

اثر فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج

(*Citrus aurantium*) بر رفتار رشد باکتری ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز

در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

نگین غلامی^۱، لاله رومیانی^{۲*}، مهرنوش تدینی^۳

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۲- گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

lroomiani@iauhvaz.ac.ir*

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج (*Citrus aurantium*) به منظور کنترل رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز تلقیح شده به میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) و نیز خواص فیلم در شرایط یخچالی به مدت ۱۵ روز مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم، فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم حاوی ۱۰/۵ و ۲ درصد اسانس نارنج بود. نتایج نشان داد که کمترین میزان مقاومت کششی (۱۴/۷۷ درصد)، حلالیت در آب (۱۵/۳۱ درصد) و بیشترین میزان نفوذپذیری به بخار آب ($10^{-10} \times 1/79$ g/msPa) در تیمار فیلم با ۲ درصد اسانس نارنج مشاهده شد. همچنین افزودن اسانس به فیلم میزان ضخامت (۰/۱۷۱ میلی‌متر) و کشش (۵۹/۳۷ درصد) در مقایسه با شاهد را افزایش داد ($p < 0/05$). کمترین میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در تیمار فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج اندازه‌گیری شد ($p < 0/05$). در طول ۱۵ روز نگهداری، فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم حاوی اسانس توانست باعث کاهش ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با تیمار شاهد در میگوی وانامی شود ($p < 0/05$). فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج نسبت به تیمار کنترل، ۹ روز رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز را به تاخیر انداخت.

کلید واژه ها: اسانس نارنج، فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم، میگوی وانامی.

مقدمه

به دلیل ایجاد عفونت‌های انسانی و علائمی شبیه آنفلوانزا منجر به مننژیت، سقط جنین و انسفالوپاتی در کودکان خواهد شد و مرگ و میری در حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد دارد (Di Pinto et al., 2010).

با توجه به وجود باکتری‌ها درون مواد غذایی، استفاده از روش‌هایی که بتوانند باکتری‌ها با منشاء غذایی را کنترل و یا کاهش دهند، می‌توان سلامت مصرف‌کننده غذاهای دریایی را تامین کند. کیتوزان یکی از فراوانترین ترکیباتی است که از منابع طبیعی تجدید شدنی همانند سخت پوستان (لابستر، خرچنگ و میگو)، حشرات و قارچ‌ها بدست می‌آید (Sun et al., 2021). به دلیل ویژگی‌های ذاتی قابل توجه کیتوزان همانند فعالیت ضد باکتریایی و قابلیت فرم-گیری عالی، کیتوزان می‌تواند به عنوان یک ماده بسته بندی فعال برای محافظت از غذاها استفاده شود (Salama, 2020).

مواد مختلفی جهت بهبود ویژگی‌های فیلم‌های خوراکی به ترکیب آنها افزوده می‌شود از جمله این مواد می‌توان به آلژینات سدیم (Feng et al., 2023)، ژلاتین (Hathimoghadam et al., 2023) و اسانس‌های گیاهی (Zhang et al., 2023) اشاره کرد. آلژینات از جلبک‌های قهوه‌ای به دست می‌آید و مانند نشاسته و سلولز، یک پلی ساکارید با ۱۰۰۰ تا ۳۰۰۰ عدد واحد ساختمانی مرتبط به هم است که از دو بخش نسبتاً سخت و نسبتاً منعطف تشکیل شده است (Nehchiri et al., 2021; Khorrani et al., 2021). قابلیت تشکیل ژل، افزایش استحکام بافت-ها، پایدارکنندگی و قابلیت تشکیل فیلم از خواص کاربردی آلژینات است (Raeisi et al., 2020).

همچنین مطالعات متعددی بر روی بهبود فعالیت ضد میکروبی فیلم کیتوزان از طریق ترکیب با اسانس‌ها انجام شده است. امروزه به دلیل استفاده از مواد نگهدارنده ناسالم و سنتتیک، عصاره‌های استخراج شده از گیاهان به دلیل

بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده به باکتری‌های پاتوژن‌زاد، موجب نگرانی در سلامت عمومی جامعه شده است. سالانه ۴۲۰ هزار مرگ و میر انسانی به علت بیماری‌های غذازاد در جهان اتفاق می‌افتد. یکی از استراتژی‌های بالقوه برای کاهش عفونت‌های ناشی از غذا، توسعه سیستم‌های نگهداری کارآمد است که قادر به کاهش آلودگی میکروبی مواد غذایی هستند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌ها به دلیل استفاده گسترده از آنها متداول و تهدیدی برای سلامت عمومی بشمار می‌رود. در نتیجه، نیاز اساسی به روش‌های جایگزین احساس می‌شود (Rai et al., 2023).

ویبریوها پاتوژن‌های انسانی هستند که به شکلی وسیع، در محیط‌های دریایی منتشر شده‌اند. بخش عمده‌ای از گونه‌های جنس ویبریو، بومی محیط‌های آبی مناطق گرم یا معتدل بوده و به شکل گسترده‌ای از فرآورده‌های دریایی خام جدا می‌شوند (Liu et al., 2021). گونه ویبریو پاراهمولیتیکوس از بین ۱۲ گونه ویبریو مولد بیماری غذازاد در انسان، بیشترین اهمیت را در مقایسه با سایر گونه‌ها دارد. این باکتری گرم منفی، تخمیرکننده بی‌هوازی و نمک دوست است. قدرت تحمل نمک بالا در این باکتری سبب شده است که جز فلور میکروبی آب‌های شور باشد (Ming et al., 2018). ویبریو پاراهمولیتیکوس مسئول ۵۰-۷۰ درصد از موارد گاستروانتریت و اسهال در کشورهای آسیایی است. این باکتری پس از تهاجم به کولون باعث ایجاد بیماری و عامل عفونت‌های متفاوتی در انسان است که به دنبال مصرف غذاهای دریایی مثل نرم‌تنان، صدف‌ها، ماهیان، میگو، لابستر و خرچنگ آلوده ایجاد گاستروانتریت می‌نماید (Zhang et al., 2021).

لیستریا مونوسیتوژنز یک مشکل بهداشتی جهانی، باکتری فرصت طلب و پاتوژن درون سلولی است (Liu, 2006) که

تهیه کیتوزان

ابتدا ضایعات میگوی خشک شده آسیاب و در مرحله اول با NaOH یک نرمال به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط و به نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط شد تا مواد آلی و گوشتی از آن جدا شوند. مواد با فیلتر صاف و با آب مقطر به pH خنثی رسیدند. سپس به مدت یک روز اجازه داده شد تا پوسته خشک شود. بعد از آن با اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نسبت ۱ به ۲۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط مخلوط گردید تا مواد معدنی از کیتین جدا شد. طبق مرحله قبل، فیلتراسیون و خنثی سازی pH و نیز خشک کردن باقیمانده فیلتر انجام پذیرفت. در مرحله آخر کیتوزان با NaOH پنجاه درصد به نسبت ۱ به ۲۰ مخلوط و فیلتراسیون انجام شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد تا کیتوزان خشک شود (مودنی جولا و رومیانی، ۱۳۹۶).

تهیه فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم

فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم مطابق با روش Nowzari و همکاران (۲۰۱۳) آماده شد. ۲ گرم از پودر کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر گلاسیال استیک اسید ۱ درصد حل و با دور ۱۵۰۰rpm بهم زده شد، سپس در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز جهت شکل گیری فیلم نگهداری شد. به منظور تهیه فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم، محلول آلژینات سدیم (شرکت BDH انگلستان) ۳۰ گرم پودر آلژینات سدیم در ۱ لیتر آب مقطر (محلول ۳ درصد آلژینات سدیم) حل گردید. سپس گلیسرول (شرکت Merck آلمان) جهت شکل پذیر کردن فیلم، به غلظت های ۷۵ درصد کیتوزان و آلژینات سدیم اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه هم زدن، توئن ۸۰ یا Polyoxyethylene sorbitan monooleate (شرکت Tianjin Guangfu Fine Chemical Research Institute، چین) در ۰/۲۵ میلی مول/۱۰۰ میلی لیتر کیتوزان و آلژینات سدیم حل شد. جهت تهیه فیلم حاوی اسانس، اسانس نارنج در سطح ۱ و ۲ درصد همراه با گلیسرول به فیلم اضافه و با دور ۱۲۰۰rpm و به مدت ۱

داشتن ترکیبات پلی فنولیک، به جای این ترکیبات مورد توجه و مطالعه قرار گرفته اند (Hadidi et al., 2020) که می توان به مطالعات Sayadi و همکاران (۲۰۲۱) بر تاثیر نانوکامپوزیت آلژینات پوشیده شده با اسانس زیره بر روی ماندگاری گوشت، Moradi و همکاران (۲۰۲۰) تاثیر پوشش کیتوزان - پکتین - اسانس لیمو و فلفل قرمز بر روی کیفیت فیله قزل آلی رنگین کمان، Maghami و همکاران (۲۰۱۹) تاثیر نانوذرات کیتوزان دارای اسانس *Foeniculum vulgare* بر روی ماندگاری *Huso huso* و کاهش فعالیت باکتریایی مواد غذایی در طول زمان نگهداری، اشاره کرد. با توجه به مقاومت و ماهیت بیماری زایی باکتری ویبریو و لیستریا در غذاهای دریایی، هدف از انجام این تحقیق، افزایش فعالیت ضد میکروبی فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج جهت مقابله با ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز موجود در میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei* بود.

مواد و روش کار

تهیه اسانس

برگ های نارنج از باغات اطراف دزفول جمع آوری و برای شناسایی به آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول ارسال شدند. برگ ها با آب مقطر شسته و سپس خرد شدند. ۱۰۰ گرم برگ خرد شده به همراه یک لیتر آب در دستگاه کلونجر منتقل و به مدت ۳ ساعت، اسانس گیری انجام شد. پس از آبگیری اسانس تقطیر شده با سولفات سدیم انیدرید، اسانس به یک شیشه تیره و بدون تماس با نور و هوای آزاد منتقل و تا زمان استفاده در یخچال (۴ °C) نگهداری شد. آنالیز اسانس توسط دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) مدل Agilent 5973 با ستون BPX5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (دهقان و رومیانی، ۱۳۹۸).

ΔR: اختلاف فشار جزئی بین درون و بیرون فنجانک بر حسب پاسکال، X: ضخامت فیلم بر حسب متر اندازه‌گیری خواص مکانیکی

مقاومت کششی و کرنش تا نقطه شکست با استفاده از دستگاه سنجش بافت Stable Micro Systemr مدل TA.XT.PLUS ساخت کشور انگلستان و بر اساس روش استاندارد ASTM D882-02 اندازه‌گیری شد. نمونه‌های فیلم به مدت ۷۲ ساعت در رطوبت نسبی ۵۳ درصد که توسط محلول اشباع نیترات منیزم ایجاد شده بود قرار گرفتند. سپس فیلم‌های بریده شده در ابعاد ۱×۶ سانتی-متر مربع بین دو فک دستگاه با فاصله اولیه ۴۰ میلی‌متر قرار گرفتند و فک بالا با سرعت ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه شروع به حرکت کرد. مقاومت کششی فیلم‌ها از رابطه ۳ و کرنش تا نقطه شکست که برابر با افزایش طول تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰ است از روی منحنی‌های نیرو/تغییر شکل بدست آمد.

مقاومت کششی = (ضخامت فیلم × عرض فیلم) / حداکثر نیرو در لحظه پاره شدن

آماده‌سازی میگو

میگوی وانامی (*L. vannamei*) به شکل تازه از بازار آبادان تهیه و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل شد. میگوهای پاک شده با آب مقطر شسته شدند. در هر کیسه استومیکر ۱۰ گرم میگو قرار داده شد. سپس میگوها در کیسه‌های استومیکر همراه با یخ به منظور استریل و از بین بردن کامل فلور باکتریایی، به سازمان انرژی اتمی جهت تابش اشعه گاما به میزان ۵ کیلوگری ارسال و مجدداً در مجاورت یخ و در دمای صفر تا ۲ °C به آزمایشگاه منتقل شدند. در تیمار آزمایشی حاوی اسانس بدون فیلم، میگوها در محلول آب نمک استریل حاوی غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج به مدت ۲ ساعت غوطه‌ور شدند. برای ایجاد پوشش فیلم، فیلم‌ها پس از خشک شدن از قالب جدا شده و به دور میگوها پیچانده شدند.

دقیقه مخلوط گردید. فیلم نهایی با قطر ۴۰ میلی‌لیتر در ظروف پتری دیش ریخته و بعد از ۴۸ ساعت، فیلم از پتری-ها خارج گردید.

اندازه‌گیری ضخامت فیلم

از دستگاه میکرومتر دیجیتالی با دقت نزدیک به ۰/۰۱ میلی-متر استفاده شد. در هر فیلم حداقل ۱۰ نقطه تصادفی اندازه‌گیری و ضخامت فیلم به شکل میانگین ارائه شد.

اندازه‌گیری حلالیت در آب

تکه‌های فیلم با ابعاد ۲×۵ سانتی‌متر مربع به منظور رسیدن به یک وزن ثابت، در آون با دمای ۱۰۵ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس فیلم‌ها در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شده، سپس به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. فیلم‌ها پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ °C درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت دوباره وزن شدند. درصد حلالیت با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Zolfi et al., 2014).

درصد حلالیت = ((وزن خشک نهایی - وزن خشک

اولیه) / (وزن خشک اولیه) × ۱۰۰

نفوذپذیری نسبت به بخار آب

این آزمون با استفاده از روش ASTM E96-95 سنجش شد. درون ظروف شیشه‌ای با قطر ۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۳ سانتی‌متر، کلرید کلسیم ریخته شد، سپس سطح ظرف به وسیله فیلم و با استفاده از گریس و گیره فلزی پوشانده شد. ظروف درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع کلرید سدیم (دمای ۲۵ °C و رطوبت ۷۵ درصد) قرار گرفتند. تغییرات وزن ظروف طی زمان با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. نفوذپذیری بخار آب بر حسب g/m.s.pa با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{\Delta R}$$

کیسه‌های حاوی میگوی تلقیح شده به یخچال با دمای °C ۴ منتقل شدند (Roomiani et al., 2017).
 اندازه‌گیری بار میکروبی در میگو ۵ گرم میگو با ۴۵ میلی-لیتر آب مقطر به کیسه استریل منتقل و توسط دستگاه استومیکر به صورت هموژن در آمدند. کشت از نمونه‌های هموژن شده باکتری و ویبریو پاراهمولایتیکوس با استفاده لوپ استریل و بر روی محیط کشت TCBS (تیوسولفات سیترات بیلی سوکروز آگار) با شوری ۲-۱/۵ درصد و باکتری لیستریا مونوسی‌توزنز بر روی پلیت‌های محیط آگار BHI کشت داده شد. پلیت‌های کشت داده شده در دمای °C ۳۰ و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. تعداد باکتری به صورت Log cfu/g بیان شد (Roomiani et al., 2017).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف بررسی و سپس آزمون آماری آنالیز واریانس و جهت مقایسه میانگین‌ها آزمون تعقیبی دانکن در نرم افزار SPSS20 و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. کلیه نمودارها با اکسل ۲۰۱۰ رسم گردید.

نتایج

ترکیب شیمیایی اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium*) با استفاده از GC-MS با توجه به نتایج جدول ۱، لینالول (۳۴/۶۸ درصد)، آلفاترپینئول (۷/۵۳ درصد)، نئوفیتادین (۵/۷۳ درصد)، کاریوفیلین (۴/۵۸ درصد)، بنزن (۴/۳۶ درصد)، اکتاترین (۲/۳۲ درصد) و بتامیرسین (۲/۰۳ درصد) عمده‌ترین ترکیبات موجود در اسانس برگ نارنج بودند.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس برگ نارنج (*Citrus aurantium L*) با استفاده از GC-MS

ترکیبات	درصد	زمان جداسازی
بتامیرسن	۲/۰۳	۹
اکتاترین	۲/۳۲	۱۰/۹۹

تیمارهای آزمایش

تیمار ۱: فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم

تیمار ۲: فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۰/۵ درصد اسانس نارنج

تیمار ۳: فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۱ درصد اسانس نارنج

تیمار ۴: فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج

طول دوره آزمایش ۱۵ روز و نمونه‌برداری در روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ انجام شد. هر تیمار دارای ۳ تکرار بود.

تلقیح ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا

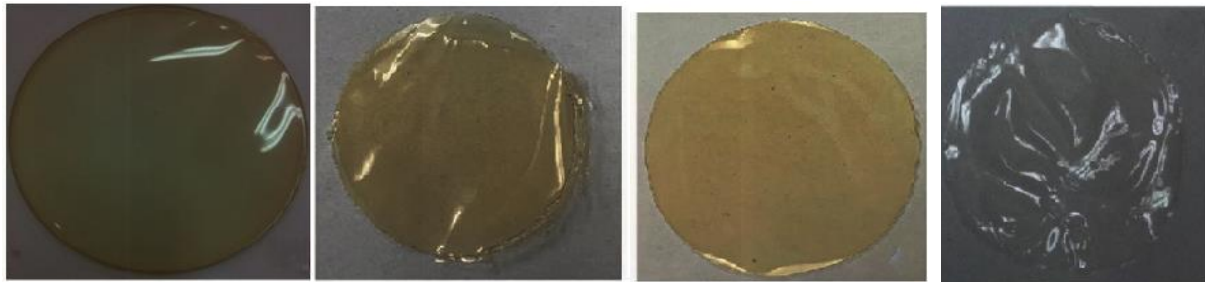
مونوسی‌توزنز به میگو

ویبریو پاراهمولایتیکوس ATCC 17802 و لیستریا مونوسی‌توزنز ATCC 7644 از گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. جهت تلقیح در شرایط استریل، میگوها در زیر هود بیولوژیک از کیسه خارج و در پلیت استریل قرار داده شدند. باکتری در زیر هود به صورت نقطه‌ای در ۱۰ نقطه و جمعاً به میزان ۱۰۰ میکرومتر به میگوها تلقیح شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش لوله کووت حاوی تقریباً ۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر بود. در شیشه زیمکس ۱ میلی‌لیتر از کووت برداشته شده و ۳۹ میلی‌لیتر آب استریل به آن افزوده گردید تا در نهایت در هر ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات شیشه زیمکس ۱۰^۸ × ۱/۴ باکتری موجود باشد. در زمان تلقیح میگوها از ۱۰۰ میکرولیتر محتویات شیشه زیمکس استفاده شد تا در هر سانتی‌متر مربع از برش میگو ۱۰^۲ × باکتری موجود باشد. سپس میگوها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در زیر هود نگهداری شدند تا باکتری‌ها جذب بافت شوند.

۱۳/۰۲	۳۴/۶	لینالول
۱۶/۱۴	۷/۵۳	آلفاترپینئول
۱۸/۳۳	۱۴/۷۵	دلتاکارن
۲۳/۶۵	۴/۵۸	کاریوفیلین
۳۸/۸۱	۵/۷۳	نتوفیتادیئن
۴۷/۰۳	۴/۳۶	بنزن

نتایج فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با اسانس نارنج

در شکل ۱، تصویر فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج در سطوح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد نشان داده شده است. با توجه به تصویر با افزایش سطح اسانس نارنج پیوستگی در ساختار فیلم افزایش یافته و رنگ آن تیره تر شده است.



فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۲ درصد اسانس نارنج

فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۱ درصد اسانس نارنج

فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با ۰/۵ درصد اسانس نارنج

شاهد

شکل ۱- فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم محتوی اسانس نارنج در غلظت‌های مختلف

کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس کمترین حلالیت در آب ($0.49 \pm 0.31/15$ درصد) را داشت ($p < 0.05$). نفوذپذیری به بخار آب تأثیر استفاده از کیتوزان، آلژینات سدیم و اسانس نارنج و ترکیب آنها بر روی نفوذپذیری به بخار آب در جدول ۲، نشان داده شده است. نفوذپذیری به بخار آب برای فیلم شاهد $10^{-10} \times 0.87$ g/msPa بود و با افزایش غلظت اسانس، نفوذپذیری به بخار آب افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان می‌دهد ترکیب کیتوزان - آلژینات-سدیم و اسانس نارنج میزان نفوذپذیری به بخار آب را نیز افزایش داد به این ترتیب کمترین میزان نفوذپذیری به بخار آب در فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج $10^{-10} \times 1.79$ g/msPa بود ($p < 0.05$).

ضخامت فیلم

همانطور که جدول ۲ نشان می‌دهد، ضخامت فیلم از ۰/۹۸ میلی‌متر در تیمار شاهد به ۰/۱۷۱ میلی‌متر در تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم با اسانس ۲ درصد رسید. ضخامت فیلم تیمارهای حاوی اسانس دارای اختلاف معنی‌دار با هم بودند ($p < 0.05$). هرچقدر میزان اسانس در فیلم بیشتر شود، میزان ضخامت آن افزایش می‌یابد.

درصد حلالیت

در جدول ۲، درصد حلالیت در آب فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم و نیز ترکیب آنها با اسانس نارنج نشان داده شده است. با توجه به نتایج، افزایش سطح اسانس به فیلم، میزان حلالیت در آب را کاهش داد، به این ترتیب که تیمار شاهد با (۴۸/۷۲ ± ۴۹ درصد) بالاترین درصد حلالیت و فیلم

جدول ۲- نتایج اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم با اسانس نارنج

فیلم	ضخامت (میلی‌متر)	حلالیت در آب (درصد)	نفوذپذیری به بخار آب (g/msPa×10 ⁻¹⁰)	میزان کشش (درصد)	مقاومت کششی (MPa)
شاهد	۰/۰±۹۸/۰۶ ^a	۴۹/۰±۷۲/۴۸ ^g	۰/۰±۸۷/۰۴ ^a	۳۷/۰±۸۹/۲۳ ^a	۳۹/۱±۸۵/۸ ^h
فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم	۰/۰±۱۱/۰۶ ^b	۳۰/۰±۲۸/۲۷ ^e	۱/۰±۲۱/۰۴ ^c	۴۸/۲±۷۱/۰۸ ^c	۳۱/۰±۵۴/۷۶ ^f
فیلم با اسانس ۰/۵ درصد	۰/۰±۱۳/۰۶ ^d	۲۱/۱±۲۰/۸۸ ^c	۱/۰±۳۱/۰۳ ^d	۵۳/۱±۳۳/۵۳ ^e	۲۰/۰±۱۱/۸۸ ^c
فیلم با اسانس ۱ درصد	۰/۰±۱۴/۰۴ ^e	۱۷/۰±۵۸/۴۶ ^b	۱/۰±۴۲/۰۲ ^e	۵۶/۱±۹۴/۱۹ ^f	۱۶/۰±۰۳/۲۲ ^b
فیلم با اسانس ۲ درصد	۰/۰±۱۷/۰۳ ^f	۱۵/۰±۳۱/۴۹ ^a	۱/۰±۷۹/۱۰ ^f	۵۹/۱±۳۷/۳۴ ^g	۱۴/۰±۷۷/۹۹ ^a

حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است ($p < 0.05$).

اسانس نارنج، کمترین بار میکروبی و تیمار شاهد بالاترین میزان را داشت ($p < 0.05$). روند افزایش میزان باکتری با افزایش زمان در هر سه تیمار اسانس نارنج و شاهد قابل مشاهده بود و کمترین بار میکروبی در تمامی تیمارها در روز صفر و بیشترین بار میکروبی در تمام تیمارها در روز پانزدهم در میگوی وانامی اندازه‌گیری شد ($p < 0.05$). میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در تمامی تیمارها با افزایش زمان نگهداری میگو روند افزایشی داشتند. در روز پانزدهم، میزان ویبریو و لیستریا در میگوهای بدون اسانس ($9.0 \pm 7.5/1.0$ LogCFU/g) و میگوهای حاوی ۲ درصد اسانس نارنج (9.91 ± 0.7) و 7.10 ± 0.4 LogCFU/g) و 7.08 ± 0.9 و 7.10 ± 0.4 اندازه‌گیری شد ($p < 0.05$) (جدول ۳).

در جدول ۴، میزان تاثیر فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی سه تیمار ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج با تیمار شاهد مقایسه شده است. در روز صفر بین چهار تیمار، در مورد میزان هر دو باکتری در میگو، اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ($p > 0.05$). با افزایش زمان نگهداری میگو، میزان باکتری در چهار تیمار دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($p < 0.05$) و بالاترین میزان باکتری‌ها در تمام تیمارها در روز پانزدهم اندازه‌گیری شد ($p < 0.05$). در تمامی روزهای بررسی بالاترین و کمترین میزان باکتری در تیمار شاهد و

خواص مکانیکی

خواص مکانیکی فیلم شامل میزان کشش و مقاومت فیلم در جدول ۲ مشاهده می‌شود. بالاترین میزان کشش در بین تیمارهای مورد بررسی با ۵۹/۳۷ درصد به فیلم کیتوزان- آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج تعلق داشت. همچنین کمترین میزان مقاومت کششی با ۱۴/۷۷ مگاپاسکال به این تیمار اختصاص داشت ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که تیمار شاهد با ۳۷/۸۹ درصد و ۳۹/۸۵ مگاپاسکال به ترتیب کمترین میزان کشش و بالاترین مقاومت کششی را از خود نشان داد ($p < 0.05$). با افزایش سطح اسانس به فیلم میزان کشش افزایش و مقاومت کششی کاهش یافت ($p < 0.05$).

اثر اسانس نارنج و ترکیب آن با فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم بر رفتار رشد ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگوی وانامی

نتایج تاثیر اسانس نارنج بر ویبریو پاراهمولایتیکوس در میگوی وانامی در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج این جدول، به جز روز اول، بار میکروبی در روزهای ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵ در تیمارهای ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج با یکدیگر و با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$) و در تمام روزهای بررسی، تیمار ۲ درصد

داد با افزایش سطح اسانس میزان باکتری نیز کاهش معنی داری داشت. در هر دو باکتری، تیمار شاهد تا روز ششم توانست سبب کنترل آنها در میگوی وانامی شود. فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج توانست تا روز پانزدهم میزان ویبریو و لیستریا در میگوی وانامی را کنترل کند ($p < 0.05$).

با اختلاف معنی دار در تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات با ۲ درصد اسانس نارنج اندازه گیری شد ($p < 0.05$). در انتهای دوره نگهداری، در تیمارهای فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم حاوی اسانس نارنج، میزان باکتری لیستریا مونوسیژنز در مقایسه با نمونه شاهد کمتر بود و نتایج نشان

جدول ۳- اثر اسانس نارنج بر رفتار رشد ویبریو پارهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیژنز در میگوی وانامی (LogCFU/g)

تیمار / روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
<i>ویبریو پارهمولایتیکوس</i>						
شاهد	۳/۰ ± ۲۵/۰۴ ^{Aa}	۴/۰ ± ۹۹/۰۷ ^{Ab}	۶/۰ ± ۷۵/۰۲ ^{Ac}	۷/۰ ± ۵۰/۱۰ ^{Ad}	۸/۰ ± ۶۹/۰۳ ^{Ae}	۹/۰ ± ۷۵/۱۰ ^{Af}
اسانس ۰/۵ درصد	۳/۰ ± ۲۰/۰۸ ^{Aa}	۴/۰ ± ۰۸/۰۶ ^{Bb}	۵/۰ ± ۶۵/۰۲ ^{Bc}	۶/۰ ± ۴۹/۰۳ ^{Bd}	۷/۰ ± ۸۳/۰۲ ^{Be}	۸/۰ ± ۰۴/۱۱ ^{Bf}
۱ درصد	۳/۰ ± ۲۳/۰۱ ^{Aa}	۴/۰ ± ۰۰/۰۰ ^{Cb}	۵/۰ ± ۲۰/۰۳ ^{Cc}	۶/۰ ± ۲۸/۰۵ ^{Cd}	۷/۰ ± ۱۴/۱۲ ^{Ce}	۷/۰ ± ۲۲/۰۹ ^{Cf}
۲ درصد	۳/۰ ± ۲۶/۰۵ ^{Aa}	۳/۰ ± ۶۹/۰۱ ^{Db}	۴/۰ ± ۱۵/۰۲ ^{Dc}	۵/۰ ± ۹۴/۰۸ ^{Dd}	۶/۰ ± ۳۳/۱۹ ^{De}	۷/۰ ± ۱۰/۰۴ ^{Df}
<i>لیستریا مونوسیژنز</i>						
شاهد	۳/۰ ± ۴۰/۵۲ ^{Aa}	۴/۰ ± ۸۱/۱۳ ^{Ab}	۶/۰ ± ۵۷/۰۳ ^{Ac}	۷/۰ ± ۱۰/۰۷ ^{Ad}	۷/۰ ± ۸۰/۱۱ ^{Ae}	۹/۰ ± ۹۱/۰۷ ^{Af}
اسانس ۰/۵ درصد	۳/۰ ± ۲۷/۱۷ ^{Aa}	۴/۰ ± ۷۴/۲۳ ^{Bb}	۶/۰ ± ۱۰/۰۵ ^{Bc}	۶/۰ ± ۷۷/۱۶ ^{Bd}	۷/۰ ± ۷۷/۱۵ ^{Be}	۸/۰ ± ۱۷/۱۰ ^{Bf}
۱ درصد	۳/۰ ± ۲۰/۲۳ ^{Aa}	۳/۰ ± ۹۸/۰۹ ^{Cb}	۴/۰ ± ۷۸/۱۹ ^{Cc}	۵/۰ ± ۴۱/۴۰ ^{Cd}	۷/۰ ± ۰۹/۰۶ ^{Ce}	۷/۰ ± ۳۹/۱۷ ^{Cf}
۲ درصد	۳/۰ ± ۵۱/۱۴ ^{Aa}	۳/۰ ± ۷۰/۱۱ ^{Db}	۴/۰ ± ۳۵/۴۲ ^{Dc}	۵/۰ ± ۱۰/۰۶ ^{Dd}	۶/۰ ± ۱۶/۰۴ ^{De}	۷/۰ ± ۰۸/۰۹ ^{Df}

حروف کوچک اختلاف معنی دار بین روزها در هر تیمار و حروف بزرگ اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می دهد ($p < 0.05$).

جدول ۴- اثر فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج بر رفتار رشد ویبریو پارهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیژنز در میگوی وانامی (LogCFU/g)

تیمار / روز	۰	۳	۶	۹	۱۲	۱۵
<i>ویبریو پارهمولایتیکوس</i>						
شاهد	۲/۰ ± ۰۰/۰۲ ^{Aa}	۴/۹۱۰ ± ۰۷ ^{Ab}	۶/۰ ± ۵۰/۰۲ ^{Ac}	۷/۰ ± ۴۷/۰۲ ^{Ad}	۸/۰ ± ۱۹/۰۱ ^{Ae}	۹/۰ ± ۱۵/۱۲ ^{Af}
فیلم و اسانس ۰/۵ درصد	۲/۰ ± ۰۱/۰۱ ^{Aa}	۳/۰ ± ۷۱/۰۸ ^{Bb}	۵/۲۰ ± ۰۱ ^{Bc}	۶/۰ ± ۷۴/۰۴ ^{Bd}	۷/۰ ± ۲۷/۱۳ ^{Be}	۸/۰ ± ۰۱/۱۸ ^{Bf}
فیلم و اسانس ۱ درصد	۲/۰ ± ۱۵/۰۴ ^{Aa}	۳/۰ ± ۴۶/۰۳ ^{Cb}	۴/۰ ± ۱۱/۰۵ ^{Cc}	۵/۰ ± ۱۹/۰۴ ^{Cd}	۷/۰ ± ۱۲/۱۹ ^{Ce}	۷/۰ ± ۰۴/۰۸ ^{Cf}
فیلم و اسانس ۲ درصد	۲/۰ ± ۰۴/۰۱ ^{Aa}	۳/۰ ± ۳۸/۰۲ ^{Db}	۴/۰ ± ۰۲/۰۲ ^{Dc}	۴/۰ ± ۳۹/۰۵ ^{Dd}	۶/۰ ± ۲۱/۰۷ ^{De}	۶/۰ ± ۹۷/۰۵ ^{Df}
<i>لیستریا مونوسیژنز</i>						
شاهد	۳/۰ ± ۰۱/۱۲ ^{Aa}	۳/۰ ± ۹۹/۰۱ ^{Ab}	۶/۰ ± ۳۰/۰۷ ^{Ac}	۷/۰ ± ۴۲/۰۱ ^{Ad}	۷/۰ ± ۷۲/۰۱ ^{Ae}	۸/۰ ± ۱۱/۰۵ ^{Af}
فیلم و اسانس ۰/۵ درصد	۳/۰ ± ۰۲/۱۱ ^{Aa}	۳/۰ ± ۶۵/۰۳ ^{Bb}	۶/۰ ± ۲۰/۰۵ ^{Bc}	۶/۰ ± ۱۵/۱۰ ^{Bd}	۷/۰ ± ۱۷/۱۱ ^{Be}	۷/۰ ± ۸۷/۱۵ ^{Bf}
فیلم و اسانس ۱ درصد	۳/۰ ± ۰۴/۰۳ ^{Aa}	۳/۰ ± ۳۳/۰۴ ^{Cb}	۴/۰ ± ۰۸/۱۰ ^{Cc}	۵/۰ ± ۱۱/۰۲ ^{Cd}	۷/۰ ± ۰۱/۰۴ ^{Ce}	۷/۰ ± ۱۹/۱۴ ^{Cf}
فیلم و اسانس ۲ درصد	۳/۰ ± ۰۱/۱۱ ^{Aa}	۳/۰ ± ۲۱/۰۱ ^{Db}	۳/۰ ± ۱۱/۰۲ ^{Dc}	۵/۰ ± ۰۱/۰۱ ^{Dd}	۶/۰ ± ۲۵/۰۲ ^{De}	۶/۰ ± ۷۰/۰۸ ^{Df}

حروف کوچک اختلاف معنی دار بین روزها در هر تیمار و حروف بزرگ اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان می دهد ($p < 0.05$).

Oulebsir و همکاران (۲۰۲۲) ترکیبات آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان اسانس نارنج را لینالول، لینالیل استات و آلفا ترپینئول گزارش کردند. همچنین Lin و همکاران (۲۰۲۱)،

بر اساس آنالیز اسانس برگ نارنج (جدول ۱)، فراوان ترین ترکیب موجود در اسانس نارنج، لینالول با ۳۴/۶۸ درصد بود.

حضور اسانس است که با یافته‌های Bonilla و همکاران (۲۰۱۲) در مورد فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن هم-خوانی دارد.

با توجه به نتایج جدول ۲، مقاومت کششی و میزان کشش روندی عکس با یکدیگر داشتند به این ترتیب با افزایش اسانس به فیلم مقاومت کششی کاهش ولی میزان کشش افزایش یافت به این ترتیب کمترین میزان مقاومت کششی و بیشترین میزان کشش در فیلم کیتوزان - آلژینات حاوی ۲ درصد اسانس نارنج اندازه‌گیری شد. Shojaee- Aliabadi و همکاران (۲۰۱۳) تبدیل پیوندهای قوی پلیمر-پلیمر کیتوزان با پیوندهای سست پلیمر-روغن در حضور اسانس، منجر به کاهش مقاومت کششی فیلم می-شود. Alizadeh و همکاران (۲۰۱۷) افزودن اسانس بنه به فیلم کیتوزان را عامل افزایش کشش گزارش کردند.

میانگین مقدار اولیه ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگوهای مورد بررسی به ترتیب در محدوده 2.3×10^6 Log CFU/g و 3.3×10^5 Log CFU/g بود که بر اساس (Nowzari et al., 2013) میزان مناسب باکتری فیله 3×10^3 Log CFU/g گزارش شده است، در محدوده موردنظر بود. این میزان اولیه ناشی از آلودگی در طول صید، برداشت و عمل‌آوری است. در میگوهای هر ۳ تیمار ۰/۵، ۱ و ۲ درصد اسانس نارنج، روند افزایش بار باکتریایی ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز با افزایش زمان نگهداری قابل مشاهده بود. در تیمار ۲ درصد اسانس نارنج، میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس تا روز دوازدهم نگهداری و لیستریا مونوسیتوزنز تا روز پانزدهم نگهداری در محدوده مجاز کمیته بین‌المللی تعیین ویژگی‌های میکروبیولوژی مواد غذایی یا ICMSF (7×10^6 Log CFU/g) قرار داشت. در دو تیمار ۰/۵ و ۱ درصد اسانس نارنج، بار میکروبی ویبریو پاراهمولایتیکوس در میگو تا روز نهم و پانزدهم و تیمار شاهد تا روز ششم در محدوده مجاز قرار داشت. در مورد لیستریا مونوسیتوزنز تیمار ۰/۵ و ۱ درصد

در بررسی ترکیبات اسانس چند گونه نارنج، ذکر کردند که اسانس استخراج شده به سبب داشتن ترکیبات لیمونن، تربیننول و لینالول، دارای فعالیت ضدباکتریایی بالایی است. شرایط جغرافیایی، فصل، زمان، مکان برداشت و استفاده از روش‌های مختلف استخراج می‌تواند بر نتایج تاثیر بگذارد (Azhdarzadeh and Hojjati, 2016).

دانستن اطلاعات در مورد شاخص‌های مکانیکی جهت طراحی فرآیند بسته‌بندی و پیش‌بینی توانایی آن‌ها در حفظ یکپارچگی فیلم در زمان بسته‌بندی، اهمیت بالایی دارد (Shojaee-Aliabadi et al., 2013). در مطالعه حاضر تاثیر افزودن اسانس به فیلم کیتوزان-آلژینات بر روی خواص فیلم تاثیر گذاشته است. یافته‌ها نشان داد که با افزایش سطح اسانس، ضخامت فیلم به طور معنی‌داری افزایش یافت که می‌توان آن را ناشی از گرفتار شدن ریز قطرات اسانس در فیلم و تشکیل ماتریس نرم و ساختار بیرون زده نسبت داد که منجر به افزایش ضخامت فیلم شده است. Alizadeh و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی خواص فیلم خوارکی حاوی اسانس صمغ بنه، نیز افزایش ضخامت فیلم در اثر افزودن اسانس را ناشی از محبوس شدن ذرات اسانس دانستند.

از طرفی افزودن اسانس به فیلم کیتوزان - آلژینات سدیم درصد حلالیت در آب را کاهش داد که آن را می‌توان ناشی از ایجاد پیوندهای عرضی بین ترکیبات اسانس و نیز گروه‌های آمیدی و استری کیتوزان دانست که با کاهش گرایش کیتوزان به آب، حلالیت فیلم را در آب کاهش داده است (Liu et al., 2021). Song و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تاثیر افزودن اسانس منگول به فیلم کیتوزان نیز کاهش حلالیت را مربوط به ایجاد پیوندهای فیلم با اسانس گزارش کردند که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. این کاهش نفوذپذیری با افزایش توانایی بخار آب در فیلم کیتوزان- آلژینات حاوی اسانس همراه بود که نشان‌دهنده کاهش پیوستگی و ایجاد منافذ ریز در ساختار فیلم در

امر لایه‌ای نیمه تراوا را ایجاد می‌کند که از نفوذ میکروارگانسیم‌ها به بافت پوشش‌دار جلوگیری می‌کند (Fujki et al., 2009). فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم حاوی ۲ درصد اسانس نارنج، بالاترین فعالیت ضدباکتریایی بر ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز را داشت و توانست تا پایان روز پانزدهم نگهداری میزان آنها را در میگوی وانامی در محدوده مجاز برای مواد غذایی نگه دارد. Benavides و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر فیلم آلژینات حاوی اسانس نارنج بر *E. coli*، *L. monocytogenes*، *Salmonella enteritidis* و *aureus* عنوان کردند که ترکیب اسانس نارنج و آلژینات به طور موثری قادر به کنترل رشد عوامل بیماری‌زا در مواد غذایی است. Ramos و همکاران (۲۰۲۳) اثرات ضدباکتریایی پوشش آلژینات سدیم را بررسی کردند و نشان دادند که ترکیب آلژینات سدیم و عصاره هیدروالکلی *Macrocystis pyrifera* فعالیت ضدباکتری فیلم را افزایش می‌دهد که در اثر مواد فنولی موجود در اسانس است. Kakaei و Shahbazi (۲۰۱۶) در بررسی تاثیر فیلم کیتوزان - ژلاتین در ترکیب با عصاره دانه انگور قرمز و اسانس *Ziziphora clinopodioides* بر بقای *Listeria monocytogenes* در فیله قزل‌آلا، عنوان کردند که این ترکیب کارایی بالایی در افزایش ماندگاری فیله قزل‌آلا داشته و توانست تقریباً بار باکتریایی را به میزان Log CFU/g ۱-۳ در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش دهد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. Yao و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی تاثیر فیلم کیتوزان-ژلاتین و اسانس لیمو افزایش خاصیت ضد میکروبی در مقابل *E. coli* را با افزایش غلظت اسانس گزارش کردند و آنها این امر را به افزایش قدرت ضد میکروبی اسانس لیمو مرتبط دانستند، زیرا مواد موجود در اسانس لیمو از دیواره سلولی باکتری عبور کرده و بر روی بقای سلول تاثیر می‌گذارد. Sayadi و همکاران (۲۰۲۱) در بررسی تاثیر فیلم سدیم-آلژینات و

اسانس تا روز نهم و شاهد تا روز ششم در محدوده مجاز قرار داشتند. مکانیسم فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی به حمله این اسانس‌ها به فسفولیپیدهای موجود در دیواره سلولی باکتری مربوط می‌شود که سبب افزایش نفوذ و تراوش سیتوپلاسم به خارج از سلول می‌شود (Degirmenci and Erkurt, 2020). Oulebsir و همکاران (۲۰۲۲) حضور ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی را به عنوان ترکیبات ضدباکتری کنترل رشد آنها ذکر کردند. Azhdarzadeh و Hojjati (۲۰۱۶) فعالیت ضد باکتریایی اسانس نارنج علیه *Saccharomyces cerevisiae* را ناشی از وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مونوترپن‌ها بخصوص لینالول (۵۹/۸۸ درصد اسانس) موجود در اسانس نارنج دانستند که با افزایش غلظت اسانس، قدرت ضدباکتری آنها نیز افزایش یافت که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

Benzaid و همکاران (۲۰۲۱) کاهش میزان *Streptococcus mutans* موجود در گوشت با افزودن اسانس نارنج را گزارش کردند که نشان دهنده تاثیر اسانس-های گیاهی در کاهش بار میکروبی مشابه یافته‌های تحقیق حاضر است.

روند افزایش میزان باکتری‌ها با افزایش زمان نگهداری در فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم نیز قابل مشاهده بود. Chidanandaiah و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی تاثیر پوشش خوراکی سدیم آلژینات بر میزان باکتری موجود در گوشت، عنوان کردند که سدیم آلژینات سبب از بین بردن میکروارگانسیم‌های عامل مسمومیت غذایی در مقایسه با شاهد شد که با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. آلژینات توانایی تولید کپسول‌هایی کوچک مقیاس (۱۰۰ میکرون با منافذ ۱۷ نانومتری) جهت ذخیره مواد آنتی‌اکسیدانی یا ضدباکتریایی نظیر اسانس را دارد. آلژینات سبب کاهش نسبت اسید گلوکورونیک به اسید منورونیک در ساختار ژل، سبب افزایش تخلخل در ژل آلژینات شده و این

زیست بودن این ترکیبات و از بین رفتن سریع آنها در محیط زیست می‌توان عنوان کرد که استفاده از فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم در ترکیب با اسانس نارنج به شکل موثری قادر به کاهش میزان ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگو وانامی شده و می‌توان از آن در صنعت غذا استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزودن آلژینات سدیم و اسانس نارنج در غلظت‌های مختلف به فیلم کیتوزان، به طور معنی‌داری بر خصوصیات فیلم تاثیر گذاشت. افزودن اسانس و آلژینات سدیم باعث افزایش ضخامت، کشش و نفوذپذیری به بخار آب شد. هم‌چنین ویژگی ضدباکتریایی فیلم در مقابل ویبریو پاراهمولایتیکوس و لیستریا مونوسیتوزنز در میگو نیز افزایش یافت. افزایش سطح اسانس نارنج به خاطر وجود میزان ماده فعال لینالول در اسانس، سبب شد که بالاترین قدرت ضدباکتریایی به تیمار فیلم کیتوزان-آلژینات سدیم در ترکیب با ۲ درصد اسانس نارنج تعلق گیرد که توانست سبب کاهش باکتری‌ها در میگوی وانامی تا پایان روز پانزدهم شود.

اسانس زیره سبز، افزایش فعالیت ضد میکروبی این فیلم را در مقابل *Pseudomonas spp.* *Enterobacteriaceae* و *L. monocytogenes* ناشی از افزایش غلظت اسانس گزارش کردند که هر دو مطالعه با یافته‌های تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

نتایج نشان داده که مکانیسم فعالیت کیتوزان به بر هم کنش بین گروه آمین و شارژ منفی غشاء دیواره سلولی که سبب گسسته شدن پروتئین سلولی و الکترولیت‌ها می‌شود، هم‌چنین این عملکرد همانند سدی در برابر اکسیژن عمل می‌کند و سبب به دام افتادن مواد مغذی و فلزات ضروری می‌شود (Hadidi et al., 2022). ترکیب کیتوزان با اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن محتوی پلی‌فنولیکی شامل هیدروکویانونون، کافئیک‌اسید، گالیک‌اسید و رسوراترول است. چنین نتیجه‌ای در مطالعات Rezaeian و همکاران (۲۰۲۱) نیز دیده شد. Raeisi و همکاران (۲۰۲۰) عنوان کردند که پلی‌فنول‌ها به سلول‌های انتقال‌دهنده پروتئین و کربوهیدرات‌هایی که مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند متصل و از رشد آنها جلوگیری می‌کند و این امر به دلیل کارایی بالاتر فیلم کیتوزان-آلژینات همراه با اسانس‌های *Artemisia dracunculus* و *Zataria multiflora* در افزایش ماندگاری فیله قزل‌آلای رنگین‌کمان است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد.

محلول بودن در آب و وزن مولکولی پایین کیتوزان (Qiu et al., 2022) و پایداری آلژینات (Ramos et al., 2023) ترکیبی کارآمد را برای تولید فیلم ایجاد می‌کنند. این موضوع در کنار خواص ضدباکتریایی اسانس و خاصیت هیدروفوبیک طبیعی، سبب می‌شود پروتئین درون فیلم مقاومت بیشتری به آب پیدا کرده و خاصیت انعطاف فیلم افزایش یابد (Yao et al., 2017) که این امر خود ماندگاری بالاتر مواد غذایی را ضمانت و تایید کننده نتایج یافته‌های تحقیق حاضر است. هم‌چنین با توجه به دوست‌دار محیط

منابع

1. ASTM. 1995. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96-95, Annual book of ASTM, Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
2. ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, In Annual book of ASTM standards designation D882, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
3. Alizadeh V. Baezagarm H. Nasehi B and Samavati V. 2017. Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing *Pistacia atlantica* gum essential oil. Iran Food Sci Tech Res J. 13: 584-593.
4. Azhdarzadeh F and Hojjati M. 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. Nut Food Sci Res. 3:43-50.
5. Benavides S. Villalobos-Carvajal R and Reyes J. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. J Food Engin, 110 (2): 232-239.
6. Bonilla J. Atarés L. Vargas M and Chiralt A. 2012. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food Hydrocolloids. 26(1): 9-16.
7. Benzaid C. Belmadani A. Tichati L. Djeribi R and Rouabhia M. 2021. Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil on *Streptococcus mutans* growth, biofilm formation and virulent genes expression. Antibiotics. 10: 54-60.
8. Chidanandaiah H. Keshri R.C and Sanyal M.K. 2007. Effect of sodium alginate coating with preservatives on the quality of meat paties during refrigerated ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) storage. J Muscle Foods. 20: 275-292.
9. Degirmenci H and Erkurt H. 2020. Chemical profile and antioxidant potency of *Citrus aurantium* L. flower extracts with antibacterial effect against foodborne pathogens in rice pudding. LWT Food Sci. Technol. 126: 109273-109281.
10. Dehghan H and Roomiani L. 2020. Antimicrobial activity of nanoclay films enriched with *Citrus aurantium* essential oil against indicator foodborne pathogens in fishery products. IJNSFT. 14: 103-111.
11. Fathimoghadam F. Shahamirian M. Roomiani L and Tadayoni M. 2023. Effect of gelatin-based film activated with Persian lime (*Citrus latifolia*) essential oil on the shelf life of shrimp. Food Measurement and Characterization. doi.org/10.1007/s11694-023-01839-2
12. Feng S. Tang Q. Xu Z. Huang K. Li H and Zou Z. 2023. Development of novel Co-MOF loaded sodium alginate based packaging films with antimicrobial and ammonia-sensitive functions for shrimp freshness monitoring. Food Hydrocolloids. 135. doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108193
13. Fujiki K. Matsuyama H and Yano T. 2009. Protective effect of sodium alginate against bacterial infection in common carp, *Cyprinus carpio* L. J Fish Dis. 17: 349 – 355
14. Hadidi M. Pouramin S. Adinepour F. Haghani S and Jafari S. 2020. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. Carbo Pol. 236: 116075- 116085.
15. ICMSF. 1986. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications, 2th ed, Toronto: University of Toronto Press, 1986 IT IS, 2017. http://www.bing.Com
16. Kakaei S and Shahbazi Y. 2016. 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 Sci Technol.* 72: 432-438.
17. Khorrami N. Radi M. Amiri S. and Julian Mc Clements D. 2021. Fabrication and characterization of alginate-based films functionalized with nanostructured lipid carriers. *Inter J Biol Macromol.* 182: 373-384.
 18. Lin X. Cao S. Sun J. Lu D. Zhong B and Chun J. 2021. The chemical compositions, and antibacterial and antioxidant activities of four types of citrus essential oils. *Molecules.* 26: 3412
 19. Liu D. 2006. Identification subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes* an important foodborn pathogen. *J Med Microbiol.* 55: 645-659
 20. Liu M. Zhu X. Zhang C. Zhao Z. and Lux Q. 2021. LuxQ- LuxU-LuxO pathway regulates biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Res.* 250: 126791.
 21. Liu T. Liu L. Gong X. Chi F. Ma Z. 2021. Fabrication and comparison of active films from chitosan incorporating different spice extracts for shelf life extension of refrigerated pork. *LWT.* 135: 110181
 22. Maghami M. Motalebi A.A and Anvar S.A.A. 2019. Influence of chitosan nanoparticles and fennel essential oils (*Foeniculum vulgare*) on the shelf life of *Huso huso* fish fillets during the storage. *Food Sci Nutr.* 7: 3030–3041.
 23. Ming Z. Su Y.C. DeWitt C.M. and Waite-Cusic J. 2018. Flow rate of deputation system has minimal impact on *Vibrio parahaemolyticus* decontamination in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J Food Saf.* 38: 12531-12541.
 24. Moazeni Jola B and Roomiani L. 2018. The effect of chitosan extracted from *Metapenaeus affinis* on the shelf life of grass carp fillets packed in vacuum. *Fisheries.* 3:295-308.
 25. Moradi T. Sharifan A and Larijani K. 2020. The effect of multilayered chitosan–pectin–*Mentha piperita* and lemon essential oil on oxidation effects and quality of rainbow trout fillet (*Oncorhynchus mykiss*) during refrigeration at $4\pm 1^\circ\text{C}$ storage. *Iran J Fish Sci.* 19: 2544-2559.
 26. Nehchiri N. Amiri S. and Radi M. 2021. Improving the water barrier properties of alginate packaging films by submicron coating with drying linseed oil. *Pack Technol Sci.* 34 (5): 283-295.
 27. Nowzari F. Shabanpour B and Ojagh S.M. 2013. Comparison of chitosaneglatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chem.* 141(3): 1667-1672
 28. Oulebsir C. Mefti-Korteby H. Djazouli Z.E. Zebib B and Merah O. 2022. Essential oil of *Citrus aurantium* L. leaves: composition, antioxidant activity, elastase and collagenase inhibition. *Agronomy.* 12: 1466.
 29. Qiu L. Ma H. Luo Q. Bai C. Xiong G. Jin S. Wang J. Zu X. Li H and Liao T. 2022. Preparation, characterization and application of modified starch/chitosan/sweet orange oil microcapsules. *Food.* 11: 2306.
 30. Rai S. Tyagi A. Kumar B.T.N and Reddy V.K. 2023. Isolation and characterization of *Aeromonas hydrophila* lytic phage, and evaluation of a phage cocktail against *A. hydrophila* contamination in fish fillet. *Food Control.* 145: 109460.
 31. Raeisi M. Hashemi M. Aminzare M. Ghorbani Bidkorpeh F. Ebrahimi M. Jannat B. Tepe B and Noori S.M.A. 2020. Effects of sodium alginate and chitosan coating combined with three different essential oils on microbial and chemical attributes of rainbow trout fillets. *J Aquatic Food Prod Technol.* 29 (3): 253-263.
 32. Ramos J. Villacrés N.A Cavalheiro É.T.G Alarcón H.A and Valderrama A.C. 2023. Preparation of sodium alginate films incorporated with hydroalcoholic extract of *Macrocystis pyrifera*. *Food Raw Mater.* 11(1): 64–71.

33. Rezaeian M. Khanzadi S. Hashemi M and Azizzadeh M. 2021. Antimicrobial Effect of gel-type nanoemulsion of chitosan coating containing essential oils of *Zataria multiflora* and *Bunium persicum* on *Pseudomonas* artificially inoculated on to salmon fillets. *Mljgoums*. 15(3): 13-20.
34. Rhim J.W. 2004. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technol*. 37: 323-330.
35. Roomiani L. Soltani M. Akhondzadeh Basti A and Mahmoodi A. 2017. Effect of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil and Nisin on *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae* in a Food Model System. *Aquatic Food Pro Tech*. 26: 1189- 1198
36. Salama A and Hasanin M. 2020. Synthesis and antimicrobial properties of new chitosan derivatives containing guanidinium groups. *Carbohydr Polym*. 241: 116363
37. Sayadi M. Mojaddar Langroodi A. Amiri S and Radi M. 2022. Effect of nanocomposite alginate- based film incorporated with cumin essential oil and TiO₂ nanoparticles on chemical, microbial, and sensory properties of fresh meat/beef. *Food Sci Nutri*. 10: 1401– 1413
38. Shojaee-Aliabadi S. Hosseini H. Mohammadifar M.A. Mohammadi A. Ghasemlou M. Ojagh S.M and Khaksar R. 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-Carrageenan films containing *satureja hortensis* essential oil. *Inter J Biol Macromol*. 52: 116-124.
39. Song X. Liu L. Wu X. Liu Y. Yuan J. 2021. Chitosan-Based Functional Films Integrated with Magnolol: characterization, antioxidant and antimicrobial activity and pork preservation. *Int J Mol Sci*. 2021, 22: 7769.
40. Sun X. Liu Y. Jiang P. Song S. and Ai C. 2021. Interaction of sulfated polysaccharides with intestinal Bacteroidales plays an important role in its biological activities. *Int J Biol Macromol*. 168: 496–506.
41. Yao Y. Shao H. Peng Q and Huang Y. 2017. Antibacterial activity and physical properties of fish Gelatin-chitosan edible films supplemented with D-Limonene. *Inter J Poly Sci*. 5: 1-9
42. Zhang X. Sun J. Han Z. Chen F. Lv A. Hu X. Sun X. Qi H. and Guo Y. 2021. *Vibrio parahaemolyticus* alters the community composition and function of intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 544: 737061.
43. Zhang B. Peng H. Lin Y and Cai K. 2023. Effects of ginger essential oil on physicochemical and structural properties of agar-sodium alginate bilayer film and its application to beef refrigeration. *Meat Science*. 198. doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109051
44. Zolfi M. Khodaiyan F. Mousavi M and Hashemi M. 2014. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation, *Carbo Poly*. 109: 118-125.

The effect of chitosan-sodium alginate film containing citrus essential oil on the growth behavior of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* in *Litopenaeus vannamei*

Negin Gholami¹, Roomiani Laleh^{2*}, Tadayoni Mehrnosh³

1-Msc, Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2- Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

3- Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

Abstract

In this study, the antibacterial activity of chitosan-sodium alginate film in combination with *Citrus aurantium* essential oil in order to control the growth of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* inoculated to *Litopenaeus vannamei* and also the properties of the film under refrigerated conditions for 15 days, was investigated. The treatments included chitosan-sodium alginate film, chitosan-sodium alginate film containing 0.5, 1 and 2% citrus essential oil. The results showed that the lowest amount of tensile strength (14.77%), water solubility (15.31%) and the highest amount of permeability to water vapor (1.79×10^{-10} g/msPa) in the film treatment with 2% citrus essential oil was observed. Also, adding essential oil to the film increased the thickness (0.171 mm) and elasticity (59.37%) compared to the control ($p < 0.05$). The lowest amount of *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* was measured in the chitosan-sodium alginate film treatment containing 2% citrus essential oil ($p < 0.05$). During 15 days of storage, chitosan-sodium alginate film containing essential oil could reduce *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* compared to the control treatment in shrimp ($p < 0.05$). Chitosan-sodium alginate film containing 2% citrus essential oil delayed the growth of *V. parahemolyticus* and *L. monocytogenes* by 9 days compared to the control treatment.

Keywords: *Citrus aurantium* essential oil, Chitosan- sodium alginate film, *Litopenaeus vannamei*