



## ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی، ضد میکروبی و مقاومت به آب فیلم نانوکامپوزیتی پروتئین میوفیبریل - نانوفیبر سلولز در ترکیب با اسانس پونه کوهی

\* محسن کاظمی<sup>۱</sup>، بهاره شعبانپور<sup>۲</sup> و پرستو پورعاشوری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فراآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

<sup>۲</sup> استاد گروه فراآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

<sup>۳</sup> استادیار گروه فراآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲۸

### چکیده

در این تحقیق فیلم زیست نانوکامپوزیت پروتئین میوفیبریل - نانوفیبر سلولز (NFC<sup>۱</sup> ۰/۴٪) تولید شد و با هدف فعال‌سازی و کاهش حساسیت آن به آب، غلظت‌های مختلف (۲ و ۱/۵ درصد) اسانس پونه کوهی در ماتریکس زیست پلیمر شرکت داده شد. در این راستا ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، نوری و همچنین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های مختلف بررسی شد. حضور اسانس در ماتریکس زیست پلیمر پایداری مکانیکی فیلم‌ها را کاهش داد ( $p < 0/05$ ). هرچند با افزودن اسانس نفوذپذیری فیلم‌های فعال به بخار آب افزایش نشان داد اما این فیلم‌ها حلالیت و تورم‌پذیری به مراتب کمتری نسبت به فیلم‌های نانوکامپوزیت ارائه دادند ( $p < 0/05$ ). افزایش زاویه تماس و کاهش رطوبت فیلم‌های فعال نیز نشان دهنده افزایش خاصیت آبگریزی و مقاومت به آب آنها بود. بررسی خواص میکروبی فیلم‌های مختلف نیز نشان داد که فیلم‌های فعال محتوی هر دو غلظت اسانس خواص ضد میکروبی قابل قبولی در برابر ۳ گونه باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* نشان دادند.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئین میوفیبریل، فیلم، اسانس، نانوفیبر سلولز، خواص ضد میکروبی

\* مسئول مکاتبه: [kazemi\\_mohsen@yahoo.com](mailto:kazemi_mohsen@yahoo.com)

## مقدمه

در میان مواد اصلی بسته‌بندی، پلاستیک‌های تولیدی از نفت از نیمه قرن بیستم به بعد به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند که به سبب عدم تجزیه‌پذیری سبب مشکلات جدی زیست محیطی شده‌اند (ریم و همکاران، ۲۰۱۳). در نتیجه در سال‌های اخیر تحقیقات بیشتر بر تولید فیلم‌های خوراکی/ زیست تخریب‌پذیر از پلیمرهای طبیعی متمرکز شده است (پیرس و همکاران، ۲۰۱۱). زیست پلیمرها موادی هستند که حداقل یک مرحله از فرآیند تخریب شان از طریق متابولسیم طبیعی موجودات زنده صورت می‌گیرد (سورنتینو و همکاران، ۲۰۰۷) و می‌توانند به‌عنوان سد کننده گازها، و همچنین تکمیل کننده انواع دیگر بسته‌بندی به‌کار روند. پروتئین‌ها به دلیل فراوانی نسبتاً بالا، توانایی تشکیل فیلم و کیفیت مغذی مناسب می‌توانند به‌طور گسترده برای تهیه فیلم‌های خوراکی استفاده شوند (لیمپان و همکاران، ۲۰۱۰). از میان انواع پروتئین، پروتئین‌های میوفیبریل ماهی می‌توانند برای تهیه فیلم‌هایی با شفافیت و استحکام خوب استفاده شوند، زیرا پروتئین‌های میوفیبریل کاملاً کشسان بوده و توانایی تشکیل زمینه پیوسته‌ای را در طی خشک شدن فیلم دارند (لیمپان و همکاران، ۲۰۱۲). با این وجود، به‌طور کلی خصوصیات مکانیکی فیلم‌های پروتئینی ضعیف است و در مقابل بخار آب بازدارندگی پایینی دارند. از این‌رو از روش‌هایی مثل استفاده از نانوذرات برای بهبود خواص عملکردی فیلم‌ها استفاده می‌شود (پیرس و همکاران، ۲۰۱۳). زیست نانوکامپوزیت‌ها مفهوم جدیدی از مواد ترکیبی و کاربردی هستند که به وسیله شرکت دادن تقویت کننده‌هایی با حداقل یک بعد در مقیاس نانو در بستر پلیمر طبیعی تولید می‌شوند. نانوفیبرهای طبیعی سلولز به‌دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد و جذابی از قبیل زیست

تخریب‌پذیری، هزینه مناسب، نسبت ابعاد بالا و وزن پایین به‌عنوان یک تقویت کننده توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (ساوادکار و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین اخیراً محققان بر استفاده از نانوکامپوزیت‌ها در تولید انواع جدیدی از بسته‌بندی‌های فعال با شرکت ترکیبات ضد میکروب تمرکز داشته‌اند (وو و همکاران، ۲۰۱۴) و با توجه به مشکلات ناشی از مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی، مواد ضد میکروب طبیعی در این رابطه توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (داویدسون و زیوانوویچ، ۲۰۰۳). یک دسته از مواد ضد میکروب طبیعی، اسانس‌های روغنی گیاهی مثل اسانس پونه کوهی می‌باشند که ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی این ترکیبات می‌توانند نقش مهمی را در فعالیت ضد میکروبی آن‌ها ایفا نمایند (هالی و پاتل، ۲۰۰۵). همچنین این ترکیبات روغنی می‌توانند به‌عنوان بهبود دهنده خواص فیزیکی فیلم‌های خوراکی و کاهش حساسیت آن‌ها در برابر آب به‌کار گرفته شوند. با توجه به مطالب عنوان شده، در این تحقیق ابتدا فیلم زیست نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز تولید شد و سپس اثر حضور اسانس روغنی پونه کوهی بر خواص مختلف فیزیکی، مکانیکی و ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**مواد مصرفی:** ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) تهیه شده به‌صورت تازه از بازار ماهی فروشان گرگان، نانوفیبر سلولز (متوسط قطر فیبرها ۳۲ نانومتر و خلوص بیش از ۹۸ درصد) (نانو نوین پلیمر)، گلیسرول (کیان کاوه آزما)، سدیم هیدروکسید (NaOH) و هیدروکلریک اسید (HCl) (Applichem)، نمک (NaCl)، اسانس پونه کوهی (باریج اسانس)، محیط‌های کشت Brain Heart

درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و فیلم‌های حاصل به منظور انجام آزمون‌های مربوطه در کیسه‌های پلی‌اتیلنی نگهداری شدند.

### ارزیابی ویژگی‌های فیلم‌ها

**ضخامت:** سنجش میزان ضخامت نمونه‌ها با استفاده از ریزسنج دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر (Mitutoyo, Japan) انجام گرفت. نه نقطه از هر نمونه برای اندازه‌گیری انتخاب شد. میانگین ضخامت‌های به دست آمده برای تعیین میزان مقاومت کششی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

**تعیین خواص مکانیکی:** خواص مکانیکی با استفاده از دستگاه تجزیه و تحلیل بافت (TexVol, Sweden) ارزیابی شد. فیلم‌ها به شکل مستطیل در ابعاد ۱۰×۲/۵۴ سانتی‌متر بریده و به تعادل رطوبتی رسیدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵۰ میلی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. حداقل سه تکرار برای هر فیلم در نظر گرفته شد. فاکتورهایی شامل مقاومت به کشش (TS<sup>۱</sup>) و درصد افزایش طول تا نقطه پاره شدن (EAB<sup>۲</sup>) طبق استاندارد ASTM D882-02 از روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل به دست آمدند (ای اس تی ام، ۲۰۰۲).

**تعیین میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب (WVP<sup>۳</sup>):** نفوذپذیری فیلم‌ها بر اساس روش E96 مصوب ASTM اندازه‌گیری شد (ای اس تی ام، ۲۰۱۰). فیلم‌ها پس از رسیدن به تعادل رطوبتی توسط گریس روی سطح سلول‌های اندازه‌گیری فیکس شده و درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار داده شدند. آب در

Muller Hinton Agar, Infusion Broth (QUELAB).

**تولید پروتئین میوفیبریل:** ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) به صورت تازه از بازار ماهی فروشان شهر گرگان تهیه شده و پس از شست و شو با آب، استخوان‌گیری شد. گوشت چرخ شده حاصله به منظور استخراج پروتئین‌های میوفیبریل مورد استفاده قرار گرفت (لیمپان و همکاران، ۲۰۱۲). بدین منظور ابتدا گوشت چرخ شده ماهی با ۳ برابر حجم خودش آب مقطر سرد مخلوط شده و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه هموزن شد. سپس توسط یک پارچه نایلنی آبیگری شده و در مرحله بعد گوشت چرخ شده با ۵ برابر حجم خودش آب نمک ۰/۵ میلی مولار مخلوط و متعاقباً هموزن و آبیگری گردید. فرآیند شست و شو دو بار تکرار شد.

**تهیه فیلم‌های زیست‌نانوکامپوزیت فعال:** تولید محلول فیلم‌ساز از پروتئین‌های میوفیبریل ماهی کپور نقره‌ای به روش لیمپان و همکاران (۲۰۱۲) با کمی اصلاح انجام شد. در مرحله بعد محلول ژلی سفید رنگ و التراسوند شده نانوفیبرهای سلولز با نسبت (وزن پروتئین/ وزن) ۰/۴ درصد (بهینه مراحل قبل) به محلول پروتئینی افزوده شده و به منظور توزیع مناسب نانوذرات، محلول به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۸۰۰۰rpm همگن شد (تروواتی و همکاران، ۲۰۱۲). اسانس پونه کوهی با دو غلظت ۲ و ۱/۵ درصد (حجمی/ حجمی) به محلول فیلم ساز افزوده شده و برای ایجاد امولسیون یکنواخت به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۳۵۰۰rpm تحت عمل هم زدن قرار گرفت (پیرس و همکاران، ۲۰۱۳).

قبل از این‌که محلول‌های فیلم‌ساز به داخل پلیت‌های لبه‌دار (۲۰×۲۰cm) ریخته شوند، تحت شرایط خلا حباب‌زدایی شدند. محلول‌ها در دمای ۲۶

- 1- Tensile Strength
- 2- Elongation at break
- 3- Water vapor permeability

تعیین میزان جذب رطوبت: نمونه‌ها ابتدا به مدت یک هفته درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند سپس وزن اولیه آن‌ها مشخص شد. در مرحله بعد فیلم‌ها درون ظروف محتوی آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. فیلم‌ها به صورت دوره‌ای و در فواصل زمانی معین از ظرف خارج و قبل از وزن کردن سطح آن‌ها به آرامی توسط کاغذ صافی خشک شده و توزین نمونه تا رسیدن به وزن ثابت ادامه پیدا کرد. میزان جذب رطوبت از رابطه زیر محاسبه گردید (لاورگنا و همکاران، ۲۰۱۰).

$100 \times [\text{وزن فیلم قبل از غوطه‌وری} / (\text{وزن فیلم قبل از غوطه‌وری} - \text{وزن فیلم پس از غوطه‌وری})] = \text{جذب رطوبت (درصد)}$

سانتی‌گراد به شکل ملایمی تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها توسط کاغذهای صافی که از قبل خشک و توزین شده بودند فیلتر شدند و مجدداً در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. درصد حلالیت و رطوبت فیلم‌ها از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (عبدالهی و همکاران، ۲۰۱۳).

$(\text{وزن فیلم خشک}) / (100 \times (\text{وزن فیلم خشک بعد از غوطه‌وری} - \text{وزن فیلم خشک})) = \text{میزان حلالیت (درصد)}$

$(\text{وزن فیلم اولیه}) / (100 \times (\text{وزن فیلم خشک} - \text{وزن فیلم اولیه})) = \text{میزان رطوبت (درصد)}$

سنجش رنگ سطحی، کدورت و میزان عبور نور از فیلم‌ها: به منظور سنجش میزان رنگ سطحی از دستگاه رنگ‌سنج (BYK Gardner, USA) استفاده گردید. نمونه‌ها روی کاشی استاندارد سفید رنگ قرار گرفتند و ۳ فاکتور  $L^*$  (شفافیت)،  $a^*$  (+ قرمز / - سبز) و  $b^*$  (+ زرد / - آبی) برای آن‌ها تعیین گردید. همچنین برای محاسبه اختلاف رنگ نمونه‌ها ( $\Delta E$ )، داده‌های به دست آمده برای سه فاکتور فوق مرتبط با مرجع و نیز سه فاکتور  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  مرتبط با هر نمونه در رابطه زیر قرار داده شد (اجاق و همکاران، ۲۰۱۰).

دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل  $10^3 \times 2/337$  پاسکال ایجاد می‌کند. سلول در لحظه صفر و ۸ ساعت پس از شروع آزمایش توزین و میزان تغییرات وزنی آن‌ها محاسبه شد. نفوذپذیری به بخار آب طبق رابطه زیر به دست آمد.

$WVP$  ( $10^{-10} \text{ g/ms Pa}$ ) نفوذپذیری به بخار آب  
 $W(=)$  کاهش وزن  $X(X)$  میانگین ضخامت فیلم  
 $A(/)$  سطح در معرض فیلم  $t(X)$  زمان  $\Delta P(X)$  اختلاف فشار دو سمت فیلم

اندازه‌گیری میزان رطوبت و حلالیت فیلم‌ها: نخست نمونه‌های فیلم (ابعاد  $4 \times 4$  سانتی‌متر) توزین شده درون پتری دیش‌هایی با وزن مشخص قرار داده شدند. فیلم‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک شده سپس وزن شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها درون ظروف محتوی آب مقطر غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه

سنجش میزان زاویه تماس فیلم‌ها: اندازه‌گیری زاویه تماس فیلم‌ها با روش قطره چسبیده<sup>۱</sup> که یک روش متداول در تعیین میزان آبگریزی سطوح جامد می‌باشد انجام شد. بدین منظور، ۵ میکرولیتر آب دیونایز توسط دستگاه (Kruss G10, Germany) بر روی نمونه‌ها قرار داده شد و زاویه تماس قطره با فیلم در زمان اولیه گزارش گردید. در این آزمون برای هر کدام از نمونه‌ها، ۵ تکرار در نظر گرفته شد.

1- Sessile drop

مختلف از آزمون دانکن در سطح  $p < 0.05$  استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام گرفت.

### نتایج و بحث

**خواص مکانیکی:** نتایج مرتبط با ویژگی‌های مکانیکی فیلم نانوکامپوزیت و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت فعال در جدول ۱ ارائه شده است. افزودن اسانس به‌طور کلی بر استحکام فیلم‌ها تأثیر منفی داشته و میزان آن را نسبت به فیلم نانوکامپوزیت به شکل معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0.05$ ). همچنین حضور اسانس پونه تا حدی فیلم‌ها را کشسان تر کرد به‌طوری که با افزایش غلظت آن درصد کشسانی فیلم‌ها نیز بیشتر شد و به حدود ۸۶/۱۰ درصد در فیلم‌های محتوی ۲ درصد اسانس رسید. بررسی خواص مختلف مکانیکی فیلم‌ها از جنبه نیاز پلیمرهای خوراکی به داشتن استحکام و کشسانی مطلوب و همچنین عاری بودن از نقص‌هایی نظیر حفره و شکستگی‌های ریز مهم است (پردا و همکاران، ۲۰۱۱). در مورد کاهش TS فیلم‌های فعال می‌توان گفت که افزودن درصد بالای اسانس به ماتریکس پلیمری فیلم‌های نانوکامپوزیت سبب برهم خوردن نظم ساختاری پلیمر و تشکیل ماتریکسی ناهمگن، نا پیوسته و ضعیف شده و در نتیجه این تغییرات خواص کیفی مختلف فیلم‌های تولیدی از جمله TS تضعیف می‌شود. این نتایج با یافته‌های برخی تحقیقات مشابه در زمینه بررسی اثر اسانس بر خواص مکانیکی فیلم‌های خوراکی مطابقت داشت (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱۴؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲) اما اجاق و همکاران (۲۰۱۰) نتایج متفاوتی را در این رابطه گزارش کردند. افزایش میزان کشسانی (EAB) در فیلم‌های فعال توام با افزایش غلظت اسانس نیز احتمالاً به این دلیل است که اسانس‌ها می‌توانند به‌عنوان نرم‌کننده عمل کرده و

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

جهت سنجش میزان عبور نور و کدورت فیلم‌ها، نمونه‌های فیلم (۴ × ۱ سانتی‌متر)، جهت انجام آنالیز درون سلول‌های اسپکتروفتومتری قرار گرفتند. به منظور سنجش میزان عبور نور و کدورت، به ترتیب از طول موج ۷۰۰-۲۰۰ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر برای اسکن استفاده گردید. جهت محاسبه میزان کدورت فیلم‌ها از رابطه زیر استفاده شد:

ضخامت فیلم / میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر = کدورت فیلم

### بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌های محتوی

**اسانس پونه کوهی:** ارزیابی خواص ضد میکروبی فیلم‌ها با استفاده از آزمون دیسک به روش نفوذ در محیط آگاردار انجام شد. نخست نمونه‌های فیلم با قطر ۱ سانتی‌متر تحت شرایط استریل تهیه و روی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح شده با باکتری‌های هدف ( $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>) قرار داده شدند. کلیه پلیت‌ها به‌منظور ممانعت از هدر رفتن رطوبت به‌طور کامل با پارافیلیم پوشیده شده و بعد از ۲ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شدند. ارزیابی میزان هاله بازدارندگی تیمارهای مختلف ۲۴ ساعت بعد از شروع انکوباسیون انجام گرفت. اختلاف مساحت هاله‌های بازدارندگی از مساحت دیسک ( $mm^2$ ) به‌عنوان شاخص فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شد (گومز و همکاران، ۲۰۱۰).

### تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با

نرم‌افزار SPSS انجام گرفت که در آن جهت بررسی اختلاف بین داده‌های حاصل از ارزیابی ویژگی‌های مختلف فیلم‌ها، از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. همچنین جهت تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای

انعطاف‌پذیری زنجیره‌های پلیمر را افزایش دهند (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵). از طرفی مایع بودن اسانس‌ها در دمای اتاق و حضور آن‌ها به شکل قطره‌های روغن در فیلم می‌تواند سبب تغییر شکل ساختاری آن شده و در افزایش انعطاف‌پذیری فیلم‌ها مؤثر بوده باشد (احمد و همکاران، ۲۰۱۲).

جدول ۱- خواص مکانیکی فیلم‌های نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی اسانس پونه کوهی.

نوع فیلم	ضخامت فیلم (mm)	مقاومت کششی فیلم (MPa)	کشسانی فیلم (%)
پ- سلولز ۰/۴٪	۰/۰۶۳±۰/۰۰۱ <sup>b</sup>	۷/۹۴±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۸۳/۷۳±۲/۶۹ <sup>a</sup>
پ- سلولز ۱/۵٪-۰/۴٪ پونه	۰/۰۷۳±۰/۰۰۶ <sup>a</sup>	۶/۰۳±۰/۲۸ <sup>b</sup>	۸۳/۲۲±۳/۳۴ <sup>a</sup>
پ- سلولز ۲٪-۰/۴٪ پونه	۰/۰۷۶±۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	۵/۸۰±۰/۵۹ <sup>b</sup>	۸۶/۱۰±۲/۲۵ <sup>a</sup>

حروف متفاوت (a, b...) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح  $p < 0/05$  است.

داده‌ها به صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

پ: پروتئین؛ سلولز: نانوفیبر سلولز؛ پونه: اسانس پونه کوهی

درصد اسانس بود که این پدیده می‌تواند با محتوای بیشتر اسانس و فراریت آن مرتبط باشد که سبب شد محتوای رطوبت این فیلم‌ها بیشتر به‌نظر برسد. این نتایج با مشاهدات تحقیق مشابه انجام شده توسط ما و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت.

مقایسه تیمارهای مختلف به‌کار رفته از جنبه تأثیر بر میزان حلالیت فیلم‌ها (جدول ۲) نشان داد که افزودن اسانس به فیلم نانوکامپوزیت سبب کاهش معنی‌دار حلالیت فیلم‌ها شد ( $p < 0/05$ ). این شاخص با افزایش میزان اسانس در ماتریکس پلیمر کاهش بیشتری نشان داد. حلالیت نشان دهنده مقاومت فیلم‌ها در برابر آب بوده و برای پلیمرهای مورد استفاده در بسته بندی مواد غذایی با فعالیت آبی بالا و یا زمانی که فیلم‌ها در تماس مستقیم با آب قرار می‌گیرند و همچنین در فیلم‌هایی که به‌عنوان نگهدارنده غذایی عمل می‌کنند فاکتوری مهم محسوب می‌شود (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ عبدالهی و همکاران، ۲۰۱۳) بنابراین یکی از اهداف این تحقیق کاهش حلالیت فیلم‌های تولیدی به‌وسیله افزودن اسانس روغنی بود. کاهش حلالیت فیلم‌های فعال در قیاس با فیلم نانوکامپوزیت می‌تواند با ماهیت آبگریز

خواص فیزیکی فیلم‌های تولیدی (درصد حلالیت، رطوبت، تورم‌پذیری، نفوذپذیری به بخار آب و زاویه تماس): نتایج مرتبط با بررسی خواص مختلف فیزیکی فیلم‌های تولیدی در جدول ۲ ارائه شده است. طبق نتایج افزودن ترکیب روغنی ضد میکروب به فیلم نانوکامپوزیت محتوای رطوبت آن را به شکل معنی‌داری کاهش داد ( $p < 0/05$ ). شاخص رطوبت نمایانگر کل حجم اشغال شده ریزساختار شبکه‌ای فیلم توسط ملکول‌های آب است در حالی‌که شاخص حلالیت با میزان آب دوستی فیلم‌ها مرتبط است (جیانگ و همکاران، ۲۰۱۰). کمتر بودن محتوای رطوبت فیلم‌های فعال در مقایسه با فیلم نانوکامپوزیت احتمالاً به حضور ترکیبات روغنی در بستر شبکه‌ای پلیمر و در نتیجه ممانعت آن‌ها از حضور ملکول‌های آب در اثر تقویت خاصیت آبگریزی فیلم بر می‌گردد. همچنین پر شدن فضاهای خالی موجود توسط اسانس نیز می‌تواند عامل دیگری برای این پدیده باشد. نتایج مشابه و متفاوتی در این رابطه به ترتیب توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۰) و جوکی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شد. از طرفی میزان رطوبت فیلم محتوی ۲ درصد اسانس نیز کمی بیشتر از فیلم محتوی ۱/۵

نتایج مرتبط با بررسی میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های مختلف تولیدی در جدول ۲ گزارش شده است. طبق نتایج این شاخص در فیلم‌های فعال و در اثر حضور اسانس پونه کوهی افزایش یافت ( $p < 0/05$ ). از طرفی با افزایش اسانس تا سطح ۲ درصد این شاخص نسبت به فیلم‌های محتوی اسانس در سطح ۱/۵ درصد به شکل معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). احتمالاً به این دلیل که نفوذ آب در فیلم از طریق بخش‌های آبدوست آنها صورت می‌گیرد در حالی که اسانس‌ها دارای طبیعت آبگریز بوده و در غلظت‌های بالاتر از طریق افزایش نسبت نواحی آبگریز به آبدوست می‌توانند میزان نفوذپذیری به بخار آب را کاهش دهند (هرناندز، ۱۹۹۴). افزایش کلی WVP فیلم‌های فعال محتوی اسانس نسبت به فیلم نانوکامپوزیت را می‌توان به تأثیر منفی اسانس بر ریزساختار فیلم‌های تولیدی نسبت داد. این تغییرات منفی می‌توانند سبب افزایش منافذ عبور بخار آب از پلیمرهای تولیدی شده و در نتیجه سبب افزایش WVP شده باشند. از طرفی در فرمول محاسبه WVP، بین این شاخص و میزان ضخامت رابطه معکوس وجود دارد و در نتیجه می‌توان گفت بالاتر بودن ضخامت فیلم‌های محتوی اسانس می‌تواند عاملی برای بیشتر به‌نظر رسیدن WVP در این نوع از فیلم‌ها باشد. نتایج مشابهی توسط محققان دیگر در زمینه کاربرد اسانس در تولید فیلم‌های فعال گزارش شده است (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱۴؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی اجاق و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که با کاربرد اسانس دارچین در بستر پلیمر کیتوزان میزان WVP فیلم‌ها کاهش یافت.

بررسی نتایج مرتبط با سنجش زاویه تماس سطح صاف فیلم‌های تولیدی در جدول ۲ حاکی از آن است که حضور اسانس پونه در فیلم نانوکامپوزیت به شکل

اسانس مرتبط باشد. ترکیبات غیر قطبی موجود در اسانس به شکل مطلوب آبگریزی بستر پلیمر نانوکامپوزیت را افزایش داده و نفوذ آب در ساختار آن را کاهش دادند. همچنین تشکیل برهمکنش‌هایی بین ترکیبات اسانس پونه و گروه‌های هیدروکسیل ماتریکس پلیمر می‌تواند موجب کاهش میزان در دسترس بودن آن‌ها برای برقراری پیوند با ملکول‌های آب شده و در کاهش میزان حلالیت فیلم‌ها مؤثر باشد. جایگزینی بالای گلیسرول موجود در فیلم با اسانس و ترکیبات روغنی می‌تواند دلیل دیگری برای کاهش آبدوستی و حلالیت فیلم‌ها در نتیجه کاهش مواد محلول در آب موجود در فیلم باشد (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲). در رابطه با تأثیر افزودن اسانس‌های روغنی بر میزان حلالیت پلیمرهای خوراکی نتایج مشابه (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲؛ اجاق و همکاران، ۲۰۱۰) و متفاوتی (جوکی و همکاران، ۲۰۱۴) گزارش شده است.

درصد تورم‌پذیری نیز به نوعی نشان دهنده میزان حساسیت فیلم‌ها در حضور آب است. افزودن ترکیب ضد میکروب (اسانس) به فیلم نانوکامپوزیت به‌طور کلی سبب کاهش درصد تورم‌پذیری آن شد ( $p < 0/05$ ) (شکل ۲). قبلاً توضیح داده شد که طبیعت هیدروفوب اسانس شرکت‌کننده در فیلم نانوکامپوزیت می‌تواند سبب افزایش آبگریزی فیلم‌ها شده و متعاقباً نفوذ آب به درون بستر زیست پلیمر و تورم آن را کاهش دهد (ما و همکاران، ۲۰۱۶). نتایج مشابهی در این زمینه توسط سایر محققان (ما و همکاران، ۲۰۱۶؛ عبدالمی و همکاران، ۲۰۱۲) گزارش شده است. همچنین تأثیر اسانس‌ها بر افزایش تورم‌پذیری فیلم‌های تولیدی از آگار محتوی نانوذرات سلولز توسط عاطف و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شده است.

اسانس با طبیعت آبرگیز است که آبرگری سطح را افزایش داده و متعاقباً از ورود آب به داخل ساختار زیست پلیمر ممانعت می‌کند (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵). در این زمینه نتایج مشابهی توسط محققان دیگر گزارش شده است (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ اجاق و همکاران، ۲۰۱۰).

معنی‌داری سبب افزایش زاویه تماس فیلم‌های حاصل شد ( $p < 0/05$ ) به طوری که این شاخص از ۷۸/۳۶ در فیلم نانوکامپوزیت به میزان ۹۰/۸۳ در فیلم‌های محتوی ۲ درصد اسانس رسید. در این رابطه می‌توان گفت که افزایش میزان زاویه تماس فیلم‌های فعال در قیاس با فیلم نانوکامپوزیت احتمالاً ناشی از حضور

جدول ۲- خواص فیزیکی فیلم‌های نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی اسانس پونه کوهی.

نوع فیلم	رطوبت (درصد)	حلالیت (درصد)	تورم‌پذیری (درصد)	زاویه تماس در زمان اولیه (درجه)	نفوذپذیری به بخار آب ( $10^{-10}$ g/ms Pa)	ضخامت (mm)
پ- سلولز ۰/۴٪	۲۹/۴۸±۱/۲۸ <sup>a</sup>	۳۳/۱۳±۱/۴۵ <sup>a</sup>	۱۶۱/۱۸±۵/۱۱ <sup>a</sup>	۷۸/۳۶±۲/۰۷ <sup>c</sup>	۲/۴۲±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۰/۰۶۱±۰/۰۰۸ <sup>b</sup>
پ- سلولز ۱/۵٪-۰/۴٪ پونه	۲۵/۷۳±۰/۹۰ <sup>b</sup>	۳۰/۲۴±۱/۷۹ <sup>b</sup>	۱۵۶/۷۱±۴/۲۳ <sup>ab</sup>	۸۵/۷۰±۱/۰۴ <sup>b</sup>	۳/۲۰±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۰۷۲±۰/۰۰۱ <sup>a</sup>
پ- سلولز ۲٪-۰/۴٪ پونه	۲۶/۵۰±۱/۸۰ <sup>b</sup>	۲۷/۷۳±۱/۰۰ <sup>b</sup>	۱۵۰/۴۰±۴/۵۹ <sup>b</sup>	۹۰/۸۳±۲/۷۹ <sup>a</sup>	۲/۹۲±۰/۱۳ <sup>b</sup>	۰/۰۷۰±۰/۰۰۰ <sup>a</sup>

حروف متفاوت (a, b...) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح  $p < 0/05$  است.

داده‌ها به صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.

پ: پروتئین؛ سلولز؛ نانوفیبر سلولز؛ پونه؛ اسانس پونه کوهی

اسانس پونه رسید ( $p < 0/05$ ). طبیعتاً می‌توان گفت که شاخص‌های رنگ فیلم‌های فعال تحت تأثیر رنگ ترکیبات شرکت کننده در بستر پلیمر (اسانس) تغییر کرده است. با اضافه شدن اسانس، شاخص اختلاف رنگ فیلم‌ها نیز افزایش یافت. در واقع این شاخص به نوعی تابع شاخص‌های اصلی رنگ بوده و بسته به میزان نوسان آن‌ها دستخوش تغییر می‌شود. نتایج مشابهی در رابطه با تغییرات شاخص‌های رنگ فیلم‌های خوراکی تحت تأثیر افزودن اسانس‌های گیاهی توسط محققان دیگر گزارش شده است (پیرس و همکاران، ۲۰۱۳؛ تانگوانچان و همکاران، ۲۰۱۳؛ عرفات و همکاران، ۲۰۱۴b). از طرفی پیرس و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که افزودن اسانس آویشن تأثیر چندانی بر خواص رنگی فیلم‌های تولیدی از پروتئین میوفیبریل ماهی نداشت.

رنگ سطحی فیلم‌های تولیدی: نتایج مرتبط با بررسی شاخص‌های رنگ سطحی فیلم‌های مختلف از جمله‌های رنگ هانتر ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) و اختلاف رنگ فیلم‌ها ( $\Delta E$ ) در جدول ۳ گزارش شده است. رنگ سطحی فیلم‌های مورد استفاده در بسته‌بندی به دلیل تأثیر بر ظاهر و بازاری‌پسندی محصول از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. بررسی شاخص‌های رنگ فیلم‌های فعال نشان داد که شاخص  $L^*$  با افزودن اسانس در بستر پلیمر نسبت به فیلم نانوکامپوزیت به میزان قابل توجهی کاهش میابد ( $p < 0/05$ ). شاخص  $a^*$  نیز در فیلم‌های فعال دستخوش تغییر شده و کاهش پیدا کرد ( $p < 0/05$ ). بررسی شاخص  $b^*$  در فیلم‌های فعال نشان داد که با افزودن اسانس به فیلم نانوکامپوزیت میزان زردی آن بیشتر شده به طوری که به بالاترین حد خود (۱۰/۳۳) در فیلم محتوی ۲ درصد



جدول ۳- خواص رنگ سطحی فیلم‌های نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی اسانس پونه کوهی.

نوع فیلم	L*	a*	b*	ΔE
پ- سلولز ۰/۴٪	۹۱/۷۶±۱/۱۷ <sup>a</sup>	۱/۴۳±۰/۰۶ <sup>a</sup>	۳/۴۸±۰/۱۶ <sup>b</sup>	۴/۷۱±۰/۷۲ <sup>b</sup>
پ- سلولز ۱/۵٪-۰/۴٪ پونه	۸۶/۶۵±۰/۶۵ <sup>b</sup>	۰/۹۳±۰/۱۵ <sup>b</sup>	۹/۸۳±۰/۵۳ <sup>a</sup>	۱۲/۳۰±۰/۶۶ <sup>a</sup>
پ- سلولز ۲٪-۰/۴٪ پونه	۸۵/۳۰±۰/۷۸ <sup>b</sup>	۰/۹۱±۰/۰۹ <sup>b</sup>	۱۰/۳۳±۱/۲۲ <sup>a</sup>	۱۳/۵۷±۱/۳۲ <sup>a</sup>

حروف متفاوت (a, b...) در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح  $p < 0/05$  است. داده‌ها به صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. پ: پروتئین؛ سلولز؛ نانوفیبر سلولز؛ پونه؛ اسانس پونه کوهی.

### کدورت و نفوذپذیری نسبت به نور فیلم‌های

تولیدی: خواص نوری و شفافیت فیلم‌های مورد استفاده در بسته‌بندی به دلیل تأثیر بر ظاهر محصول فاکتوری مهم محسوب می‌شود. فیلم‌های شفاف در این رابطه مطلوب بوده و کاربرد و پذیرش بالاتری در صنعت بسته‌بندی غذا دارند (احمد و همکاران، ۲۰۱۲). روند تغییرات مربوط به شاخص کدورت و همچنین نفوذپذیری به نور فیلم‌های تولیدی مختلف در جدول ۴ گزارش شده است. شاخص‌های نفوذپذیری به نور و کدورت در فیلم‌های فعال نسبت به فیلم نانوکامپوزیت تغییرات معنی‌داری نشان دادند که طبیعتاً با حضور اسانس در بستر آن‌ها مرتبط است. با افزودن اسانس نفوذپذیری به نور در طول موج‌های مختلف نور مرئی کاهش یافت و کدورت فیلم‌ها افزایش پیدا کرد به طوری که به بالاترین میزان خود (۴/۹۲) در تیمار محتوی ۲ درصد اسانس پونه رسید (۰/۰۵ < p). پایین بودن کلی عبور نور در ناحیه UV

برای فیلم‌های تولیدی فاکتوری مثبت محسوب شده که می‌تواند در محافظت غذاها در برابر فتواکسیداسیون مؤثر باشد که عبور نور در این ناحیه نیز در فیلم‌های فعال نسبت به فیلم نانوکامپوزیت کاهش یافت. بالاتر بودن ضخامت در فیلم‌های فعال نسبت به فیلم نانوکامپوزیت می‌تواند عاملی برای افزایش کدورت و کاهش نفوذپذیری آن‌ها به نور در طول موج‌های مختلف باشد (عرفات و همکاران، ۲۰۱۴b). این کاهش عبور نور همچنین می‌تواند ناشی از توزیع و پخش اسانس در بستر پلیمر و متعاقباً شکست نور در سطح قطرات آن و همچنین تغییر در ریزساختار ماتریکس پلیمر باشد (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵؛ احمد و همکاران، ۲۰۱۲). این مشاهدات با نتایج عاطف و همکاران (۲۰۱۵) و همچنین احمد و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. نتایج متفاوتی نیز در این رابطه توسط دیگر محققان گزارش شده است (پیرس و همکاران، ۲۰۱۳؛ پیرس و همکاران، ۲۰۱۱).

جدول ۴- ویژگی‌های کدورت و نفوذپذیری به نور فیلم‌های نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز محتوی اسانس پونه کوهی.

نوع فیلم	طول موج (nm)							
	۷۰۰	۶۰۰	۵۰۰	۴۰۰	۳۵۰	۲۸۰	۲۰۰	
پ- سلولز ۰/۴٪	۳/۲۳±۰/۱۳ <sup>c</sup>	۸۰/۸۰	۸۰/۲۳	۷۹/۵۳	۷۴/۸۶	۶۸/۶۳	۱/۷۱	۱/۴۳
پ- سلولز ۱/۵٪-۰/۴٪ پونه	۳/۹۵±۰/۱۲ <sup>b</sup>	۷۳/۵۹	۷۰/۲۹	۶۰/۸۱	۳۸/۲۸	۳۱/۹۴	۰/۰۴۴	۰/۰۱۶
پ- سلولز ۲٪-۰/۴٪ پونه	۴/۹۲±۰/۴۷ <sup>a</sup>	۵۴/۰۳	۵۱/۶۶	۴۳/۱۳	۳۲/۵۳	۲۹/۸۶	۰/۰۱۲	۰/۰۰۵

حروف متفاوت (a, b...) در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح  $p < 0/05$  است. داده‌ها به صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار)  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. پ: پروتئین؛ سلولز؛ نانوفیبر سلولز؛ پونه؛ اسانس پونه کوهی.

مقابل باکتری‌های مختلفی مثل لیستریا منوسی‌توزنز، سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس به اثبات رسیده که میزان آن بسته به غلظت و نسبت ترکیبات فنولیک موجود در اسانس متغیر بوده است. کارواکرول، تیمول، C- تریپین و P- سیمنز از فعال‌ترین ترکیبات موجود در اسانس‌ها هستند که طیف وسیعی از فعالیت ضد باکتریایی را ارائه می‌کنند (زیوانویچ و همکاران، ۲۰۰۵؛ جوکی و همکاران، ۲۰۱۴؛ بورت، ۲۰۰۴). در مورد مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی عنوان شده است که این ترکیبات با غشای سلول واکنش داده، در فسفولیپیدهای دولایه غشا حل شده و بین زنجیره‌های اسید چرب آن‌ها قرار می‌گیرند و سبب تغییرات شدیدی در ساختار غشا می‌شوند (یولتی و همکاران، ۲۰۰۰). این تخریب ساختار سبب ناپایداری و سیالیت غشا شده و در نتیجه نفوذپذیری مثبت آن را افزایش می‌دهد.

بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌ها: نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم نانوکامپوزیت و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت فعال در مقابل باکترهای مورد آزمایش (جدول ۵) نشان داد که فیلم نانوکامپوزیت بدون اسانس فاقد خاصیت ضد میکروبی بود اما فیلم‌های محتوی ۲ و ۱/۵ درصد اسانس پونه کوهی فعالیت ضد میکروبی مناسبی ارائه دادند. با افزایش سطح اسانس موجود در فیلم، فعالیت ضد باکتریایی در مقابل تمامی باکتری‌های مورد بررسی به طور معنی‌داری افزایش یافت. بررسی‌های دقیق‌تر نشان داد که اثر مهارکنندگی اسانس پونه کوهی در مقابل *S.aureus* نسبت به دو باکتری دیگر بیشتر بود احتمالاً به این دلیل که باکتری‌های گرم مثبت در اثر فقدان دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی نسب به گرم منفی‌ها حساسیت بیشتری به اسانس‌های گیاهی نشان می‌دهند (عاطف و همکاران، ۲۰۱۵). اثر بازدارندگی اسانس پونه کوهی در مطالعات قبل در

جدول ۵- فعالیت ضد میکروبی (مساحت هاله بازدارندگی (mm<sup>2</sup>)) فیلم نانوکامپوزیت پروتئین- نانوفیبر سلولز و همچنین فیلم‌های نانوکامپوزیت محتوی اسانس پونه کوهی (۲ و ۱/۵ درصد).

تیمار	پ- س. ۰/۴٪	پ- س. ۱/۵٪-۰/۴٪ پونه	پ- س. ۰/۴٪-۲٪ پونه
باکتری			
<i>E.c</i>	۰ <sup>c</sup>	۱۶۱/۳۶±۹/۴۲ <sup>b</sup>	۲۴۳/۴۱±۱۸/۹۲ <sup>a</sup>
<i>S.a</i>	۰ <sup>c</sup>	۱۹۲/۸۶±۱۴/۹۳ <sup>b</sup>	۳۸۰/۰۰±۱۱/۹۱ <sup>a</sup>
<i>B.s</i>	۰ <sup>c</sup>	۱۶۷/۴۷±۱۲/۰۲ <sup>b</sup>	۲۵۲/۷۹±۲۲/۵۲ <sup>a</sup>

حروف متفاوت (a, b, ...) در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح  $p < 0.05$  است.

داده‌ها به صورت میانگین (حداقل ۳ تکرار) ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

پ: پروتئین؛ س: نانوفیبر سلولز؛ پونه: اسانس پونه کوهی.

را افزایش داد. افزودن اسانس هرچند بر سدکنندگی بخار آب فیلم نانوکامپوزیت اثر منفی داشت اما حلالیت و تورم‌پذیری فیلم‌ها را به شکل معنی‌داری کاهش داد که این در راستای هدف کاهش حساسیت فیلم‌ها به آب بود. اسانس پونه بر خواص نوری

### نتیجه‌گیری کلی

ویژگی‌های مختلف فیلم نانوکامپوزیت تولیدی تحت تأثیر افزودن اسانس پونه کوهی قرار گرفت. بدین صورت که حضور اسانس تا حدی سبب کاهش استحکام آن شد اما با اعمال اثر نرم‌کنندگی کشسانی

فیلم‌ها اثر منفی داشت اما در ارزیابی مقایسه‌ای  
فیلم‌های فعال با نانوکامپوزیت مشخص شد که با  
افزایش غلظت اسانس پونه کوهی در ماتریکس پلیمر،  
خواص ضد میکروبی آنها در مقابل باکتری‌های  
مختلف (*B.subtilis* و *S.aureus*, *E.coli*) افزایش  
می‌یابد.

### منابع

1. Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., and Behrooz, R. 2013. Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, 32(2): 416-424.
2. Abdollahi, M., Rezaei, M., and Farzi, G. 2012. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *Journal of Food Engineering*, 111(2): 343-350.
3. 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.
4. Arfat, Y.A., Benjakul, S., Prodpran, T., Sumpavapol, P., and Songtipya, P. 2014b. Properties and antimicrobial activity of fish protein isolate/fish skin gelatin film containing basil leaf essential oil and zinc oxide nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 41: 265-273.
5. Arfat, Y.A., Benjakul, S., Vongkamjan, K., Sumpavapol, P., and Yarnpakdee, S. 2015. Shelf-life extension of refrigerated sea bass slices wrapped with fish protein isolate/fish skin gelatin-ZnO nanocomposite film incorporated with basil leaf essential oil. *Journal of Food Science and Technology*, 1-12.
6. ASTM. 2002. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material, D 882-02.
7. ASTM. 2010. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material, Designation: E96/E96M-10.
8. Atef, M., Rezaei, M., and Behrooz, R. 2015. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocolloids*, 45: 150-157.
9. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
10. Davidson, P.M., and Zivanovic, S. 2003. The use of natural antimicrobials. *Food preservation techniques*, 5-30.
11. 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.
12. Hernandez, E. 1994. Edible coatings for lipids and resins. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A., Nisperos-Carriedo, M.O. (Eds.), *Edible Coating and Films to improve Food Quality*. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, Pp: 279-304.
13. Holley, R.A., and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antibacterials: A Review. *Food Microbiology*, 22: 273-292.
14. Jiang, Y.F., Li, Y.X., Chai, Z., and Leng, X.J. 2010. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5100-5108.
15. Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., and Koocheki, A. 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 36: 9-19.

16. Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., and Buonocore, G.G. 2010. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 291-298.
17. Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., and Prasarpran, S. 2010. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *Journal of food engineering*, 100(1): 85-92.
18. Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., and Prasarpran, S. 2012. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly (vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. *Food Hydrocolloids*, 29(1): 226-233.
19. Ma, Q., Zhang, Y., Critzer, F., Davidson, P.M., Zivanovic, S., and Zhong, Q. 2016. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. *Food Hydrocolloids*, 52: 533-542.
20. Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H. 2010a. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1): 161-166.
21. Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., and Marcovich, N.E. 2011. Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103(1): 76-83.
22. Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G., Batista, I., Mendes, R., Nunes, L., and Marques, A. 2011. Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105(3): 422-428.
23. Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M.L., and Marques, A. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 224-231.
24. Rhim, J.W., Park, H.M., and Ha, C.S. 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10): 1629-1652.
25. Savadekar, N.R., Karande, V.S., Vigneshwaran, N., Bharimalla, A.K., and Mhaske, S.T. 2012. Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappa-carrageenan based film. *International journal of biological macromolecules*, 51(5): 1008-1013.
26. Sorrentino, A., Gorrasi, G., and Vittoria, V. 2007. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2): 84-95.
27. Tongnuanchan, P., Benjakul, S., and Prodpran, T. 2013. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering*, 117(3): 350-360.
28. Trovatti, E., Fernandes, S.C., Rubatat, L., da Silva Perez, D., Freire, C.S., Silvestre, A.J., and Neto, C.P. 2012. Pullulan–nanofibrillated cellulose composite films with improved thermal and mechanical properties. *Composites Science and Technology*, 72(13): 1556-1561.
29. Ultee, A., Kets, E.P., Alberda, M., Hoekstra, F.A., and Smid, E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*, 174(4): 233-238.
30. Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J., and Zhang, Q. 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1): 7-16.
31. Zivanovic, S., Chi, S., and Draughon, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*, 70(1): M45-M51.