Karafan

Quarterly Scientific Journal of Technical and Vocational University

Winter 2022, Vol. 18, No. 4, p. 175-188

Journal homepage: https://karafan.tvu.ac.ir/?lang=en

TVU

doi:10.48301/KSSA.2021.130035 20.1001.1.23829796.1400.18.4.11.6

Original Research

E-ISSN: 2538-4430
ISSN: 2382-9796

Effect of Alginate gum and Walnut leaf Extract on Mechanical, Physical and Antimicrobial Properties of Wheat Protein Isolate

Haleh Hemmati[1*], Roghieh Ashrafi Yorghanlu[2], Mahla Pirouzifard[3]

[1]MSc., Department of Agricultural Engineering, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran.

[3]MSc., Department of Agricultural Engineering, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Received: 12.11.2020
Revised: 04.17.2021
Accepted: 05.03.2021

Keyword:
Wheat protein isolate
Alginate gum
Walnut leaf extract

***Corresponding Author:**
Haleh Hemmati
Email: *haleyeshab@gmail.com*

ABSTRACT

The aims of this study were to produce biodegradable and antimicrobial films based on wheat gluten and investigate the effects of adding alginate gum (0 to 1.5%) and walnut leaf extract (800, 400 and 200 ppm) on their physical and chemical properties. The results showed that by adding different amounts of alginate gum and extract to the films, the solubility and permeability of the films to water vapor was significantly reduced. The film containing 1.5% gum and 800 ppm of the extract, had the lowest solubility (22.109%) and water vapor permeability at a rate of 5.039 -10 10-10 g / m.s. By adding the extract and increasing the concentration used in the composition of the films, there was a significant increase in the antioxidant content of the films. Thus, the film samples containing 800 ppm of extracts had the highest antioxidant capacity. Evaluation of the mechanical properties also showed that the addition of alginate extract and gum caused a significant reduction in the percentage of tensile strength and tensile strength of the films compared to the control sample. The maximum no growth halo diameters of the sample containing 800 ppm of the extract on E. coli and Staphylococcus aureus were 27.631 and 25.076 mm, respectively. The results illustrates that walnut leaf extract can be used as a natural preservative in combination with film for food packaging.

© 2022 Technical and Vocational University, Tehran, Iran. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

کارافن
فصلنامه علمی دانشگاه فنی و حرفه‌ای
زمستان ۱۴۰۰، دوره ۱۸، شماره ٤، ۱۸۸-۱۷۵
آدرس نشریه: https://karafan.tvu.ac.ir/
doi:10.48301/KSSA.2021.130035
20.1001.1.23829796.1400.18.4.11.6
شاپای الکترونیکی: ۲۵۳۸-۴۴۳۰
شاپای چاپی: ۲۳۸۲-۹۷۹۶

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر ویژگی‌های مکانیکی، خواص فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم ایزوله پروتئین گندم

هاله همتی[1*]، رقیه اشرفی یورقانلو[2]، مهلا پیروزی فرد[3]

۱- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران.
۲- استادیار، گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران.
۳- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۹/۲۱
بازنگری مقاله: ۱۴۰۰/۰۱/۲۸
پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳

کلید واژگان:
ایزوله پروتئین گندم
صمغ آلژینات
عصاره برگ گردو

***نویسنده مسئول:** هاله همتی
پست الکترونیکی:
haleyeshab@gmail.com

چکیده

هدف از این پژوهش، تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر و ضدمیکروبی بر پایه گلوتن گندم و اثر افزودن صمغ آلژینات (۰ تا ۱/۵٪) و عصاره برگ گردو (۰، ۴۰۰، ۸۰۰ ppm و ۲۰۰) و اثرات این متغیرها بر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی فیلم‌ها است. نتایج نشان داد که با افزودن مقادیر مختلف صمغ آلژینات و عصاره به فیلم، از انحلال‌پذیری و نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخارآب به‌طور معنی‌داری کاسته شد. فیلم حاوی ۱/۵٪ صمغ و ۸۰۰ ppm عصاره، کمترین میزان انحلال‌پذیری (۲۲/۱۰۹٪) و کمترین نفوذپذیری به بخارآب به میزان $۵/۰۳۹ \times ۱۰^{-۱۱}$ g/m.s.Pa را دارا بود. با افزودن عصاره و افزایش غلظت به‌کار رفته از آن در ترکیب فیلم‌ها، افزایش معنی‌داری در میزان محتوای آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها گردید؛ به‌طوری‌که نمونه فیلم حاوی ۸۰۰ ppm عصاره بیشترین توانایی آنتی‌اکسیدانی را داشتند. ارزیابی خواص مکانیکی نیز نشان داد که افزودن عصاره و صمغ آلژینات سبب کاهش معنی‌داری بر میزان درصد کشش و مقاومت کششی فیلم‌ها با افزایش صمغ نسبت به نمونه شاهد شدند. بیشترین قطر عدم هاله رشد مربوط به نمونه حاوی ۸۰۰ ppm عصاره بر روی *ای کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۲۷/۶۳۱ و ۲۵/۰۷۶ میلی‌متر بود. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که عصاره برگ گردو می‌تواند به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی در ترکیب با فیلم برای بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

© 2022 Technical and Vocational University, Tehran, Iran. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

مقدمه

بسته‌بندی یا پوشش غذا نقش منحصربه‌فردی در سلامت غذا و در نتیجه مصرف‌کننده ایفا می‌کند. مسلم است که بیشتر فراورده‌های غذایی با نوعی روش بسته‌بندی به مصرف‌کننده می‌رسد و در نتیجه بسته‌بندی، بخش مهمی در زنجیره غذایی می‌باشد. پلاستیک‌ها با منشأ مواد نفتی مثل پلی‌اولفین‌ها، پلی‌استرها و پلی‌آمیدها به علت در دسترس بودن مقادیر زیاد، قیمت پایین و ویژگی کاربردی مطلوب به‌طور گسترده به‌عنوان مواد بسته‌بندی به‌کار می‌روند [۱]. زیست تخریب‌پذیری مواد پلاستیکی سنتزی حاصل از مشتقات نفتی بسیار کند است و تجزیه کامل آن‌ها چندین سال به طول می‌انجامد و این امر باعث افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌گردد؛ از این رو طی سال‌های اخیر، یافتن جایگزینی مناسب برای پلاستیک‌های سنتزی به‌طوری که زیست تخریب‌پذیری بالایی داشته باشد و آلودگی زیست‌محیطی کمتری بر جای بگذارد توجه محققان را به خود را جلب کرده است. بیوپلیمرهای خوراکی با زیست تخریب‌پذیری بالا که از منابع قابل‌تجدید کشاورزی حاصل می‌شوند گزینه‌ای مناسب در این زمینه به‌شمار می‌روند. با وجود مزایای مسلم زیست‌محیطی و پایداری پلیمرهای زیستی این قیمت روبه رشد نفت خام و گاز طبیعی است که عامل محرک برای سرمایه‌گذاری اقتصادی در این زمینه است. این موضوع و دو عامل محرکه تلاش برای بازیافت بیشتر ضایعات و همچنین ثبات محیط‌زیست و مدیریت کشاورزی این ضرورت را ایجاد می‌کند که تغییری به سمت پلاستیک‌های زیستی صورت گیرد. همان‌طور که بیان شد بیوپلیمرها مزایایی دارند که مهم‌ترین آن‌ها، زیست تخریب‌پذیری و تجدیدپذیری این مواد است. اما با این وجود، خواص مکانیکی ضعیف و نفوذپذیری بالا نسبت به بخارآب دو عیب اصلی آن‌ها محسوب می‌شود که باعث محدود شدن استفاده غنی‌تر از این مواد در بسته‌بندی می‌گردد [۲]. گلوتن گندم، یکی از بیوپلیمرهای زیست تخریب‌پذیر است که ویژگی‌های فیلم‌سازی مطلوبی دارد و برای تولید مواد بسته‌بندی مورد استفاده قرار می‌گیرد. گلوتن زنده (وایتال)، توده‌ای چسبنده و الاستیک است که پس از شست‌وشو و خارج کردن نشاسته از خمیر آردگندم بر جای می‌ماند [۳]. فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر حاصل از گلوتن در عین حال که انعطاف‌پذیرند، مقاومت کافی دارند و همچنین نسبتاً شفاف هستند اما نفوذپذیری ضعیف به بخارآب و ویژگی‌های مکانیکی ضعیف این فیلم‌ها در مقایسه با فیلم‌های سنتزی کاربرد آن‌ها را در بسته‌بندی موادغذایی محدود کرده‌است. همچنین فیلم گلوتن می‌تواند به‌عنوان حامل موادافزودنی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، مواد ضدمیکروبی و مواد عطروطعمی عمل کند و باعث حفظ کیفیت موادغذایی کمک شود [۲]. برای این منظور در این پژوهش برای بهبود خواص مکانیکی فیلم حاصل از گلوتن گندم، از صمغ آلژینات استفاده شده است. آلژینات از خانواده جلبک قهوه‌ای *Phaeophyceae* و به‌خصوص گونه‌های *Laminaria sp.* , *Macroscystis pyrifera, Ascophyllum nodosum, Eclonia sp., Lessonia nigrescens, Durvillae antarctica* و *Sargassum spp.* استخراج می‌گردد. آلژینات‌ها، پلیمرهای خطی و بدون شاخه هستند که از واحدهای دی مانورونیک‌اسید (M) با پیوندهای (4-1)- b و ال گلورونیک اسید (G) با پیوندهای (4-1)- a تشکیل شده‌اند؛ بنابراین غیریونی هستند. آلژینات‌ها در محلول آبی، پس از افزودن عوامل پل‌ساز (برای مثال نمک‌های کلسیم) یا خشک‌کننده یا ته‌نشینی در حضور یک الکل، تشکیل فیلم می‌دهند. آلژینات‌ها مانع از از دست رفتن رطوبت می‌شوند و به دلیل مقاومت بالا در برابر اکسیژن اکسیداسیون را به تعویق می‌اندازند. فیلم‌های بر مبنای آلژینات دارای خصوصیات بازدارندگی خوبی در برابر چربی‌ها هستند ولی در برابر بخارآب نسبتاً نفوذپذیر هستند [۴]. پوست سبز گردو یکی از مهم‌ترین ضایعات حاصل از گردو پس از جدا کردن مغز است و در حال حاضر در داخل کشور بیشتر برای سوزاندن استفاده می‌شود [۵]. استفاده از این محصول فرعی به‌عنوان منبعی از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث افزایش میزان ارزش‌افزوده تولید گردو می‌شود و می‌توان با ساماندهی و صنعتی کردن کاربرد آن، مواد بسیار با ارزشی به‌دست آورد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردو توسط مطالعات متعددی به اثبات رسیده است. برای مثال فعالیت آنتی

اکسیدانی مغز گردو توسط ژانگ و همکاران[1] (۲۰۰۹) نشان داده شده است [۶]. سایر مشتقات گردو نیز ویژگی آنتی‌اکسیدانی دارد و استفاده از محصولات فرعی و ضایعات حاصل از آن کمک زیادی به اقتصاد و حفظ محیط‌زیست می‌کند. پوست، مغز، شاخه و برگ گردو در صنایع آرایشی بهداشتی و داروسازی کاربرد دارد [۷]. برگ گردو به عنوان یک ماده قابض و ضدانگل در طب سنتی شناخته شده است، همچنین به‌منظور درمان نارسایی‌های وریدی، بواسیر و غیره از قدیم مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۸]. چالشتری و همکاران [۹]، اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی برگ گردو را بر چند باکتری بررسی کرده‌اند. نتایج نشان داد عصاره برگ گردو تأثیرات ضدباکتری دارد و می‌تواند در دندان‌پزشکی به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال مورد استفاده قرار گیرد.

تانگ و همکاران[2] (۲۰۰۸)، خواص تابع گلوتن گندم و مونت موریلونیت (خاک رس)، فیلم‌های نانو کامپوزیتی توسط فرایند قالب‌گیری را بررسی کردند. حضور مونت موریلونیت منجر به کاهش قابل‌توجه اندازه‌گیری زاویه اتصال، جذب آب و بخارآب جذب شده، می‌شود. این تأثیر به ساختارهای مختلف از شبکه پروتئین در حضور مونت موریلونیت نسبت داده شد [۱۰]. تغییرات قابل‌توجه در نفوذپذیری فیلم نسبت به بخارآب و ترکیبات آروما در مونت موریلونیت بالاتر از ۵٪ WT مشاهده شد. در نفوذپذیری اکسیژن و دی‌اکسیدکربن، تغییری ایجاد نشد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی عصاره برگ گردو و صمغ آلژینات روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فیلم گلوتن گندم و امکان‌سنجی تولید فیلمی زیست تخریب‌پذیر در قالب بررسی ویژگی‌های نفوذپذیری در برابر بخارآب، خواص فیزیکی و مکانیکی، تغییرات ریزساختاری و ضدمیکروبی فیلم‌های تولیدی است.

مواد و روش‌ها

مواد

گلوتن گندم از شرکت (خوشه زرین، خراسان شمالی) خریداری شد. صمغ آلژینات سدیم و DPPH (۲ و ۲-دی‌فنیل بتا پیکریل هیدرازیل) (شرکت سیگما)، گلیسرول و کلریدکلسیم (مرک آلمان)، عصاره برگ گردو (ادونیس گل‌دارو، تهران)، سویه‌های میکروبی شامل باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] و *ا. کلای*[4] تهیه شده از (دانشکده دامپزشکی مشهد)، محیط کشت BHI[5] (مرک آلمان) هستند.

تهیه فیلم

برای تهیه فیلم ابتدا ۴ گرم گلوتن گندم با ۰/۰۳ گرم سولفیت سدیم ترکیب، سپس ۵۰ میلی‌لیتر الکل اتانول اضافه شد و بشر در حمام آب گرم تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا گلوتن به خوبی حل شود. سدیم آلژینات نیز در سطوح ۰/۵ تا ۱/۵٪ در ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰ rpm هم زده شد. سپس محلول گلوتن و دیسپرسیون سدیم آلژینات با یکدیگر مخلوط شدند و عصاره برگ درخت گردو به میزان تعیین شده (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ppm) و گلیسرول به میزان ۵۰٪ وزن پایه فیلم (۲ گرم) به فرمولاسیون اضافه

[1] Zhang
[2] Tong
[3] E.coli
[2] Staphylococcus aureus
[3] Brain heart infusion

گردید. محلول تهیه شده به ظروف شیشه‌ای مستطیلی‌شکل در ابعاد ۱۲×۲۰ و ارتفاع ۱ سانتی‌متر منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط قرار گرفته شد تا فیلم‌ها خشک شوند.

اندازه‌گیری حلالیت در آب

برای اندازه‌گیری حلالیت، تکه‌هایی از فیلم پس از توزین در دمای $105\ C^0$ به مدت ۶ ساعت خشک و سپس وزن گردید (W_1). تکه‌های فیلم در ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر غوطه‌ور و به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۵۰ rpm طی همزنی قرار گرفت. سپس محلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور داده شد و در آخرین توزین (W_2) آن پس از خشک کردن در آون به‌دست آمد [۱۱]. درصد حلالیت با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(W_1-W_2)/W_1\times 100\ (\%) = \text{Solubility}$$ رابطه (۱-۲)

تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی از دست دادن اتم هیدروژن توسط ترکیبات فنولیک یا میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل- هیدرازیل عصاره متانولی فیلم‌ها سنجیده شد. در این آزمون از DPPH به‌عنوان ترکیبات رادیکالی پایدار استفاده گردید. میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 ساخت آمریکا در طول موج ۵۱۷ nm ثبت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها به‌صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۲].

$$\text{DPPH}_{\text{scavenging activity}}\ (\%) = \frac{(Abs_{control}-Abs_{sample})}{Abs_{control}}\times 100$$ رابطه (۲-۲)

$Abs_{control}$: میزان جذب نمونه فیلم شاهد

Abs_{sample}: میزان جذب نمونه فیلم حاوی عصاره برگ گردو

اندازه‌گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون تنش- کرنش، یکی از پرکاربردترین آزمون‌های تعیین رفتار مکانیکی فیلم‌ها می‌باشد. آزمون‌های کشش با استفاده از دستگاه بافت‌سنج مدل Systems UK TA.XT Plus, Stable Micro و طبق استاندارد [ASTM](22-91) اندازه‌گیری شد. قبل از انجام آنالیز نمونه‌ها در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم (دمای $25\ C^0$) به مدت ۲۴ ساعت مشروط شدند. سپس از هر فیلم نمونه‌ای به شکل دمبل با ابعاد ۸×۰/۵ cm بریده شد و در بین دو فک دستگاه قرار گرفت. فاصله اولیه بین دو فک و سرعت حرکت فک بالایی به‌ترتیب ۳۰mm و ۰/۸۳۳ mm تعیین و داده‌ها به کمک رایانه ثبت شد. فاکتورهای اندازه‌گیری شامل مقاومت کششی [1](TS) و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی [2](STB) می‌باشد. مقاومت کششی، نمایانگر حداکثر قدرت مقاومتی یک فیلم در برابر تنش کششی اعمال شده می‌باشد که طبق رابطه زیر محاسبه شد [۱۲].

رابطه (۳-۲) مساحت مقطع عرضی اولیه فیلم / حداکثر نیرو در لحظه پاره شدن = مقاومت کششی

رابطه (۴-۲) طول اولیه نمونه بین دو فک / مقدار اتساع تا لحظه پارگی = درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی

[1] Tensile strength
[2] Strong to break

رابطه (۵-۲) ضخامت اولیه فیلم × عرض اولیه فیلم = مساحت مقطع عرضی اولیه فیلم

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

به‌منظور بررسی تأثیر افزودن صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر ریزساختارهای فیلم تولید شده، تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح فیلم‌ها تهیه گردید. تصویربرداری از نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی با کاربری ۱۵ کیلووات و در بزرگ‌نمایی ۲μm انجام پذیرفت [۱۳].

بررسی تأثیر ضدمیکروبی فیلم

به منظور بررسی تأثیر ضدمیکروبی فیلم گلوتن گندم حاوی سدیم آلژینات و عصاره برگ گردو، بر باکتری‌ها از روش کشت سطحی گردید. به طوری که در شرایط استریل و در زیر هود ۰/۱ ml از محیط کشت BHI که سوش در آن فعال شده بود به محیط کشت BHI آگار منتقل گردید و به وسیله میله L شکل استریل در سطح محیط کشت پخش شد. سپس فیلم‌های حاوی عصاره توسط دیسک‌هایی با قطر ۹ میلی‌متر بریده شد و روی محیط کشت قرار گرفت. محیط کشت همراه با دیسک‌ها به‌صورت وارونه در گرم‌خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت از گرم‌خانه خارج شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. قطر هاله عدم رشد که در اطراف دیسک‌ها تشکیل شده بود اندازه‌گیری گردید [۱۴].

تجزیه‌وتحلیل آماری

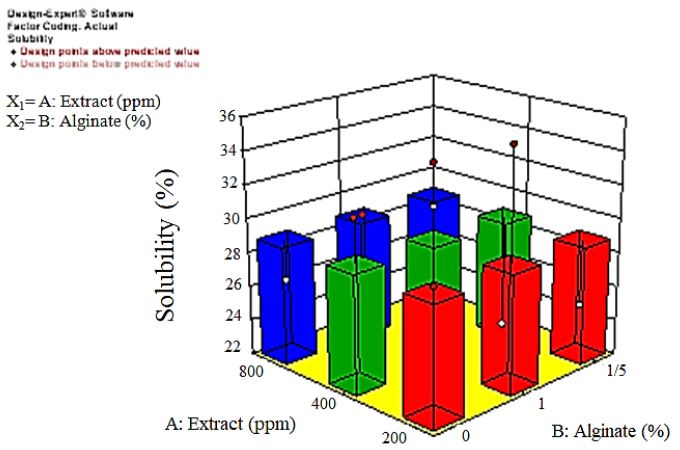
جامعه آماری شامل ۹ نوع فیلم ایزوله پروتئین گندم حاوی عصاره برگ گردو و صمغ آلژینات در غلظت‌های مختلف می‌باشد. همه آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) در سطح احتمال ($p<۰/۰۵$) و آزمون چند دامنه‌ای توکی برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت. تجزیه‌وتحلیل نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ انجام شد.

نتایج

انحلال‌پذیری

حلالیت در آب می‌تواند یکی از مهم‌ترین خصوصیات برای فیلم‌های خوراکی به دلیل مقاومت در برابر آب به‌ویژه در محیط‌های مرطوب باشد. می‌توان گفت که حلالیت فیلم‌ها در آب، زمانی که برای پوشش مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعیین‌کننده انتشار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی از فیلم‌های فعال است. با توجه به شکل ۱، مقایسه میانگین داده‌های حلالیت در آب نشان می‌دهد که بین فیلم‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان حلالیت مربوط به فیلم گلوتن حاوی ppm ۲۰۰ عصاره بود و با افزودن مقادیر مختلف صمغ آلژینات به فرمولاسیون فیلم‌ها، از میزان حلالیت آن‌ها به‌طور معنی‌داری کاسته شد؛ به‌طوری که کمترین میزان حلالیت به فیلم کامپوزیتی حاوی ۱/۵٪ صمغ و ppm ۸۰۰ عصاره تعلق داشت که برابر ۲۲/۱۰۹ ٪ بود. با افزایش میزان صمغ آلژینات به دلیل اینترکشن‌های بین مولکولی با گلوتن ساختار فیلم فشرده و منسجم‌تر می‌شود و خاصیت کریستالی آن افزایش می‌یابد؛ در نتیجه انتشار مولکول‌های آب به درون پلیمر کاهش می‌یابد که مجموعه این عوامل سبب کاهش حلالیت فیلم‌های بر پایه گلوتن با افزایش غلظت آلژینات می‌شود. تأثیر عصاره بر حلالیت فیلم‌ها معنی‌دار است و در غلظت ثابتی از صمغ، افزودن عصاره منجر به کاهش حلالیت فیلم‌ها نسبت به نمونه شاهد می‌گردد و با افزایش غلظت، بر میزان این تأثیر افزوده می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که با به‌کار بردن ترکیبی از صمغ و عصاره در ساختار فیلم، حلالیت آن به‌طور

قابل‌توجهی کاهش می‌یابد. این پدیده مربوط به اینترکشن بین ترکیبات عصاره و گروه‌های هیدورژنی زنجیره‌های گلوتن است که منجر به افزایش خاصیت آب‌گریزی فیلم‌ها شده است [۱۱].

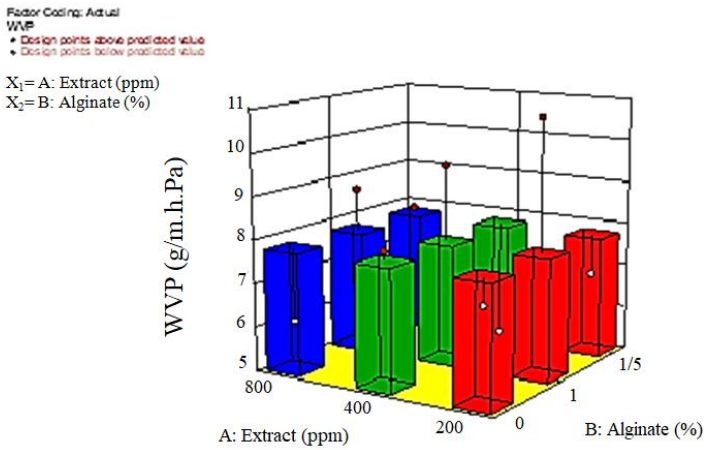


شکل ۱. تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر انحلال‌پذیری

نفوذپذیری به بخارآب

کاربرد بسیاری از فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر ساخته شده از زیست بسپارها، به دلیل بازدارندگی نسبتاً کم به بخارات آب، محدود است. نفوذپذیری نسبت به بخارآب در فیلم‌های امولسیونی بر پایه گلوتن حاوی مقادیر مختلف صمغ آلژینات و عصاره برگ درخت گردو در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان نفوذپذیری به بخارآب در فیلم خالص گلوتن، برابر با ۱۱/۳۴۱×۱۰$^{-۱۱}$ g/m.h.Pa بود که نسبت به فیلم‌های تیمار شده، بیشترین مقدار بود. با افزودن مقادیر مختلف صمغ آلژینات، میزان WVP در همه نمونه‌های فیلم، کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($p<۰/۰۵$)، و با افزایش غلظت این ترکیب از ۰/۵ تا ۱/۵٪ بر میزان بازدارندگی فیلم‌ها نسبت به بخارات آب افزوده گردید. بدین ترتیب کمترین میزان WVP به فیلم حاوی ۱/۵٪ صمغ آلژینات و ۸۰۰ ppm عصاره تعلق داشت که برابر ۵/۰۳۹×۱۰$^{-۱۱}$ g/m.h.Pa بود. با توجه به معنی‌داری بودن تأثیر متقابل عصاره و صمغ آلژینات، افزودن عصاره نیز سبب تشدید بازدارندگی اثر صمغ گردید؛ بدین معنی که در غلظت یکسانی از صمغ آلژینات، فیلم‌هایی که حاوی مقدار بیشتری عصاره بودند، WVP کمتری داشتند، اگرچه اثر عصاره نسبت به صمغ در بازدارندگی فیلم‌ها نسبت به بخارات آب، کمتر بود. همچنین مشخص شد که اثر بازدارندگی صمغ آلژینات وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت آن در بستر فیلم، میزان WVP بیشتر کاهش پیدا کرد. علت کاهش نفوذپذیری به رطوبت در اثر افزودن صمغ آلژینات به گلوتن این است که در این غلظت‌ها زنجیره آلژینات-گلوتن، اتصالات کووالانسی با یکدیگر دارند و پراکندگی مناسب صمغ آلژینات در گلوتن، مسیر پیچ‌خورده‌ای برای عبور مولکول‌های آب ایجاد کرده و متقابلا مسیر آب بلوکه شده و نفوذ بخارآب را در سراسر فیلم پوششی مورد نظر، محدود می‌سازد. نتایج حاصل، مشابه با نتایج تحقیق مو و همکاران[1] (۲۰۱۲) بود که از دی‌آلدئید کربوکسی متیل سلولز برای ایجاد اتصال با ژلاتین استفاده و به مطالعه تأثیر این اتصالات بر نفوذپذیری فیلم‌ها پرداختند [۱۵].

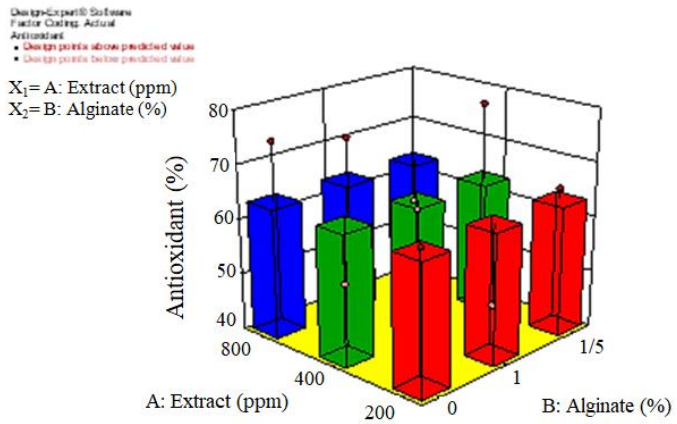
[1] Mu



شکل ۲. تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر نفوذپذیری به بخارآب

خاصیت آنتی‌اکسیدانی

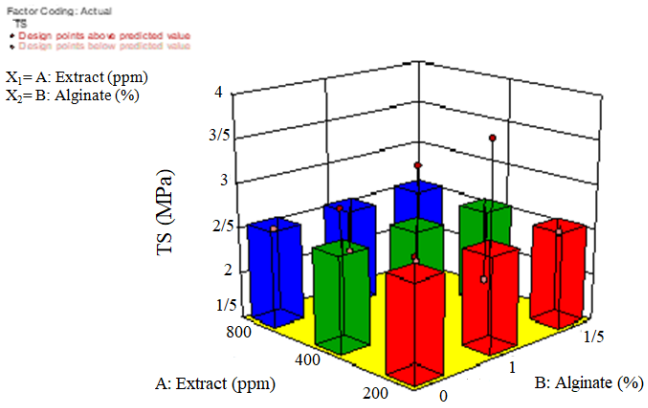
شکل ۳ قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را در فیلم گلوتن حاوی عصاره برگ درخت گردو و صمغ آلژینات را نشان می‌دهد. نتایج، حاکی از معنی‌دار بودن تأثیر هر دو متغیر عصاره و صمغ بر تغییرات خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های تولیدی بود ($p<۰/۰۵$). با افزودن عصاره، خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد به‌شدت افزایش یافت. ترکیباتی نظیر نفتاکیتون، فلاوونوئیدها و ژاگلون از ترکیبات مهم آنتی‌اکسیدانی برگ گردو به‌شمار می‌روند. ژاگلون یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنولیک موجود در گردو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد [۱۶]. طبق نتایج در غلظت ثابتی از صمغ آلژینات، درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد فیلم‌های حاوی ppm ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ عصاره برگ درخت گردو به‌ترتیب برابر ۵۵/۴۹، ۶۵/۷۳ و ۷۷/۵۹ درصد بود و همان‌طور که مشاهده می‌شود با تغییر غلظت صمغ آلژینات در فرمولاسیون فیلم، تفاوت معنی‌داری در خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های گلوتنی ایجاد نشد ($p>۰/۰۵$). در تحقیقاتی مشابه رضایی و الماسی [۱۷]تأثیر نانورس و اسیدسیتریک را بر خواص فیزیکی و آنتی‌اکسیدانی فیلم فعال نشاسته–CMC حاوی عصاره آویشن مطالعه کردند و نتایج نشان داد که با افزودن ۵٪ عصاره در فیلم‌ها، بالاترین فعالیت مهارکنندگی در بین تیمارها به‌دست آمد که برابر ۶۴٪ بود. همچنین مشاهده کردند که با افزودن نانورس و اسید سیتریک در غلظت‌های مختلف، خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم حاوی عصاره، به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت که دلیل این امر را افزایش انسجام ساختاری، کاهش تورم فیلم در محلول متانول و احتمالاً کاهش میزان ترکیبات فنولی آزاد شده از فیلم، در حین اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیان کردند.



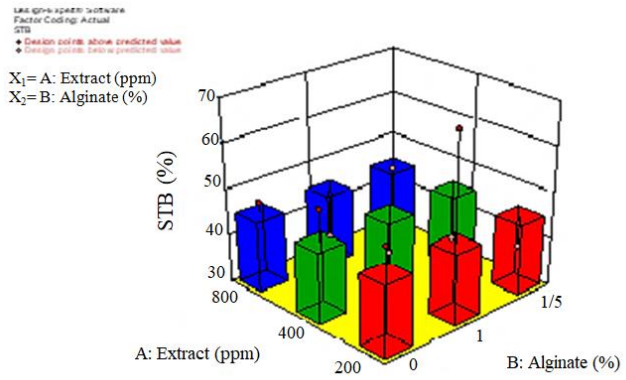
شکل ۳. تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی

خواص مکانیکی

ویژگی‌های مکانیکی، از جمله فاکتورهای مهم در انتخاب نوع بسته‌بندی ماده غذایی است. بسته‌بندی باید توانایی محافظت در برابر تنش‌های فیزیکی و تغییر شرایط محیطی را طی زمان انبارداری تا زمان مصرف داشته باشد. نتایج مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برگ درخت گردو و صمغ آلژینات بر میزان مقاومت کششی (TS) فیلم‌های گلوتن در شکل ۴ نشان داده شده است. بیشترین میزان این پارامتر مربوط به فیلم گلوتن حاوی ppm ۲۰۰ عصاره است که برابر MPa ۴/۷۲۷ بود. به‌کاربردن صمغ آلژینات و عصاره تأثیر منفی بر مقاومت کششی فیلم‌ها داشت؛ به‌طوری که با افزودن ۱ و ۱/۵ درصد آلژینات در ترکیب با غلظت‌های مختلف عصاره، استحکام کششی به ترتیب تا MPa ۲/۶۶- ۱/۹۲ کاهش یافت که اختلاف بین فیلم‌های حاوی مقادیر مختلف آلژینات از نظر این پارامتر، معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در حالی که در غلظت ثابت صمغ، افزایش مقدار عصاره، تغییر معنی‌داری در مقاومت کششی فیلم‌ها ایجاد نکرد ($p>۰/۰۵$). اگرچه به‌صورت ترکیبی با صمغ اثر کاهشی بر مقاومت کششی فیلم‌ها در مقایسه با نمونه کنترل داشت. همان‌طور که اشاره شد اگرچه تأثیر مستقل عصاره بر مقاومت کششی، معنی‌دار نبود ولی به‌طور غیرمستقیم با کاهش نیروهای چسبندگی کل شبکه پلیمر و تضعیف پیوندهای بین آلژینات و گلوتن سبب کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها می‌شود. همچنین ترکیبات فنلی عصاره، باعث کاهش چگالی شبکه فیلم و در نتیجه جابه‌جایی آسان‌تر زنجیره‌های پلیمر تحت استرس‌های مکانیکی می‌شوند. میزان ازدیاد طول تا نقطه شکست فیلم‌ها (STB) نیز در شکل ۵ ارائه شده است. بررسی داده‌های حاصل نشان داد که نمونه حاوی ppm ۲۰۰ عصاره نسبت به سایر نمونه‌ها از تفاوت معنی‌داری برخوردار بود ($P<۰/۰۵$) و بیشترین میزان کشش تا نقطه پارگی را داشت (۹۸/۹۷۲٪). با افزایش درصد صمغ به‌کار رفته در ترکیب فیلم، میزان کشش تا نقطه پارگی، کاهش معنی‌داری یافته است. بیشترین میزان کشش و ازدیاد طول بین نمونه‌های حاوی آلژینات، مربوط به نمونه حاوی ۱٪ صمغ آلژینات و ppm ۲۰۰ عصاره و کمترین میزان مربوط به نمونه حاوی ۱/۵٪ صمغ آلژینات و ppm ۸۰۰ می‌باشد. با افزودن مقادیر مختلف عصاره نیز میزان ازدیاد طول فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که میزان این کاهش با افزایش میزان عصاره بیشتر شده است. هیدروکلوئیدها یا صمغ‌ها، پلی‌ساکاریدهایی آب‌دوست، محلول در آب با وزن مولکولی بالا هستند که به دلیل ماهیت پلیمری و برهم‌کنش‌هایی که بین زنجیره‌های آن‌ها رخ می‌دهد، باعث افزایش گرانروی محلول تهیه فیلم می‌شود [۱۸]. افزایش گرانروی باعث کاهش سرعت خشک‌شدن فیلم و در نتیجه، بهبود خصوصیات فیلم‌ها می‌شود [۱۹].



شکل ۴. تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر مقاومت به کشش

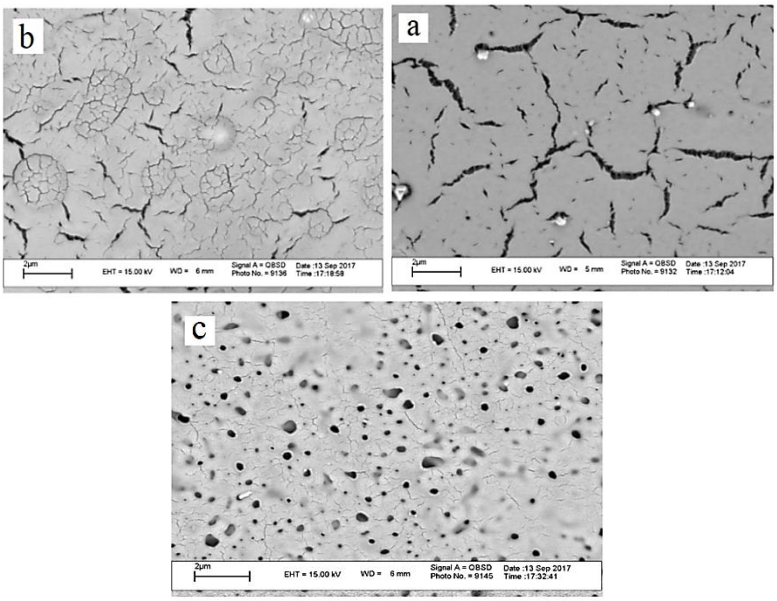


شکل ۵. تأثیر صمغ آلژینات و عصاره برگ گردو بر ازدیاد طول تا نقطه شکست

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای مشاهده و ارزیابی مورفولوژی فیلم‌ها و پلیمرها از آزمون SEM استفاده می‌شود. در مورد کامپوزیت‌ها و نانوکامپوزیت‌ها تصاویر SEM می‌تواند میزان همگن بودن، توزیع یکنواخت نانوذرات و نانوفیبرها داخل شبکه پیوسته فیلم، وجود فضای خالی، جهت‌گیری تصادفی نانوذرات و وجود تجمع و تراکم این ذرات را نشان دهد. شکل ۶ تصاویر SEM از سطح مقطع تعدادی از فیلم‌های تولیدی را نشان می‌دهد. فیلم فاقد صمغ آلژینات حاوی ppm ۲۰۰ عصاره دارای سطحی ناصاف با شکاف و ترک‌های نسبتاً درشتی است که منجر به زبر شدن سطح فیلم می‌شود. با افزودن ppm ۴۰۰ عصاره و ۱ درصد صمغ آلژینات، اندازه حفرات درشت‌تر و تعداد آن‌ها بیشتر ولی اندازه ترک و شکاف‌ها کوچک‌تر و تعداد آن‌ها بیشتر شده است. در ادامه با افزودن مقدار آلژینات تا مقدار ۱/۵ درصد در غلظت ppm ۸۰۰ عصاره، حفرات بسیار کمتر شده و تقریباً از بین رفته است ولی تعداد ترک و شکاف‌های بسیار ریز در سطح فیلم به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. افزایش ترک‌خوردگی‌ها و ریزتر شدن آن‌ها در اثر افزودن عصاره و آلژینات منجر به کاهش مقاومت

مکانیکی فیلم‌ها می‌شود؛ به‌طوری که نتایج استحکام کششی فیلم‌ها نیز این موضوع را تأیید می‌کند. در واقع حضور عصاره باعث غیریکنواخت شدن ساختار گلوتن شده است که این حالت می‌تواند نتیجه فراریت ترکیبات عصاره (بی‌نظمی‌هایی از قبیل حباب‌های هوا و منافذ) و نیز اثر امولسیون روغن در آب در بستر فیلم گلوتن باشد. علت ایجاد ترک‌خوردگی و بی‌نظمی زیاد به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر آلژینات نیز احتمالاً توزیع غیریکنواخت، ناسازگاری آلژینات با گلوتن و در نتیجه، افزایش زبری سطح فیلم‌ها و تخریب ریزساختار زیست پلیمرها باشد. Tong و همکاران [۱۰] نیز در خصوص تهیه و ارزیابی خصوصیات فیلم‌های ترکیبی پولولان-آلژینات -کربوکسی متیل سلولز، علت صاف و منسجم بودن سطح فیلم حاصل از تصاویر SEM را سازگاری صمغ‌های پولولان و آلژینات با پلیمر CMC بیان کردند. با توجه به تحقیقات پیش‌گفته و مقایسه آن با نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که صمغ آلژینات سازگاری مناسبی با گلوتن نداشته است و افزودن عصاره نیز بر افزایش این ناسازگاری و بی‌نظمی افزوده است؛ در نتیجه، تأثیر قابل‌توجهی بر ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها گذاشته است؛ به‌طوری که باعث کاهش مقاومت کششی و درصد کشش‌پذیری فیلم‌های گلوتن شده است.



شکل ۶. تصویرمیکروسکوپی روبشی نمونه فیلم‌های تولیدی (a: نمونه فیلم شاهد (ایزوله پروتئین گندم حاوی ppm ۲۰۰ عصاره برگ گردو)، b: نمونه فیلم ۱٪ صمغ و ppm ۲۰۰ عصاره برگ گردو، c: نمونه فیلم حاوی ۱/۵٪ صمغ و ppm ۸۰۰ عصاره)

خواص ضدمیکروبی

در جدول ۱ میزان فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های تولید شده بر باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد *اشرشیا کولای*[1] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد فیلم‌های حاوی حداکثر غلظت عصاره و صمغ بیشترین

[1] Escherichia coli
[2] Staphylococcus aureus

خاصیت ضدمیکروبی و تأثیرگذاری بر باکتری‌های *اشرشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان داده‌اند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده تأثیرگذاری نمونه حاوی ppm ۸۰۰ عصاره بر باکتری اکولای بیشتر از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. بیشترین قطر عدم هاله رشد مربوط به نمونه حاوی ppm۸۰۰ عصاره بر *اشرشیا کولای* و کمترین میزان عدم هاله رشد مربوط به نمونه حاوی ۱/۵٪ صمغ آلژینات و ppm ۲۰۰ عصاره بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. در حالت کلی، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به مواد ضدمیکروبی گیاهی حساس‌ترند که این احتمالاً به علت تفاوت در ساختار غشای سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی یا تفاوت در حساسیت این غشا به نسبت صمغ آلژینات و عصاره باشد [۲۰].

جدول ۱. خاصیت ضدمیکروبی (هاله عدم رشد) فیلم های گلوتن گندم حاوی آلژینات سدیم و عصاره برگ درخت گردو بر میکروارگانیسم‌های پاتوژن و عامل فساد (*باکتری اشرشیا کلای و استافیلوکوکوس اورئوس*)

نمونه	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*
۰ درصد صمغ آلژینات و ppm ۸۰۰ عصاره برگ درخت گردو	۲۷/۶۱۳± ۰/۰۸۷^{a}	۲۵/۰۷۶±۰/۱۱۵^{a}
۱/۵ درصد صمغ آلژینات و ppm ۸۰۰ عصاره برگ درخت گردو	۲۴/۱۰۹±۰/۲۰۵^{b}	۲۴/۲۹۸± ۰/۵۲۳^{b}
۱/۵ درصد صمغ آلژینات و ppm ۴۰۰ عصاره برگ درخت گردو	۱۹/۳۱۷±۰/۱۷۵^{c}	۱۸/۰۶۵±۰/۴۱۹^{c}
۱/۵ درصد صمغ آلژینات و ppm ۲۰۰ عصاره	۱۱/۱۴۹ ±۰/۳۱۱^{d}	۱۰/۲۴۷± ۰/۵۳۹^{d}

*اطلاعات ارائه شده برحسب میلی‌متر می‌باشد (قطر اولیه دیسک‌ها ۵ میلی‌متر می‌باشد)

*حروف غیرمشابه در هر ستون نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

به علت مشکلات پلیمرهای نفتی در آلودگی محیط‌زیست، فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر شاید نتوانند به جای همه انواع بسته‌بندی‌ها به‌کار روند، اما توانایی جایگزینی با بسیاری از این بسته‌بندی‌ها را دارند. این فیلم‌ها دارای توانایی منحصربه‌فرد حمل افزودنی‌های غذایی نیز هستند که باعث کاربرد آن‌ها در سطحی بالاتر از سایر بسته‌بندی‌ها می‌شود. با در نظر گرفتن نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، ترکیب مقادیر صمغ آلژینات و عصاره برگ درخت گردو به ماتریکس شبکه فیلم باعث بهبود قابل‌ملاحظه‌ای در خواص فیزیکی گردید. تعامل مناسب بین صمغ آلژینات و عصاره، عامل اصلی کاهش WVP و کاهش انحلال‌پذیری فیلم گلوتن خالص بیان شد. با افزایش غلظت آلژینات با توجه به نتایج آزمون SEM سطح فیلم غیریکنواخت شد که این امر سبب کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها گردید. بررسی سازگاری عصاره برگ درخت گردو با گلوتن به‌منظور تولید فیلم‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی، نتایج رضایت‌بخشی در پی داشت و ترکیب عصاره قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مناسبی به فیلم‌ها بخشید. با توجه به تمامی تحقیقات انجام گرفته در زمینه فیلم‌های بسته‌بندی حاوی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی، امکان تولید این فیلم‌ها و استفاده از این نگهدارنده‌های طبیعی به‌منظور کاهش بار میکروبی و به تبع آن، افزایش عمر نگهداری مواد غذایی مختلف وجود دارد. عصاره برگ درخت گردو نیز به دلیل وجود ترکیبات ضدمیکروبی خود، قابلیت استفاده به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی، ایمن و بی‌ضرر را برای مصرف‌کننده دارد. با این حال تحقیقات بیشتری در رابطه با کاربرد این فیلم‌ها و خواص ضدمیکروبی آن‌ها نیازاست. عصاره‌های مختلف دارای ترکیبات مختلفی هستند که یک یا چند ترکیب در آن‌ها غالب است و می‌توانند باعث تغییرات مختلفی در ویژگی‌های فیلم شوند.

References

[1] Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J.-H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, Y. K., Park, Y. H., Hwang, C.-Y., Kim, Y.-K., Lee, Y.-S., Jeong, D. H., & Cho, M.-H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *3*(1), 95-101. https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001

[2] Qanbarzadeh, B., & Almasi, H. (2009). A review of the application properties of biodegradable edible films derived from wheat gluten protein. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, *28*(3), 1-15. https://www.sid.ir/fa/Journal/ViewPaper.aspx?ID=106508

[3] Heralp, T., Gnanasambandam, R., McGuire, B., & Hachmeister, K. (1995). Degradable wheat gluten films: preparation, properties and applications. *Journal of Food Science*, *60*(5), 1147-1150. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06311.x

[4] Olivas, G. I., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Alginate–calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(2), 359-366. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.015

[5] Ahmadvand, H., Khosrobaigei, A., Shahsavari, G., Abdolahpour, F., Bagheri, S., & Rashidi pour, M. (2011). The inhibitory effects of Walnut (Juglansregia L.) huskhydroalcoholic extract on LDL oxidation in vitro. *Pars of Jahrom University of Medical Sciences*, *9*(3), 1-7. https://doi.org/10.29252/jmj.9.3.1

[6] Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., & Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.). *Food Chemistry*, *113*(1), 160-165. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.061

[7] Fernández-Agulló, A., Pereira, E., Freire, M. S., Valentão, P., Andrade, P. B., González-Álvarez, J., & Pereira, J. A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (Juglans regia L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products*, *42*, 126-132. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.021

[8] Amaral, J., Seabra, R., Andrade, P., Valentão, P., Pereira ,J., & Ferreres, F. (2004). Phenolic profile in the quality control of walnut (Juglans regia L.) leaves. *Food Chemistry*, *88*(3), 373-379. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.055

[9] Chaleshtori, R., Sharafati-Chaleshtori, F., & Rafieian-Kopaei, M. (2010). Biological characterization of Iranian walnut (Juglans regia) leaves. *Turkish Journal of Biology*, *35*(5), 635-639. https://doi.org/10.3906/biy-1005-1

[10] Tong, Q., Xiao, Q., & Lim, L.-T. (2008). Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International*, *41*(10), 1007-1014. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.08.005

[11] Peng, Y., Wu, Y., & li, Y. (2013). Development of tea extracts and chitosan composite films for active packaging materials. *International journal of biological macromolecules*, *59*, 282-289. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.019

[12] Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film by incorporating rosemary essential oil and nanoclay into Chitosan. *Journal of Food Engineering*, *111*(2), 343–350. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012

[13] Casariego, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Díaz, R., & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, *23*(7), 1895-1902. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.007

[14] Boroumand, A., Hamedi, M., Emamjome, Z., & Razavi, S. H. (2013). Investigation on the antimicrobial effect of caseinate edible film containing the essential oil of Zataria multiflora. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *10*(41), 13-21. http://fsct.modares.ac.ir/article-7-5320-en.html

[15] Mu, C., Guo, J., li, X., Lin, W., & Li, D. (2012). Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. *Food Hydrocolloids*, *27*(2), 22-29. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.09.005

[16] Qadan, F., Thewaini, A. J., Ali, D. A., Afifi, R., Elkhawad ,A., & Matalka, K. Z. (2005). The antimicrobial activities of Psidium guajava and Juglans regia leaf extracts to acne-developing organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*, *33*(2), 197-204. https://doi.org/10.1142/s0192415x05002783

[17] Rezaei, S., & Almasi, H. (2017). Studying of the effect of nanoclay and citric acid on the physical and antioxidant properties of Thyme extract loaded starch-CMC active film. *Journal of Food Research*, *27*(1), 85-98. https://foodresearch.tabrizu.ac.ir/article_6057.html

[18] Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, *23*(6), 1473-1482. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005

[19] Bertuzzi, M. A., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, *82*(1), 17-25. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.016

[20] Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*(18), 5598-5605. https://doi.org/10.1021/jf049389q