درصد حلالیت فیلم‌های تولیدی آمده است. با افزودن اسانس به ماتریس بیوپلیمری میزان رطوبت فیلم‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). میزان درصد رطوبت در فیلم‌های ژلاتینی حاوی درصد‌های مختلف اسانس در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۱۷/۶۲، ۱۷/۷۲ و ۲۱/۸۳ درصد گزارش گردید. میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های ژلاتینی به طور معنی‌داری با افزایش غلظت اسانس روند صعودی نشان داد ($p < 0/05$). میزان زاویه

جدول (۱) - خواص فیزیکی فیلم‌های تولیدی

نوع فیلم	ضخامت (mm)	رطوبت (%)	حلالیت (%)	نفوذپذیری به بخار آب	زاویه تماس
شاهد	۰/۰۴۹±۰/۰۰۵ ^a	۱۷/۴۵ ± ۰/۲۴ ^b	۸۸/۵۱ ± ۸/۷۳ ^a	۳/۰۸±۰/۵۱ ^c	۳۰/۹۲±۴/۸۹ ^b
نمونه ۰/۵ درصد	۰/۰۵۰±۰/۰۰۴ ^a	۱۷/۶۲ ± ۰/۳۸ ^b	۵۹/۲۲ ± ۵/۰۵ ^b	۴/۱۴±۰/۷۹ ^{bc}	۳۵/۲۲ ± ۳/۱۹ ^b
نمونه ۱ درصد	۰/۰۵۰±۰/۰۰۶ ^a	۱۷/۷۲ ± ۲/۱۸ ^b	۵۸/۱۷ ± ۳/۳۰ ^b	۶/۲۴±۲/۰۲ ^{ab}	۴۹/۶۲ ± ۷/۴۷ ^a
نمونه ۱/۵ درصد	۰/۰۵۱±۰/۰۰۳ ^a	۲۱/۸۳ ± ۲/۳۷ ^a	۵۶/۹۸ ± ۳/۸۸ ^b	۷/۰۴±۱/۴۹ ^a	۴۸/۳۴ ± ۵/۵۵ ^a

a، b و c: حروف کوچک متفاوت در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ($p < 0/05$) می‌باشد.

گردید. درصد افزایش طول فیلم‌ها با افزایش غلظت اسانس میخک به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). به طوری‌که بیشترین درصد افزایش طول در فیلم‌های ژلاتینی حاوی ۱/۵ درصد اسانس به‌میزان ۵۴/۹۱ مشاهده گردید.

- خواص مکانیکی فیلم‌ها (مقاومت کششی و درصد افزایش طول فیلم‌ها)

همان‌طور که در جدول (۲) مشاهده می‌شود که مقاومت کششی فیلم‌ها با افزودن اسانس میخک به فیلم‌های ژلاتینی، کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد، به طوری‌که کم‌ترین مقاومت کششی در فیلم‌های ژلاتینی حاوی ۱/۵ درصد اسانس به‌میزان ۲/۵۸ مگاپاسکال دیده

جدول (۲) - ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌های تولیدی

نوع فیلم	ضخامت (mm)	مقاومت کششی (مگاپاسکال)	درصد افزایش طول (mm)
شاهد	$0/049 \pm 0/005^a$	$3/81 \pm 0/03^a$	$10/16 \pm 0/60^c$
نمونه ۰/۵ درصد	$0/050 \pm 0/004^a$	$3/33 \pm 0/02^b$	$16/88 \pm 0/02^d$
نمونه ۱ درصد	$0/050 \pm 0/006^a$	$3/15 \pm 0/35^c$	$32/94 \pm 0/06^b$
نمونه ۱/۵ درصد	$0/051 \pm 0/003^a$	$2/58 \pm 0/94^d$	$54/91 \pm 0/07^a$

a, b و c: حروف کوچک متفاوت در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ($p < 0/05$) می‌باشد.

به فیلم‌های پروتئینی، شاخص روشنایی کاهش نشان داده، اما فاکتورهای a، b و کدورت افزایش پیدا نمودند.

- رنگ سطحی فیلم‌های تولیدی

شاخص‌های رنگ سطحی فیلم‌های ژلاتینی حاوی درصد‌های مختلف اسانس میخک در جدول (۳) آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزودن اسانس

جدول (۳) - ویژگی‌های رنگ سطحی فیلم‌های تولیدی

نوع فیلم	L*	a*	b*	کدورت
شاهد	$84/13 \pm 1/39^a$	$-0/38 \pm 0/37^b$	$1/10 \pm 0/37^d$	$0/38 \pm 0/03^c$
نمونه ۰/۵ درصد	$82/62 \pm 0/21^{ab}$	$-0/89 \pm 0/13^b$	$3/98 \pm 0/65^c$	$4/29 \pm 2/83^b$
نمونه ۱ درصد	$82/93 \pm 0/62^{ab}$	$-1/57 \pm 0/15^a$	$6/54 \pm 0/24^b$	$7/41 \pm 1/34^a$
نمونه ۱/۵ درصد	$80/85 \pm 1/48^b$	$-1/71 \pm 0/10^a$	$12/04 \pm 1/83^a$	$8/74 \pm 0/91^a$

a, b و c: حروف کوچک متفاوت در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ($p < 0/05$) می‌باشد.

- میزان فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی

میخک بازداري قابل توجهی را در برابر اکثر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان دادند. فقط در بین این میکروارگانیسم‌ها، سودوموناس باکتری مقاوم در برابر میخک بود. اثر ضدباکتریایی اسانس با ایجاد ناحیه بازداري مشاهده شد. اضافه کردن اسانس میخک به متیل سلولز موجب انتشار اسانس به محیط کشت و فراهم کردن ناحیه بازداري اطراف فیلم شد.

نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس میخک بر باکتری‌های لیستریا مونو سائتوزنز، ای کولای، استافیلوکوکوس آرتوس و سودوموناس آئروژینوزا طی آزمایش دیسک دیفیوژن در جدول (۵) نشان داده شده است. فیلم‌های شاهد هیچ اثر بازداري را در برابر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی نشان ندادند. نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت اسانس میزان قطر هاله عدم رشد افزایش یافت. فیلم‌های حاوی اسانس

جدول (۴)- مقایسه اثرات ضدباکتریایی فیلم ژلاتینی حاوی اسانس میخک به روش دیسک دیفیوژن بر حسب میلی‌متر

نوع فیلم	لیستریا مونوسائتوزنز	اشرشیاکولای	استافیلوکوکوس آرتوس	سودوموناس آئروژینوزا
شاهد	۰/۰۰ ^d	۰/۰۰ ^d	۰/۰۰ ^d	۰/۰۰
نمونه ۰/۵ درصد	۱۸/۷۵±۱/۱ ^c	۱۴/۳۱±۱ ^b	۱۴/۳۷±۱/۴ ^{۳c}	۰/۰۰
نمونه ۱ درصد	۲۷/۰۸±۱ ^b	۱۸/۰۵±۱/۱۸ ^b	۲۰/۰۰±۱/۱۶ ^b	۰/۰۰
نمونه ۱/۵ درصد	۳۵/۴۳±۱/۱۹ ^a	۲۴/۳۰±۱/۵۵ ^a	۳۰/۳۷±۱ ^a	۰/۰۰

a, b و c: حروف کوچک متفاوت در هر ستون، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح (p<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

این عامل افزایش روند خروج بخار آب از عرض فیلم‌های تولیدی را توجیه می‌نماید (Pranto et al., 2005). از طرفی دیگر، محققین نتایج متفاوتی را از میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های ژلاتینی با اسانس‌های نعنا و سنبل هندی منتشر نمودند (Threpopnatkul and Yanwong, 2015). دلیل این پدیده را می‌توان به تفاوت در خاصیت آب‌گریزی اسانس‌های گیاهی مرتبط دانست. میزان حلالیت فیلم‌ها یکی از خصوصیات مهم در تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر بوده به دلیل این‌که این پارامتر، میزان مقاومت فیلم‌ها نسبت به آب در مواقعی است که فیلم‌ها در فرآورده‌های مرطوب به کار می‌روند، را نشان می‌دهد

افزودن اسانس میخک تأثیر متفاوتی روی فیلم‌های تولیدی داشته، بدین صورت که نمای سطحی ژلاتین بعد از افزودن اسانس، دارای منافذ و ترک‌های ریز متعددی گردید. به‌طور کلی به دلیل وجود گروه‌های آب‌دوست در زنجیره‌های پلیمری، فیلم‌های پروتئینی، مثل ژلاتین بازدارندگی کمی در برابر بخار آب از خود نشان می‌دهند (Threpopnatkul and Yanwong, 2015). افزودن اسانس به فیلم ژلاتینی فلس ماهی سفید موجب افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های تولیدی گشت. همان‌طور که قبلاً هم توضیح داده شد، افزودن اسانس باعث ایجاد ترک در فیلم‌های تولیدی گردید که

(شکل ۱) ب که این امر در نهایت موجب کاهش معنی‌دار مقاومت کششی فیلم‌ها گردید. دلیل این امر را می‌توان به خاصیت پلاستی سائیزی اسانس میخک نسبت داده، به طوری که از برهم‌کنش زنجیره‌های پروتئینی ژلاتین ماهی جلوگیری نموده و در نتیجه مقاومت مکانیکی در فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس میخک کاهش یافت. میزان کاهش مقاومت مکانیکی روند وابسته به دوز داشت. هم‌چنین به دلیل خاصیت نرم‌کنندگی اسانس میخک، میزان افزایش طول فیلم بیشتر شده، به طوری که در طول آزمون کشش، میزان لغزش زنجیره‌های پروتئینی افزایش یافت. در حالی با افزایش اسانس سنبل هندی تا ۳۰ درصد نتایج متفاوتی نسبت به پژوهش حاضر در فیلم ژلاتینی به دست آمد (Threepopnatkul and Yanwong, 2015). این تفاوت یا تنوع در رفتار اسانس‌ها در ترکیب با پلیمر ژلاتینی ممکن است ناشی از ساختار شیمیایی ترکیب مورد استفاده باشد که تعیین کننده واکنش‌های صورت گرفته بین ترکیبات اسانس و ماتریس فیلم ژلاتینی باشد (Sanchez- Gonzalez et al., 2011). افزودن چربی و اسانس آویشن به فیلم کازئینات سدیم منجر به کاهش مقاومت کششی در روکش‌های پروتئینی شد (Broumand et al., 2011). در پژوهش دیگری در اثر افزودن صمغ به فیلم ایزوله پروتئین آب پنیر موجب کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها شد. همراهی ترکیبات روغنی مثل اسانس‌ها ممکن است به دلیل ایجاد ساختار غیر یکنواخت در فیلم‌ها مقاومت کششی آن‌ها را کاهش دهد (Osset et al., 2009). با افزایش درصد اسانس ترنج بر روی فیلم ژلاتینی حاصل از فلس نوعی ماهی،

(Siripatrawan and Harte, 2010). از طرف دیگر حلالیت می‌تواند تعیین کننده سرعت آزاد شدن ترکیبات ضد اکسیداسیونی و ضد میکروبی از فیلم در زمان تماس با سطح ماده غذایی باشد (Gomez-Estaca et al., 2010). حلالیت در آب فیلم‌های ژلاتینی با افزودن اسانس میخک روند نزولی نشان داد. کاهش بیشتر میزان حلالیت در فیلم‌های غنی شده با اسانس میخک می‌تواند ناشی از افزایش ترکیبات آب‌گریز در ماتریس بیوپلیمری بوده که در این حالت میزان نفوذ آب در ساختار فیلم تهیه شده کاهش یافته و این امر در نهایت موجب کم‌تر شده میزان حلالیت فیلم‌ها گردید (Rhim, 2011). نتایج مشابهی در مورد افزودن غلظت‌های مختلف اسانس رزماری به فیلم کیتوزان منتشر گردید (Abdollahi et al., 2012). زاویه تماس آب شاخصی است که میزان خیس‌شوندگی مواد بسته‌بندی را بیان نموده و شاخص ویژگی آب‌دوستی و یا آب‌گریزی مواد می‌باشد (Ojagh et al., 2010). به طور کلی هرچه ماده‌ای آب دوست‌تر باشد، به همان میزان زاویه تماس کاهش می‌یابد (Jiang and Tang, 2007). افزودن اسانس میخک باعث افزایش زاویه تماس فیلم‌های تولیدی یا به عبارتی کاهش ضریب آب‌دوستی شد که شاید بتوان آن را به دلیل حضور ترکیبات آب‌گریز موجود در اسانس میخک استفاده در ماتریس فیلم تولیدی نسبت داد.

همان‌طور که نتایج نشان داد میزان مقاومت مکانیکی فیلم‌های ژلاتین خالص ۲۴/۷۶ مگاپاسکال بود. افزودن اسانس میخک موجب کاهش مقاومت به کشش شده که به نظر می‌رسد این امر ناشی از شکست ساختار فیلم و ترک‌های ایجاد شده در ساختار فیلم تولیدی باشد

غلظت بالا و برای مدت طولانی‌تری در سطح فرآورده باقی می‌ماند (Sanchez- Gonzalez *et al.*, 2011). زمانی که ترکیبات ضد میکروبی از جمله اسانس‌های گیاهی به فیلم‌های خوراکی زیست تخریب‌پذیر اضافه می‌گردند، این ترکیبات در محیط مینا (محیط کشت آگار یا فرآورده غذایی) نفوذ و منتشر گردیده و اثر بازدارندگی از رشد در میکروارگانیسم‌ها را موجب می‌شود. براساس تحقیقات گذشته ثابت شده است که باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس‌ها حساس‌تر می‌باشند. علت این امر هم به دلیل وجود غشاهای لیپو پلی‌ساکاریدی خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی بوده و در این راستا منطقی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها در برابر اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند (Bower *et al.*, 2006). لذا با توجه به مطالب گفته شده با توجه به این که باکتری لیستریا مونوسایتوزنز یک باکتری گرم مثبت می‌باشد، لذا حساسیت زیاد این باکتری به اسانس‌های میخک با توجه به عدم وجود غشاهای لیپو پلی‌ساکاریدی خارجی منطقی به نظر می‌رسد. هم‌چنین فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس میخک، هیچ تأثیری روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا نداشت.

باتوجه به نتایج مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که افزودن اسانس با ایجاد ساختار منفذدار، کاهش مقاومت به کشش فیلم‌های تولیدی گردید. غلظت‌های بالاتر اسانس، میزان کدورت و شاخص قرمزی را بالاتر برده، از طرفی دیگر شاخص روشنایی روند نزولی نشان داد. ویژگی‌های ضد میکروبی نشان داد که به‌طور کلی، باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به گرم

ضخامت ابتدا افزایش و سپس کاهش نشان داد (Ahmad *et al.*, 2012).

رنگ فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر اهمیت زیادی در کاربرد آن‌ها در صنعت بسته‌بندی دارد و یکی از عوامل مهم در تعیین کیفیت فیلم تهیه شده به‌شمار می‌آید (Almasi *et al.*, 2010). فیلم‌های ژلاتینی دارای ظاهری شفاف و متمایل زرد رنگ بوده که با نتایج سایر محققین هم‌خوانی دارد (Rhim *et al.*, 2004; Jones, 1977). ارزیابی نتایج رنگ فیلم‌ها نشان داد که با افزایش غلظت اسانس میزان شاخص روشنایی روند کاهشی نشان داد. در اثر افزودن اسانس دارچین بر فیلم‌های کیتوزانی نتایج مشابهی با تحقیق حاضر به‌دست آمد (Ojaghet *et al.*, 2010). هم‌چنین با بیشتر شدن غلظت اسانس پارامترهای اختلاف رنگ و شاخص سفیدی به‌ترتیب افزایش و کاهش نشان داد. کدورت فیلم‌ها به‌عنوان شاخصی از میزان شفافیت فیلم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که هر چه میزان کدورت بالاتر رود نشان دهنده کاهش شفافیت فیلم‌های تولیدی می‌باشد (Pranto *et al.*, 2011). علاوه بر این مشخص گردید که با افزوده شدن اسانس میخک، کدورت فیلم‌ها افزایش و به‌عبارتی شفافیت فیلم‌ها کاهش یافت. نتایج مشابهی تأثیر عصاره گیاه جی‌سینگ بر روی میزان شفافیت فیلم‌های آلژیناتی منتشر گردید (et al., 2010). (Norajit

از جمله مهم‌ترین اهداف استفاده اسانس‌های گیاهی در فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر، بهبود خصوصیات ضد میکروبی فیلم تهیه شده بوده و در این صورت به‌منظور کاهش از دست رفتن ترکیبات فرار اسانس در طول زمان نگهداری محصولات غذایی، اسانس در یک

ویژگی‌های را بهبود بخشید. به‌طور کلی فیلم ژلاتینی حاوی ۱ درصد اسانس میخک دارای بهترین عملکرد فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی بود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

منفی‌ها در برابر اسانس میخک داشتند. میزان رطوبت، نفوذپذیری به بخار آب و زاویه تماس افزایش پیدا نموده، اما غلظت اسانس تأثیر معنی‌داری بر روی ضخامت فیلم‌های ژلاتینی نداشت. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که غلظت اسانس تأثیر مستقیمی روی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی فیلم‌های ژلاتینی حاصل از فلس ماهی سفید داشته که می‌تواند با ایجاد تغییراتی، این

منابع

- Abdollahi, M., Rezaei, M. and Farzi, G. (2012). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(4): 847-853.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Agustini, T.W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids*, 28(1): 189-199.
- American Society for Testing and Materials. (2010). Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM International.
- Almasi, H., Ghanbarzadeh, B. and Entezami, A. A. (2010). Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(1): 1-5.
- Bower, C.K., Avena Bustillos, R.J., Olsen, C.W., McHugh, T.H., and Bechtel, P.J. (2006). Characterization of fish skin gelatin gels and films containing the antimicrobial enzyme lysozyme. *Journal of Food Science*, 71(5): 141-145.
- Bao, S., Xu, S. and Wang, Z. (2009). Antioxidant activity and properties of gelatin films incorporated with tea polyphenol loaded chitosan nanoparticles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(15): 2692-2700.
- Broumand, A., Emam-Djomeh, Z., Hamedi, M. and Razavi, S. H. (2011). Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10): 2316-2323.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3): 223-253.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., KahlaNakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21(6): 501-506.
- Gilsenan, P.M., and Ross-Murphy, S.B. (2000). Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14(3): 191-195.
- Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. and Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1): 25-34.

- Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M.C., Alemán, A. and Montero, P. (2009). Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. *Food Chemistry*, 112(1): 18-25.
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M.C., Fernández-Martín, F. and Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6):1461-1469.
- Gómez-Estaca, J., De Lacey, A.L., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*. 27(7): 889-896.
- Hosseini, M.H., Razavi, S.H. and Mousavi, M.A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation*. 33(6): 727-743.
- Jones, N.R. (1977). Uses of gelatin in edible products. In: *the Science and Technology of Gelatin*, Academic Press, London. pp. 366-392.
- Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, W., Abe, S., and Osako, K. (2009). Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids*, 23(7): 1993-2000.
- Leuenberger, B. H. (1991). Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloids*, 5(4): 353-361.
- Mahjoorian, A., Mortazavi, S. A., Tavakolipour, H., Motamedzadegan, A., and Askari, B. (2013). Rheological properties of skin gelatin of Beluga Sturgeon (*Huso huso*) from The Caspian Sea. *Annals of Biological Research*, 4(7): 227-234.
- McHugh, T.H., Avena Bustillos, R. and Krochta, J.M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58(4): 899-903.
- Norajit, K., Kim, K. M., and Ryu, G. H. (2010). Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *Journal of Food Engineering*, 98(3): 377-384.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 120(1): 193-198.
- Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S. A., Cruz-Orea, A. and Maté, J. I. (2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*. 92(1): 56-62.
- Pranoto, Y., Lee, C.M. and Park, H.J. (2007). Characterizations of fish gelatin films added with gellan and κ -carrageenan. *LWT-Food Science and Technology*, 40(5): 766-774.
- Pranoto, Y., Salokhe, V.M., and Rakshit, S.K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*. 38(3): 267-272.
- Reppond, K.D., Wasson, D.H. and Babbitt, J.K. (1993). Properties of gels produced from blends of arrowtooth flounder and Alaska pollock surimi. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 2(1): 83-98.
- Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M. and Ng, P.K. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(16): 5814-5822.
- Standard, A.S.T.M. (1989). Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual book of ASTM standards. Designation E96-E80, 730-739.
- Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. and Cháfer, M. (2011). Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*. 3(1):1-16.

-
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A. and Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering*. 98(4): 443-452.
 - Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5): 1202-1205.
 - Siripatrawan, U. and Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8): 770-775.
 - Tang, C.H. and Jiang, Y. (2007). Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. *Food Research International*, 40(4): 504-509.
 - Yanwong, S. and Threepopnatkul, P. (2015). Effect of peppermint and citronella essential oils on properties of fish skin gelatin edible films. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 87(1): p.012064. IOP Publishing.

Physico-mechanical and antimicrobial properties of edible film incorporated with *Caryophillum aromaticcus* essential oil (CAO) from Caspian White fish (*Rutilus frisii Kutum*) scale

Mahjoorian, A.¹, Saeedi Asl, M.R.^{2*}, Rezaei, M.³, Mortazavi, S.A.⁴, Ariaii, P.⁵

1. Ph.D Graduate of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
3. Professor, Department of Fishery Products Technology, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran
4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
5. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Azad Islamic University, Amol, Iran

*Corresponding Author E.mail: mrezasaeidi@yahoo.com

(Received: 2017/12/28 Accepted: 2018/5/2)

Abstract

Byproducts from the processing of fish are a good source of collagen. Biodegradable protein-based film was made by incorporating clove essential oil (CAO) into Caspian white fish scale gelatin (CWFSG) at level of 0, 0.5%, 1% and 1.5% (weight/ protein weight ratio) and antimicrobial, physical and mechanical properties of films including tensile strength (T.S), elongation at break (EAB%), moisture%, water vapor permeability (WVP), contact angle, solubility, surface color properties, and scanning electron microscopy (SEM) were investigated. Gelatin-based films enriched with different concentrations of CAO were prepared and examined. Incorporation of CAO at concentrations of 0-1.5% resulted in the decreasing in tensile strength (TS) of the films. Water vapor permeability (WVP) was increased in the film added with CAO at a level higher than 0.5% ($P < 0.05$); However, film solubility and L*value decreased. Moreover, when CAO was incorporated the films showed the lowered light transmission in the visible range. Films incorporated with CAO had an inhibitory effect in a concentration-dependent manner against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. SEM images revealed the presence of micro-pores in the essential oil incorporated films, which contributed to the physical properties of the films. Gelatin films incorporated with CAO can be used as an active packaging, but the properties must be modified. Gelatine film containing 1% CAO had the best physical, mechanical and antimicrobial properties.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Collagen, Biodegradable protein-based film, Caspian white fish scale gelatin, Antimicrobial activity