

بررسی خواص فیزیکی، مکانیکی، ممانعت‌کنندگی، و ضد میکروبی فیلم کازئینات سدیم حاوی عصاره پوست انار

آرزو کرمی‌مقدم^۱، زهرا امام‌جمعه^{۲*}، سیدعلی یاسینی‌اردکانی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، یزد، ایران

۲. استاد دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، یزد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۷/۲)

چکیده

در این مطالعه، فیلم‌های خوراکی کازئینات سدیم دارای عصاره پوست انار در سه سطح غلظتی $1 \times 1/5 \times 2 \text{MIC}$ تولید شد و خواص ضد میکروبی، فیزیکی و مکانیکی، و بازدارندگی آن‌ها بررسی شد. همچنین به منظور بررسی تغییرات ریزساختاری ناشی از افزودن عصاره ضد میکروبی، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها تهیه گردید. ملاحظه شد با افزودن عصاره تا غلظت دو برابر MIC مقادیر ضخامت و حلالیت به ترتیب از $0/054$ میلی‌متر و $92/18$ درصد به $0/061$ میلی‌متر و $95/37$ درصد افزایش پیدا کرد و موجب کدرشدن فیلم‌ها شد. همچنین افزودن عصاره پوست انار به طور قابل توجهی باعث افزایش نفوذپذیری (تا $3/90 \times 10^{-9}$ (g/s.m.Pa)) به بخار آب گردید، اما خواص مکانیکی کاهش پیدا کرد. برای تعیین قدرت ضد میکروبی فیلم‌های تولیدشده از روش دیسک‌های انتشاری استفاده و قطر هاله ایجادشده در سطح پلیت‌ها اندازه‌گیری گردید و خصوصیات ضد میکروبی فیلم‌ها روی دو گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی آزمایش شد. به طور کلی فیلم‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر از باکتری‌های گرم منفی بودند.

کلیدواژگان: خواص ضد میکروبی، خواص فیزیکی و مکانیکی، عصاره پوست انار، فیلم خوراکی، کازئینات سدیم.

مقدمه

پلاستیک‌ها با منشأ نفتی به شکل گسترده به عنوان مواد بسته‌بندی کاربرد دارند، اما این ترکیبات زیست‌تخریب‌پذیر نیستند و سبب آلودگی محیط زیست می‌شوند (Tharanathan, 2003). یکی از روش‌های استفاده‌شده برای مقابله با این آلودگی، استفاده از بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر است که برای محیط اطراف (طبیعت) مضر نیستند (Tian et al., 2012). زیست‌تخریب‌پذیر بودن فیلم‌های خوراکی و نقش مؤثری که در کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی دارند سبب شده است که اخیراً بسیاری از محققان به مطالعه ویژگی‌های فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به عنوان مواد بسته‌بندی جدید و جایگزینی مناسب برای بسیاری از بسته‌بندی‌های پلاستیکی و فیلم‌های پلیمری سنتزی روی آورند (Lee et al., 2003; Barret et al., 2008; Dainelli et al., 2003). مواد اولیه فیلم‌های خوراکی شامل پروتئین، پلی‌ساکاریدها، و ترکیبات لپیدی به طور مرکب یا جداگانه است (Gennadios, 2004). پروتئین‌هایی که در ساخت فیلم‌های خوراکی در بسته‌بندی مواد غذایی استفاده

می‌شوند عبارت‌اند از: پروتئین غلات، گلوتن گندم، پروتئین سویا، پروتئین آب پنیر، کازئین شیر، کلاژن، و ژلاتین (Gennadios et al., 1997; Krochta, 2002; Choie and Han, 2001). از فیلم‌های خوراکی و پوشش‌های تهیه‌شده از پروتئین‌های شیر خصوصیات کارکردی و کاربردهای بالقوه‌ای شناخته شده است (Rhim and Ng, 2007). فیلم‌های کازئینی واضح و شفاف هستند و خواص ممانعت‌کنندگی در برابر اکسیژن آنها بسیار بالا و نفوذپذیری به بخار آب آن‌ها زیاد است (Chick, 1998). تاکنون تحقیقات زیادی روی فیلم‌های کازئینی انجام شده است. به طور مثال چیک و هراندز (Chick and Hernandez, 2002) ویژگی‌های فیزیکی، حرارتی، و سدکنندگی فیلم‌های خوراکی کازئینی حاوی موم را بررسی کردند و یا مور و همکاران (WVP (Mauer et al., 2000)) درباره خواص مکانیکی و ساختاری فیلم حاصل از فراکسیون β -کازئین را تحقیق کردند.

امروزه در تکنولوژی صنایع غذایی به علت کاربرد وسیعی که استفاده از مواد شیمیایی برای پیشگیری و یا به تعویق انداختن فساد مواد غذایی دارد و همچنین به دلیل بالارفتن سطح آگاهی مصرف‌کنندگان، علاقه روزافزونی به استفاده از

این فیلم به عنوان ماده بسته بندی در آینده حائز اهمیت است.

مواد و روش ها

پودر کازئینات سدیم (مرکالمان) با درجه غذایی خریداری شد. ترکیب کازئینات ۸۳/۴ درصد پروتئین، ۱/۶ درصد چربی، و ۱/۹ درصد خاکستر بود. گلیسرول با خلوص ۱۰۰ درصد (آکروزانگلستان) به عنوان نرم کننده برای بهبود خواص مکانیکی فیلم کازئینات سدیم استفاده شد. همچنین از پوست انار خشک شده واریتهٔ ملس ساوه- ایران استفاده شد.

استخراج عصاره پوست انار

به منظور استخراج عصاره پوست انار از روش Hayrapetyan *et al.* (2012) استفاده شد. میوه ها ابتدا شسته و تمیز شدند و سپس با چاقوی دستی پوست آن ها جدا گردید. پوست ها با آون در دمای ۶۰°C به طور کامل خشک گردیدند و با الک مش ۴۰ یکنواخت شدند. سپس پودر انار توزین شد و درون ظرف های درب دار شیشه ای مات ریخته و به نسبت ۱:۱۰ با حلال اولیه مخلوط شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۵°C شیکر مغناطیسی قرار گرفت. سپس عصاره از تفاله با کاغذ صافی جدا شد و تفاله مجدداً با حلال دوم تحت شرایط مشابه روی شیکر مغناطیسی قرار داده شد. هر دو عصاره به دست آمده با یکدیگر مخلوط و با آون تحت خلأ با دمای ۳۸°C نمونه تغلیظ شد تا عصاره ای نسبتاً غلیظ به عنوان عصاره نهایی به دست آمد. حلال اولیه استفاده شده برای استخراج عصاره پوست انار شامل متانول/آب به نسبت ۲۰/۸۰ (حجمی/حجمی)، حلال دوم استفاده شده شامل متانول/استون/آب به نسبت ۲۰/۴۰/۴۰ (حجمی/حجمی) بود.

اندازه گیری مقدار فنل کل عصاره پوست انار

میزان ترکیبات فنولیک طبق روش فولین-سیوکالتیو اندازه گیری شد (Zoreky, 2009). گالیک اسید به عنوان شاخصی برای اندازه گیری پلی فنل ها در تهیه منحنی استاندارد استفاده می شود. ۰/۱±۰/۱ گرم گالیک اسید منوهیدراته (جرم مولکولی=۱۸۸/۱۴) وزن و با آب مقطر حل شد و سپس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر که تقریباً برابر با ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر گالیک اسید بدون آب است، رسانده شد. محلول تولید شده، محلول مادر اسید گالیک نامیده می شود. جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد و نمودار منحنی کالیبراسیون گالیک اسید بر حسب جذب نوری رسم شد. همین روش برای نمونه های آزمایشی نیز انجام شد و پس از قرائت جذب در طول

مواد نگهدارنده طبیعی مانند اسانس، عصاره، و آنتی بیوتیک به منظور کاهش و حذف آنتی باکتریال و نگهدارنده سنتتیک وجود دارد (Kargiotou *et al.*, 2011). عامل اصلی فساد مواد غذایی رشد میکروب ها بر سطح آن هاست که با فیلم های حاوی ترکیبات ضد میکروبی می توان آن را کنترل کرد (Hosseini *et al.*, 2009; Torres and Karel, 1985). در سال های اخیر تحقیقات فراوانی برای ارزیابی آثار ضد میکروبی انواع عصاره ها و ادویه ها صورت گرفته است (Hosseini *et al.*, 2009). از این تحقیقات می توان به پژوهش سارکوز و سیدیم (Seydim and Sarikus, 2006) اشاره کرد که فعالیت ضد میکروبی فیلم های وی پروتئینی حاوی سه روغن اساسی اورگانو^۱، رزماری^۲، و سیر را بررسی کردند. همچنین بارت و ریندرز (Burt and Reinders, 2003) کیفیت خواص ضد میکروبی ۵ نوع روغن اساسی گیاهی را روی Non-toxicogenic E. coli 0157:H7 در حضور و عدم حضور پایدار کننده و اموسیفایر و در سه سطح دمایی بررسی کردند. آنها ابتدا ۵ روغن اساسی گیاهی را با روش ارزیابی دیسک های انتشاری^۳ سرنده کردند (انتخاب کردند) و سپس قوی ترین و فعال ترین اسانس را برای مطالعات بیشتر در روش Micro dilution colorimetric assay انتخاب کردند.

انار با نام علمی *Punicagranatum.L* در جهان به عنوان بومی ایران شناخته شده است (Martos *et al.*, 2010). پوست انار در مصارف خانگی ماده زائدی بوده و یکی از محصولات جانبی کارخانه های تولید آب میوه است. پوست انار از منابع غنی پلی فنل ها شناخته شده است (Li *et al.*, 2006). ترکیبات فنولی که در پوست انار وجود دارد خواص آنتی باکتریال بالایی را از خود نشان می دهد (Bragaa *et al.*, 2005). پوست انار حاوی تانن و به عنوان منبعی از آنتی اکسیدان ها است و ترکیبات فنولیک مانند اسیدالائیک به مقدار فراوان در آن وجود دارد (Aguilar *et al.*, 2008).

تاکنون هیچ تحقیقی درباره اثر عصاره پوست انار بر فیلم حاصل از سدیم کازئینات گزارش نشده است، بنابراین هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر عصاره پوست انار روی خصوصیات ضد میکروبی فیلم کازئینات سدیم و امکان سنجی تولید پوششی زیست تخریب پذیر در قالب بررسی ویژگی های نفوذ پذیری در برابر بخار آب، خواص فیزیکی و مکانیکی، و تغییرات ریز ساختار فیلم های تولیدی بود. این نتایج برای ارزیابی کاربردهای ممکن

1. Oregano
2. Rosemary
3. Disc diffusion assay

تقریباً ۶mm از فیلم ضد میکروبی به‌وسیله یک پانچ استریل تهیه شد و قطر هاله تشکیل‌شده در اطراف هر دیسک روی محیط کشت اندازه‌گیری شد. برای هر پلیت نیز شاهدی در نظر گرفته شد که شامل میکروارگانیسم مورد نظر و دیسک‌هایی از فیلم فاقد عصاره بودند.

۲ ضخامت فیلم

ضخامت فیلم‌ها با یک میکرومتر دیجیتالی در ۵ نقطه گوناگون از فیلم‌ها که به‌صورت تصادفی انتخاب شدند، تعیین گردید. میانگین این نقاط برای تعیین دیگر ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها استفاده شد.

۳ شفافیت

شفافیت با دستگاه اسپکتروفوتومتر (CECIL instruments, model CE 2502, Cambridge-England) با روش استاندارد ASTM D1۷۴۶-۰۹ که Tunc et al. (2007) اصلاح کرده‌اند، در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه گرفته شد. نمونه‌های فیلم مستطیل شکل (۴۰mm×۲۰mm) از قبل در داخل دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم (رطوبت نسبی ۵۳ درصد) در دمای محیط قرار داده شدند. ابتدا دستگاه را بر حالت Transparency تنظیم می‌کنیم و با یک سل خالی (طول موج ۵۶۰ نانومتر) دستگاه را کالیبره می‌کنیم. سپس نمونه‌های فیلم را با چسب نواری شفاف روی سل می‌چسبانیم و داخل دستگاه قرار می‌دهیم و عدد را قرائت می‌کنیم. حداقل ۵ تکرار برای این آزمون از هر فیلم در نظر گرفته شد.

۴ حلالیت در آب

به‌منظور اندازه‌گیری حلالیت فیلم‌های خوراکی با روش (2011) Taqi et al. ابتدا قطعاتی از فیلم به ابعاد ۴×۴ سانتی‌متر مربع در آون با دمای ۰۵°C به مدت ۵ ساعت برای رسیدن به وزن ثابت خشک شدند و سپس وزن آنها با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱± گرم اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خشک‌شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط ثابت همزنی قرار داده شدند. بعد از این مدت قطعات فیلم به‌وسیله کاغذ صافی از آب جدا و پس از خشک‌کردن در آون ۱۰۵°C به مدت ۵ ساعت، توزین شدند. میزان حلالیت در آب فیلم‌ها از تغییرات وزن فیلم بعد از غوطه‌وری در آب در مقایسه با وزن اولیه فیلم محاسبه شد.

موج ۷۶۵ نانومتر و با استفاده از منحنی استاندارد اسیدگالیک میزان پلی‌فنول کل نمونه را محاسبه شد. این آزمون در پنج تکرار و با نمونه‌های تصادفی از پوست انار انجام گردید.

آماده‌سازی محلول فیلم‌ها

به‌منظور تهیه فیلم از روش Broumand et al. (2011) استفاده گردید. ابتدا ۵ گرم از کازئینات سدیم به ۱۰۰mL آب مقطر در دمای ۵±۶°C و تحت همزنی اضافه گردید. پس از اینکه کازئینات سدیم به‌طور کامل حل شد، دما تا ۵±۸°C افزایش داده شد. مخلوط به مدت یک ساعت در این دما و شرایط ۵۰۰rpm نگهداری شد. بعد از سرد شدن محلول فیلم و قبل از قالب‌ریزی، عصاره پوست انار نیز به میزان تعیین‌شده (۲×۵، ۱×۱) و گلیسرول ((گرم کازئینات/گرم گلیسرول) ۳۰ درصد) به فرمولاسیون اضافه گردیدند. سپس مقدار معین از محلول تشکیل‌دهنده فیلم در قالب‌های سیلیکونی ریخته و در دمای ۳۰°C به مدت ۲۳/۵ ساعت خشک شد.

آماده‌سازی محیط کشت‌ها و انجام آزمایش‌های میکروبی

دو سوش باکتریایی اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس برای بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ها انتخاب شدند. اشرشیاکلی O157:H7(ATCC35218) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC1431) از بخش میکروبیولوژی گروه صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران تهیه گردید. به‌منظور تهیه محیط کشت مایع (Mueller Hinton Broth) استفاده‌شده در آزمون‌های میکروبی از روش double strength استفاده شد. با روش آزمون حساسیت رقت‌های مایع، ۶ سطح غلظت از هر عصاره شامل ۵۰ppm، ۷۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ انتخاب شد. برای انجام آزمایشات از روش آزمون حساسیت رقت مایع استفاده شد. یک میلی‌لیتر از مایع تلقیح استاندارد (حاوی ۱×۱۰^۶ ارگانیسم بر mL) به ۷ لوله آزمایشی در بدار حاوی حجم برابر از رقت‌های تهیه‌شده از عصاره‌ها اضافه گردید. یک لوله آزمایش فاقد ماده ضد میکروبی نیز به‌عنوان کنترل رشد میکروبی تهیه شد (Barnon & Finegold, 1990).

بررسی خصوصیات ضد میکروبی فیلم حاوی عصاره پوست انار

برای تولید فیلم‌های ضد میکروبی کازئینات سدیم، عصاره پوست انار به نسبت‌های ۰، ۱، ۱/۵، ۲ برابر مقدار MIC^۱ به فیلم‌های کازئینات سدیم اضافه گردید. سپس به‌منظور بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌های تولیدی، دیسک‌هایی به قطر

2. Thickness
3. Transparency
4. Solubility in Water

1. Minimum Inhibitory Concentration(MIC)

این آزمون ۵ بار تکرار شد و میانگین حسابی داده‌های به‌دست‌آمده به‌عنوان درصد حلالیت فیلم‌ها گزارش شد.

حداکثر استحکام کششی^۱ و ازدیاد طول تا نقطه شکست^۲

اندازه‌گیری حداکثر استحکام کششی (TS) و ازدیاد طول تا نقطه شکست (E%) فیلم‌ها براساس استاندارد مصوب ASTM D 882 با دستگاه : Testometric, M350-10CT- SER NO : 2344 ارزیابی شد. نمونه‌ها قبل از آزمون در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم (برای ایجاد رطوبت نسبی ۵۳ درصد) قرار داده شدند و در دمای ۲۵°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. آزمون‌های TS, E% در دمای ۲۵°C با استفاده از یک بارسل ۵۰kg انجام شد. نمونه‌ها مستطیل شکل و دارای ۱۰mm پهنا و ۱۰۰mm طول در نظر گرفته شدند. فاصله فک‌های اصلی از یکدیگر ۵۰mm و سرعت فک‌ها ۳۰mm/min تا نقطه شکست فیلم ثبت شد. مقادیر TS, E% از روی منحنی‌های تنش-کرنش به‌دست آمدند و به ترتیب به مگاپاسکال و میزان افزایش طول تا نقطه شکست تقسیم بر طول اولیه برحسب درصد گزارش شدند. حداقل ۵ تکرار برای هر فیلم در نظر گرفته شد.

نفوذپذیری به بخار آب (WVP)^۳

برای انجام این آزمایش از استاندارد مصوب ASTM E ۹۵-۹۶ استفاده و میزان WVP با روش اصلاح‌شده Hosseini *et al.* (2009) محاسبه شد. ابتدا درون ظروف شیشه‌ای (با مساحت دهانه ۰/۰۰۱۹۶۲۵m²) کلرید کلسیم بدون آب ریخته و سطح ظروف با فیلم‌های بدون چروکیدگی و سوراخ پوشانده شد و سپس با پارافیلیم و به کمک پارافین مذاب درب‌بندی شدند. برای حفظ گرادیان رطوبت نسبی ۷۵ درصد عبوری از فیلم‌ها، از کلرید کلسیم بدون آب (RH ۰ درصد) در داخل ظروف شیشه‌ای و محلول اشباع کلرید سدیم (RH ۷۵ درصد) در داخل دسیکاتور استفاده شد. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵°C، فشار بخاری معادل ۱۷۵۳/۵۵ پاسکال ایجاد می‌کند. بدین ترتیب تغییرات وزن ظرف‌ها طی زمان با یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ ± گرم اندازه‌گیری شد، منحنی تغییرات رسم و شیب هر خط رسم‌شده به‌وسیله رگرسیون خط (R²=۰/۹۹۹) محاسبه گردید. نرخ انتقال بخار آب (WVTR) از تقسیم شیب خط کشیده‌شده (Slope) بر سطح

فیلم (A) به‌دست می‌آید:

$$WVTR = \frac{Slope}{A} \quad (\text{رابطه ۱})$$

با توجه به معادله ۲ با ضرب‌کردن ضخامت فیلم (X) و تقسیم بر اختلاف فشار بین رطوبت نسبی درون سلول‌ها و رطوبت نسبی دسیکاتور (ΔP)، نفوذپذیری به بخار آب (WVP) به‌دست می‌آید:

$$WVP = \frac{WVTR \times X}{\Delta P} \quad (\text{رابطه ۲})$$

مطالعه ریزساختار (مورفولوژی) با میکروسکوپ الکترونی روبشی^۴

به‌منظور بررسی تأثیر افزایش ماده خشک فیلم بر ریزساختار فیلم‌های تولیدشده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها تهیه گردید.

از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (Philips XL30, Philips The Netherlands) برای مطالعه ریزساختار فیلم‌های تولیدشده استفاده شد. قبل از عکسبرداری از نمونه‌ها، فیلم‌ها در اندازه‌های ۵mm×۱mm بریده شدند و با لایه‌ای از طلا پوشانده شدند. از سیستم تحلیل تصویری با شتاب ولتاژ ۲۴kV استفاده شد.

آنالیزهای آماری

اختلاف بین تیمارهای گوناگون، براساس طرح آماری آزمایش فاکتوریل به‌طور کاملاً تصادفی با تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و EXCEL نسخه ۲۰۱۳ (Chicago, USA 2013) انجام گرفت.

نتایج و بحث

اندازه‌گیری مقدار فنل کل عصاره پوست انار میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره استخراجی پوست انار در حدود ۵۷۲±۱ mg/L بود.

تعیین قدرت ضد میکروبی عصاره پوست انار

برای تعیین قدرت ضد میکروبی عصاره پوست انار استفاده‌شده، از روش آزمون حساسیت رقت‌های مایع و محاسبه MIC و MBC^۵ استفاده شد. MIC و MBC عصاره‌ها به این دلیل مهم هستند که کمترین غلظت عصاره را معین می‌کنند که به ترتیب

4. Scanning Electron Microscope (SEM)
5. Minimum bactericidal Concentration(MBC)

1. Tensile Strength (TS)
2. Elongation at break (E%)
3. Water Vapor Permeability (WVP)

میکروارگانیزم‌های مورد نظر را غیر فعال کند، ضروری به نظر می‌رسد. پس از انجام آزمون حساسیت رقت‌های مایع در سه تکرار و کشت دادن محتویات لوله‌های آزمایشی روی سطح پلیت‌ها نتایج مطابق جدول ۱ شد.

اثر بازدارندگی و کشندگی بر میکروارگانیزم‌های هدف مؤثر را نشان می‌دهند. از آنجا که وجود عصاره در فیلم‌های خوراکی بر طعم، خواص مکانیکی، و نفوذپذیری به بخار آب آن‌ها مؤثر است، بنابراین تعیین کمترین غلظت که بتواند

جدول ۱. نتایج اثر ضد میکروبی عصاره آلی انار بر میکروارگانیزم‌های آزمون

نوع میکروارگانیزم	رقت‌های عصاره آلی انار بر حسب ppm				
	۵۰	۷۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	++	++	۲ کلنی	-	-
اشرشیاکلی O157:H7	++	++	+	۸ کلنی	-
++ نشان دهنده رشد زیاد میکروارگانیزم + نشان دهنده رشد کم میکروارگانیزم - نشان دهنده عدم رشد است					

جدول ۲. فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های کازئینات سدیم حاوی عصاره پوست انار

باکتری	غلظت عصاره (×MIC)	متوسط قطر هاله ضد میکروبی (mm)
استافیلوکوکوس اورئوس	۱	۸/۷۹±۰/۳۰ ^c
اشرشیاکلی	۱/۵	۱۲/۲۶±۰/۳۹ ^b
	۲	۲۴/۹۰±۰/۲۹ ^a
	۰	۰ ^c
	۱	۰ ^c
	۱/۵	۱۰/۱۸±۰/۴۱ ^b
	۲	۱۹/۰۲±۰/۴۲ ^a

میانگین‌ها در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت اختلاف معنی‌دار با هم دارند (P < ۰/۰۵). داده‌ها عبارت‌اند از میانگین ± انحراف معیار

بررسی خصوصیات ضد میکروبی فیلم حاوی عصاره پوست انار برای تولید فیلم‌های ضد میکروبی کازئینات سدیم به نسبت‌های ۰، ۱، ۱/۵، و ۲ برابر مقدار MIC به فیلم‌های کازئینات سدیم اضافه گردید. در جدول ۲ مقادیر مربوط به خواص ضد میکروبی فیلم‌های تولیدشده، گزارش شده است.

با توجه به جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که فیلم ضد میکروبی حاوی عصاره پوست انار بیش‌ترین اثر را بر استافیلوکوکوس اورئوس (با متوسط قطر هاله ۲۴/۹۰ mm) دارد که این نتیجه قابل انتظار بود، چراکه عصاره پوست انار دارای کمترین میزان MIC و MBC بر این باکتری بود (جدول ۱)، همان‌طور که قبلاً هم ذکر شد باکتری‌های گرم مثبت به مواد ضد میکروبی گیاهی حساس‌ترند.

ضخامت

فیلم‌های ضد میکروبی تولیدی نازک، انعطاف‌پذیر و مات بودند. با افزایش مقدار عصاره ضخامت افزایش می‌یابد اما این افزایش معنی‌دار نیست (جدول ۳). با توجه به عکس‌های میکروسکوپ الکترونی، با افزودن عصاره ضد میکروبی، فیلم‌های تولیدی بافتی اسفنجی پیدا کردند که چنین ساختاری می‌تواند به افزایش ضخامت فیلم‌های خوراکی بیانجامد. همچنین این منافذ می‌توانند با محبوس کردن مولکول‌های آب منجر به افزایش رطوبت و تورم فیلم‌ها و افزایش ضخامت آن‌ها گردند. البته پیوندهای آب‌گریز ایجادشده بین پروتئین و مواد ضد میکروبی به کاهش رطوبت فیلم می‌انجامد که کاهش ضخامت فیلم را در پی خواهند داشت که در اینجا احتمالاً این دو اثر معکوس یکدیگر را خنثی می‌کنند. البته دیگر محققان تغییرات ضخامت فیلم‌های خوراکی را در اثر افزودن ترکیبات ضد میکروبی تأیید

در هیچ‌یک از پلیت‌های حاوی محتویات لوله‌های کنترل، رشدی مشاهده نگردید که این مسئله شرایط ایزوله آزمون را تأیید می‌کند. نتایج ارائه‌شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که غلظت ۱۲۵ ppm عصاره پوست انار روی استافیلوکوکوس اورئوس اثر بازدارندگی و غلظت ۲۵۰ ppm اثر کشندگی دارد و غلظت ۲۵۰ ppm عصاره پوست انار بر اشرشیاکلی اثر بازدارندگی و غلظت ۵۰۰ ppm اثر کشندگی دارد. علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به روغن‌های اساسی گیاهی احتمالاً پیچیدگی بیشتر غشای مضاعف سلولی این ارگانیزم‌ها در مقایسه با غشای یگانه گلیکوپروتئینی/تکوئیک اسید باکتری‌های گرم مثبت است. همچنین به نظر می‌رسد مقاومت سلول‌های میکروبی وابسته به سرعت و میزان انحلال (حل شدن) مواد ضد میکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی است (Halley and Patel, 2005).

عبور نور تسهیل شد که این امر موجب عدم کاهش زیاد شفافیت فیلم‌های ضد میکروبی گردیده است.

حلالیت

با افزودن عصاره پوست انار روند منظمی در حلالیت فیلم‌های ضد میکروبی مشاهده نگردید، اما در غلظت‌های بالاتر عصاره، احتمالاً به دلیل افزایش منافذ و حفرات ایجادشده در ساختار فیلم حلالیت افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) پیدا کرده است (جدول ۳). می‌توان نتیجه گرفت که تخریب ساختار فیلم‌ها به علت افزودن عصاره، تأثیر بیشتری در مقایسه با ترکیبات آب‌گریز موجود در این عصاره داشته است چون انتظار می‌رفت به واسطه حضور ترکیبات آب‌گریز، حلالیت کاهش یابد. Hosseini *et al.* (2009) افزایش حلالیت توسط ترکیبات ضد میکروبی را بررسی کردند که نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند.

کرده‌اند. مثلاً Hosseini *et al.* (2009) اعلام کردند که افزودن دارچین، میخک، و آویشن به فیلم کازئینات سدیم به افزایش ضخامت فیلم ضد میکروبی می‌انجامد (MIC) $1 \times 1/5 \times 2$ و از طرفی دیگر Pires *et al.* (2013) گزارش دادند که ضخامت فیلم پروتئینی در اثر افزودن سنبل، ترخون، گشنیز، و آویشن به عنوان ترکیبات ضد میکروبی کاهش می‌یابد.

شفافیت

هرچه غلظت عصاره پوست انار در فیلم‌ها افزایش یافت شفافیت نمونه‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) کاهش پیدا کرد (جدول ۳). البته در غلظت‌های پایین عصاره، تغییر معنی‌داری روی شفافیت صورت نگرفت. با توجه به ماهیت قرمز رنگ عصاره پوست انار، کاهش شفافیت فیلم‌های ضد میکروبی حاصل دور از انتظار نبود. البته به دلیل افزایش منافذ درون ساختاری فیلم،

جدول ۳. شفافیت، ضخامت و حلالیت فیلم‌های ضد میکروبی

ضخامت (mm)	حلالیت (درصد)	شفافیت (درصد)	غلظت عصاره (×MIC)	غلظت پروتئین (w/v)
0.054 ± 0.005^a	$92/18 \pm 0/95^b$	$85/31 \pm 1/05^a$	۰	۵
0.054 ± 0.003^a	$92/65 \pm 0/75^b$	$85/18 \pm 0/08^b$	۱	۵
0.058 ± 0.003^a	$93/83 \pm 0/36^{ab}$	$83/24 \pm 1/28^b$	۱.۵	۵
0.061 ± 0.002^a	$95/37 \pm 1/8^a$	$81/07 \pm 0/87^c$	۲	۵

میانگین‌ها در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت اختلاف معنی‌دار با هم دارند ($P < 0.05$). داده‌ها عبارت‌اند از میانگین \pm انحراف معیار

کشش‌پذیری به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) از $125/52$ درصد تا $114/20$ درصد کاهش یافت، اما تغییرات غلظت عصاره ضد میکروبی اثر معنی‌داری را ایجاد نکرد. Pranoto *et al.* (2005) اثر ترکیبات ضد میکروبی پتاسیم سوربات و نیسین روی فیلم‌های کیتوزان بررسی کردند و به نتایج این تحقیق رسیدند. Bourtoom (2009) طی تحقیقی به نتایج مشابه این تحقیق دست یافت.

جدول ۴. استحکام کششی و درصد ازدیاد طول فیلم‌های خوراکی ضد میکروبی

ازدیاد طول تا نقطه شکست فیلم (%E)	مقاومت در برابر کشش فیلم (MPa)	غلظت گلیسرول (%w/w)	غلظت عصاره (×MIC)	غلظت پروتئین (%w/v)
$125/52 \pm 5/68^b$	$24/49 \pm 1/69^a$	۳۰	۰	۵
$115/89 \pm 2/39^a$	$24/20 \pm 1/64^a$	۳۰	۱	۵
$114/20 \pm 3/27^a$	$22/27 \pm 1/87^{ab}$	۳۰	۱/۵	۵
$114/80 \pm 3/00^a$	$20/40 \pm 1/02^b$	۳۰	۲	۵

میانگین‌ها در هر ستون با حروف انگلیسی متفاوت اختلاف معنی‌دار با هم دارند ($P < 0.05$).

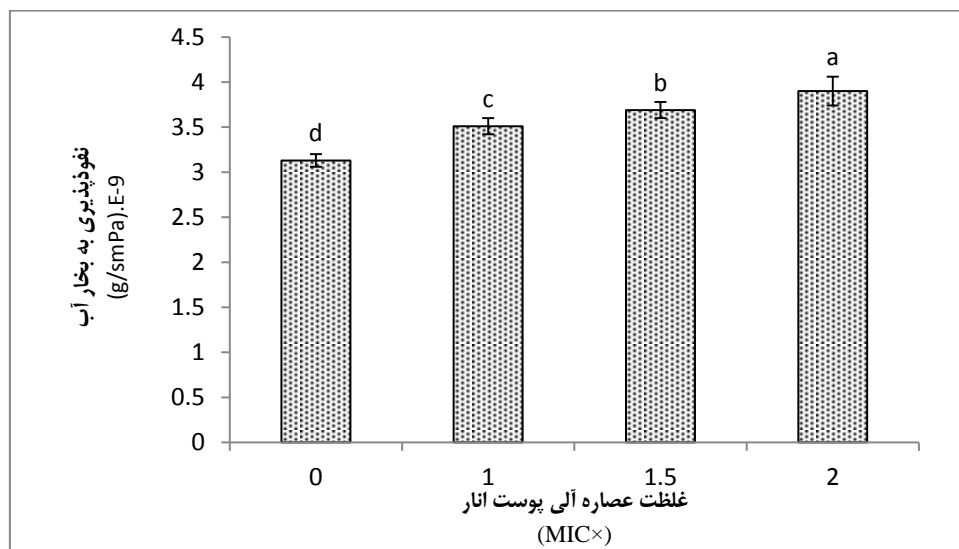
داده‌ها عبارت‌اند از میانگین \pm انحراف معیار

خواص مکانیکی فیلم‌های ضد میکروبی کازئینات سدیم با افزایش عصاره، مقاومت به کشش فیلم‌های تولیدی به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) از $24/49 \text{ MPa}$ تا $20/40 \text{ MPa}$ کاهش می‌یابد (جدول ۴).

باید به این نکته توجه داشت که بخش عمده خاصیت ضد میکروبی پوست انار به دلیل ترکیبات فنولیک شامل فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌ها، کاتچین، و ...) و تانن‌های قابل هیدرولیز (گالیک، اسیدگالیک، و ...) است. (Afaq *et al.*, 2005, Ismial *et al.*, 2012) حلالیت و خواص ضد میکروبی ترکیبات فنولیک وابسته به گروه‌های هیدروکسیل این ترکیبات است (Morga *et al.*, 2002)، اما عصاره پوست انار عمدتاً ماهیت آب‌گریز از خود نشان می‌دهد. گاهی ترکیبات فنولیک در غلظت‌های بسیار کم به اتصالات عرضی بین پروتئین‌ها و افزایش مقاومت فیلم‌های خوراکی می‌انجامند، اما با افزایش غلظت این ترکیبات، پیوندهای آب‌گریز منجر به تخریب پیوندهای پروتئین-پروتئین می‌گردند. همچنین با افزایش غلظت عصاره پوست انار،

بخار آب فیلم‌های تولیدی افزایش پیدا کرد. همان‌طور که اشاره شد احتمالاً حضور عصاره سبب تخریب ساختار فیلم و کاهش فشردگی آن می‌شود. بنابراین مولکول‌های آب با سهولت بیشتری از ساختار فیلم عبور می‌کنند. با توجه به نتایج سایر محققان، به دلیل ماهیت گوناگون ترکیبات ضد میکروبی و میزان و نوع پیوندهای که در ساختار فیلم خوراکی ایجاد می‌کنند، ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند منجر به افزایش (Pruneda *et al.*, 2008) یا کاهش (Pires *et al.*, 2011) نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های ضد میکروبی حاصل گردند یا اصلاً تأثیر معنی‌داری را ایجاد نکنند (Zinoviadous, 2009).

نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های ضد میکروبی کازئینات سدیم تغییرات نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های ضد میکروبی در شکل ۱ نشان داده شده است. با افزودن عصاره پوست انار نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های ضد میکروبی به شکل معنی‌داری ($P < 0.05$) از $3.13 \text{ (g/smPa)} \times 10^{-9}$ تا $3.90 \text{ (g/smPa)} \times 10^{-9}$ افزایش پیدا کرده است. نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های خوراکی به ترکیبات هیدروفیل و آب‌گریز و برهم‌کنش آن‌ها بستگی دارد (Hernandez, 1998). به دلیل ماهیت آب‌گریز ترکیبات ضد میکروبی انتظار می‌رود همانند زمانی که ترکیبات لیپیدی به ساختار فیلم اضافه می‌گردد، نفوذپذیری به بخار آب کاهش یابد اما با افزودن عصاره پوست انار میزان نفوذپذیری به



شکل ۱. اثر غلظت‌های گوناگون عصاره پوست انار بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های کازئینات سدیم

نشان داده شده است.

هیچ‌گونه حفره، حباب، یا بخش حل‌نشده در تصاویر سطحی فیلم کازئینات سدیم مشاهده نشد. با توجه به داده‌های حاصل از ضخامت (جدول ۳) تا حدودی انتظار می‌رفت ناهمواری‌های سطحی که به افزایش ضخامت می‌انجامند، قابل مشاهده باشند، اما به دلیل ساختار منظم کازئینات سدیم، آرایش فضایی زنجیره‌های پلیمر در بستر ماتریس به صورت یکنواخت باقی‌مانده است و مانع از ایجاد ناهمواری سطحی در ماتریس پلیمر گردیده است.

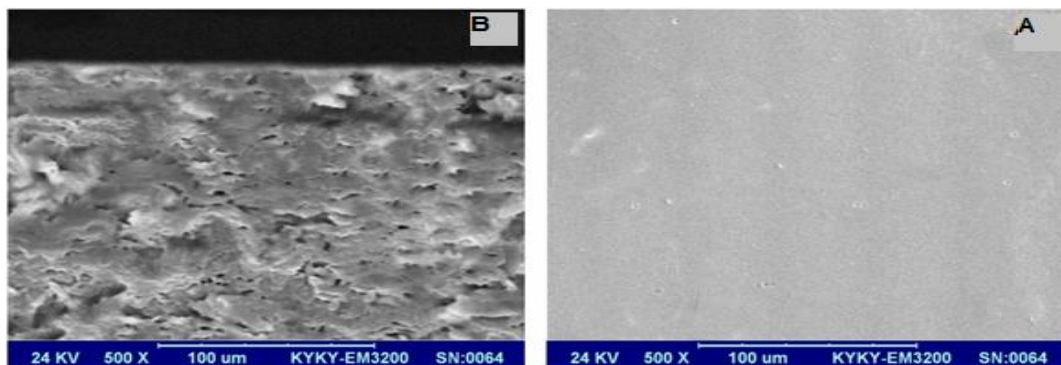
با توجه به خواص مکانیکی بسیار خوب فیلم کازئینات سدیم انتظار ساختاری منظم و کاملاً فشرده از این فیلم می‌رود که در تصویر مقطع عرضی این فیلم به خوبی قابل مشاهده است. همچنین به منظور اطمینان از اثر عصاره ضد میکروبی روی فیلم کازئینات سدیم از سطح (C) و مقطع عرضی (D) فیلم ضد

بررسی و مقایسه ریزساختار (مورفولوژی)

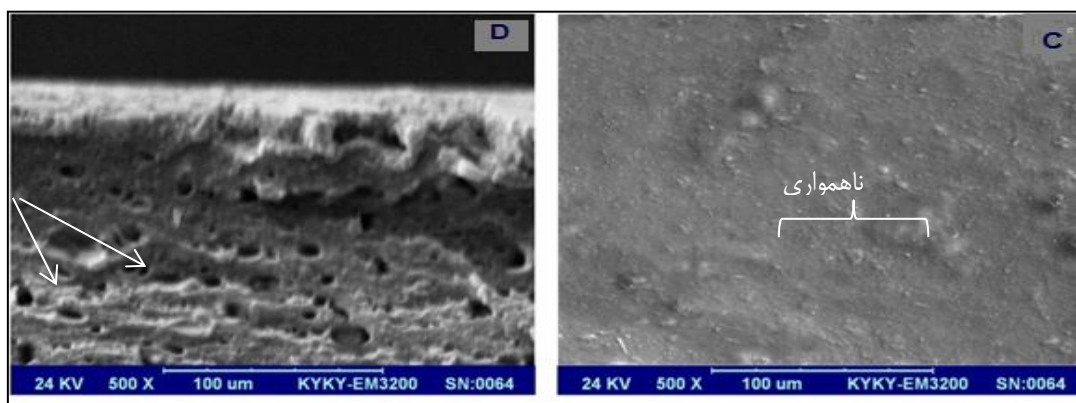
به منظور بررسی خصوصیات میکروساختار بیوپلیمرهای تولیدشده از سطح و مقطع عرضی فیلم‌ها تولیدشده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی عکس‌برداری گردید. بزرگ‌نمایی استفاده‌شده برای تمامی عکس‌ها $500\times$ است.

شکل ۲ مربوط به تصویر سطح (A) و مقطع عرضی (B) فیلم شاهد 5 (w/v) درصد کازئینات سدیم حاوی 30 (w/w) درصد گلیسرول است. بررسی خصوصیات ریزساختار در بیوپلیمرها عاملی مهم در درک رفتار و خواص آن بیوپلیمر می‌تواند باشد (Frinault *et al.*, 1997). تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی گرفته‌شده از سطح فیلم‌ها اطلاعات مفیدی از بستر بیوپلیمر را در اختیار ما قرار می‌دهد. عکس سطح روبی و مقطع عرضی فیلم شاهد حاوی 5 (w/v) درصد کازئینات سدیم به همراه 30 (w/w) درصد گلیسرول در شکل ۲

اجزای سازنده به خصوص اتصالات بین پروتئین-پروتئین شده است، به همین دلیل ترکیبات ضد میکروبی پوست انار منجر به تخریب ساختار فیلم و کاهش هر دو فاکتور مقاومت به کشش و کشش پذیری فیلم‌ها گردیده‌اند.



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سطح (A) و مقطع عرضی (B) فیلم شاهد کازئینات سدیم



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به سطح (C) و مقطع عرضی (D) فیلم ضد میکروبی کازئینات سدیم

برابر باکتری‌های گرم مثبت بیش از گرم منفی است و باکتری اشرشیاکلی در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت بیشتری را در برابر عصاره پوست انار از خود نشان داد. زمانی که حفظ یکپارچگی (خواص مکانیکی) و ویژگی‌های ظاهری فیلم ضد میکروبی در طول تولید تا مصرف ماده غذایی از اهمیت بیشتری در مقایسه با ویژگی‌های ضد میکروبی آن برخوردار است، ترجیح داده می‌شود از غلظت‌های کمتر عصاره پوست انار استفاده گردد تا ضمن رسیدن به این اهداف، فعالیت ضد میکروبی را نیز تا حدودی کاهش دهیم.

REFERENCES

Aguilar, C.N., Aguilera-Carbo, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., & Martinez, D. (2008). Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of Pomegranate (*Punica*

میکروبی کازئینات سدیم حاوی ۲MIC × عصاره پوست انار که در شکل ۳ مشخص است، عکس برداری گردید. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، حضور عصاره ضد میکروبی در ساختار فیلم منجر به تشکیل پیوندهای پلی‌فنول-پروتئین گردیده که باعث تضعیف برهم‌کنش بین

نتیجه‌گیری کلی
افزودن عصاره پوست انار به فرمولاسیون فیلم خوراکی کازئینات سدیم سبب ایجاد تغییراتی نامطلوب در ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب این فیلم گردید که البته در مقابل تغییرات ضد میکروبی مطلوب ایجاد شده قابل اغماض است و کاربرد فیلم ضد میکروبی به فیلم شاهد ترجیح داده می‌شود. براساس یافته‌های این تحقیق، زمانی که ماده غذایی حساسیت زیادی در برابر عوامل میکروبی داشته باشد بهتر است از فیلم ضد میکروبی حاوی عصاره پوست انار استفاده گردد. البته تأثیر ضد میکروبی عصاره پوست انار در

granatum) peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Journal Of Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 218-222

- ASTM (1997). ASTM D1746-09: Standard Test Method for Transparency of Plastic Sheeting. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA*. DOI: 10.1520/D1746-09.
- ASTM (2001). ASTM D882-12: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA*. DOI: 10.1520/D0882-12..
- ASTM.,(1995). ASTM E96 E96M-10: Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. *American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA*. DOI: 10.1520/E0096_E0096M-10
- Barnon, E.J., & Fineg old, S.M. (1990). Method for testing antimicrobial effectiveness. In: Diagnostic Microbiology, (8th ed.). *The Moby Company*. Pp:172-184.
- Barreto, P. L. M., Pires, A. T. N., & Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inertatmosphere. *Journal of Polymer Degradation and Stability*,79, 147-152.
- Bourtoom, T.(2009). Edible Protein films: Properties enhancement. *Journal of International Food Research*.16,1-9
- Bragaa, L.C., Shupp, W., Cummings, C., Jett, B., Takahashi, J.A., Carmod, L.S., Chartone- Souza, E., & Nascimento, A.M.A.(2005). Pomegranate extract inhibits Staphylococcus aureus growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2),335-339.
- Broumand A, Emam-Djomeh Z, Hamed M, Razavi SH (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. A. and Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oil against Escherichia coli 0175:H7. Letter in applied microbiology, 36:162-167.
- Chick, J., & ustunol, Z. (1998). Mechanical and barriers properties of lactic acid and rennet precipitated casein-based edible films. *Journal of food science*. 63(6),1024-1027.
- Chick, J., and Hernandez, R. J. (2002). Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax- based edible films. *Journal of food science*, 67:1073-1079.
- Choi, W.S., & Han, J.H.(2001). Physical and mechanical properties of protein –based edible films. *Journal of Food Engineering and Physical Properties*. 66, 319-322.
- Dainelli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan van den Beuken, E., & Tobback, P.(2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Journal of Food Science & Technology*19, S99-S108
- Faq, F., Saleem, M., Krueqer, C.G., Reed, J.D., & Mukhtar, H. (2005).Anthocyanin-and hydroluzable tannin-rich poemgranate fruit extract modulates MAPK and NF-KB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal Of Cancer*.113(3),423-433
- Frinault., A.(1997). Proparation of casein films by a modified wet spinning process. *Journal of Food Science*, 62(4), 774-747.
- Gennadios., A.(2004). Edible films and coatings from protein. *protein in food processing, wood head*,Cambridge,UK,pp. 442-467.
- Gennadios, A.,Hann, M.A., & Kurth, L.B.(1997). Application of Edible coatings on meats,poultry and seafoods. *Journal of Science and Technology*.3(4),337-350.
- Hayrapetyan, H., Hazeleger,W.C., & Beumer, R.R.(2012). Inhibition of Listeria monocytogenes by pomegranate (Punica granatumpeel extract in mea paté at different temperatures. *Journal of Food Control*, 23(1) 66-72.
- Hernandez, E. (1994). Edible coating from lipids and resins .In E.A.Badwin,R.Hagenmaier.&J.Bai(Ed), Edible coating and films to improve food quality, *Journal of Science and Technology*., 279-303.
- Holley, R.A.& Patel, D.(2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Journal of Food Microbiology* , 22(4), 273-292.
- Hosseini, M., Razavi, S., & Mousavi, M. A.(2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Process and preservation*. 33(6), 727-743.
- Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S.(2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Kargiotou, C., Katsanidis, E., Rhoades, J., Kontominas, M., & Koutsoumanis, K.(2011). Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. *Journal of Food Microbial*, 28(1), 158-63.
- Krochta, J.M.(2002). Protein as raw materials for films and coating: definition,current status and opportunities,In A.Gennadios(Ed) .*Protein based films and coatings*, 1-41.
- Lee, K. Y., Shim, J., & Lee, H. G. (2003).Mechanical properties of gellan and gelatin composite films. *Journal of Carbohydrate Polymers*, (56)251-254.
- Li, Y., Gue, C.h., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S.h.(2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Journal of Food Chemistry*.(96), 260-254.
- Martos, V., Lopez, J.F., Alvarez, J. A.P.(2010). Pomegranate and its many Functional Components as related to human health. *Journal of Food Science and Food Safety*. 9(4), 635-659.
- Mauer, L. J., Smith, D.E. and Labuza, T. P. (2000). Water vapor permeability, mechanical, and

- structural properties of edible B- casein- films. *International dairy journal*, 10: 353-358.
- Pires, C. (2011). Characterization of biodegradable films prepared with hake protein and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105(3), 428-442.
- Pires, C.(2013). Hake protein edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Journal of Food Hydrocolloids*,10(3), 224-231.
- Pranoto, y., Raskshit , S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil , potassium sorbate and nisin. *Journal of Food Science and technology*. 38 , 859-865.
- Pruneda, E.(2008). Water Vapor Permeability, Mechanical Properties and Antioxidant Effect of Mexican Oregano-Soy Based Edible Films. *Journal of food science*, 73(6), 2488-2493.
- Rhim, J.W., & Ng, P. K. W.(2007). Natural biopolymer-basednanocomposite films for packaging applications. *Journal of Food Science and Nutrition*, 47, 411–433.
- Seydim, A. C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *J. Food Research International*, 39: 639-644.
- Taqi, A., Askar K. A., Nagy., K, Mutihac, L., & Stamatina, L. (2011). Effect of different concentrations of olive oil and oleic acid on the mechanical properties of albumen (egg white) edible films. *African Journal of Biotechnology*. 10(60),12963–12972.
- Tharanathan, R.N.(2003).Biodegradable films and composite coatings: past / present and future. *Journal of Food Science and Technology*.(14), 71-78.
- Tian, H., Tang, Z., Zhuang, X., & Chen, X.(2012). Biodegradable Synthetic polymers, preparation, functionalization and biomedical application . *Journal of progressin polymer science*. 37(2), 237-28.
- Torrers, J. A., Bouzas, J. O., & Karel, M. (1985). Microbial Stabilization of Intermediate Moisture Food Surfaces.Control of Surface pH. *Journal of Food Processing and Preservation*.9(2),93-106.
- Tunc, S., & O. Duman.(2007). Thermodynamic properties and moisture adsorption isotherms of cottonseed protein isolate and different forms of cottonseed samples. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 133-143.
- Zinoviadoi, K. G., Koutsoumains, K. P., & C. G. Biliaderis. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing organo oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Journal of Meat Science*.82(3), 338-345.
- Zoreky, N. S. A. L. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (punicagranatum L.) fruit peels International. *Jornal of food Microbiology*, 134, 244- 248.