

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذره و فیلم کیتوزان بر دو گونه از باکتری‌های بیماری زا با منشأ غذا

پرستو رضایی^a، روحا کسری کرمانشاهی^{b*}

^a کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران
^b استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهراء(س)، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۳/۱۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۹

۵

چکیده

مقدمه: تجزیه‌ناپذیری مواد مورد استفاده در بسته‌بندی‌های مواد غذایی از یک طرف و آلودگی‌های میکروبی ناشی از آن‌ها از طرف دیگر، مشکلاتی را برای جامعه امروزی ایجاد نموده است. از این رو استفاده از موادی که قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی دارند و دارای خاصیت ضد میکروبی نیز هستند، مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. کیتوزان یکی از پلیمرهای زیستی است که در جهت حذف این مشکلات در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا نانوذرات و فیلم کیتوزان را ساخته و بعد از بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها به بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها بر روی باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی که شامل *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* می‌باشد، با روش‌های مختلف پرداخته شد.

یافته‌ها: نانوذره کیتوزان با اندازه ۲۷۳ نانومتر ساخته شد و میزان MIC و MBC بر روی دو باکتری فوق‌الذکر ۳/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. فیلم کیتوزان نیز ساخته شد که دارای ضخامت $4/2 \pm 69/43$ میکرومتر، میزان رطوبت در حدود ۱٪ و میزان حلالیت فیلم ۵۲٪ بود که سبب کاهش ۱۰۰٪ تعداد باکتری‌های بیماری‌زا در مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به قابلیت تجزیه‌پذیری کیتوزان، از آنجا که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان چه به صورت نانوذره‌ای و چه به صورت فیلمی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی مذکور به اثبات رسید، می‌توان پیشنهاد نمود که در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بسته‌بندی‌های ضد میکروبی مواد غذایی، فیلم کیتوزان، نانوذره، *Listeria*، *Staphylococcus aureus*، *monocytogenes*

مقدمه

تجزیه ناپذیری مواد مورد استفاده در بسته بندی های مواد غذایی یکی از بزرگ ترین مشکلات جامعه امروزی است. از این نظر استفاده از پلیمرهای زیستی در جهت حذف این مشکل قابل توجه می باشد (Clara et al., 2013; Leceta et al., 2011).

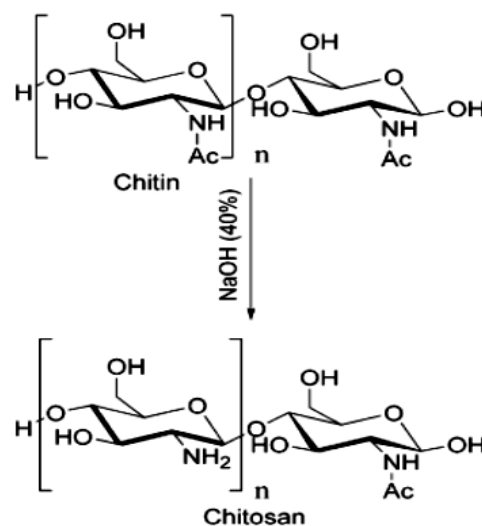
کیتوزان از این جهت بسیار حائز اهمیت می باشد. کیتوزان یک بیوپلیمر پلی ساکاریدی طبیعی آب دوست است که بوسیله داستیله شدن واحدهای آلکالین کیتین (ماده اصلی اسکلت خارجی سخت پوستانی همچون میگو، صدف و خرچنگ) بدست می آید (شکل ۱). همین طور مدارک اخیر نشان داده است که قارچ *آسپرژیلوس نایجر* به عنوان منبعی از کیتوزان است. این بیوپلیمر به صورت پلی کاتیونیک با ساختار و خصوصیات ویژه می باشد که بیش از ۵۰۰۰ واحد گلوکز آمین ساخته شده است. کیتوزان در بسیاری از حلال ها نامحلول است اما در حلال های آلی رقیق شده مثلا اسیداستیک، اسیدفرمیک، اسیدسوکسینیک، اسیدلاکتیک و اسیدمالیک محلول می باشد. این پلیمر ارزان، غیرسمی، دارای قابلیت تجزیه پذیری زیستی و سازگار با محیط زیست می باشد. به علت داشتن گروه های فعال آمینو به عنوان چلات کننده مفید می باشد (Dutta et al., 2009).

C-2 از واحدهای گلوکز آمین، پروتونه شده اند، با سطح آنیونی لیپوپلی ساکارید دیواره باکتری های گرم منفی و همین طور پپتیدوگلیکان آنیونی باکتری های گرم مثبت برهم کنش نشان می دهد. بنابراین دارای فعالیت ضد میکروبی می باشد (Mohammadpour Dounighi et al., 2012). کاهش pH و بالا رفتن درجه داستیله شدن این فعالیت را تشدید می نماید (Mellegard et al., 2011). از این جهت، از آن در جهت کنترل آلودگی های باکتریایی مواد غذایی (همچون لیستریا منوسایتوجنز و *استافیلوکوکوس اورئوس* که سبب بیماری های عفونی بسیاری می گردند) (Goy et al., 2009; Zivanovic et al., 2006; Ye, 2008). می توان در بسته بندی های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده کرد (Fernandez-Saiza et al., 2008; Rhim et al., 2006; Leceta et al., 2013). هدف از این پژوهش بررسی خاصیت ضد میکروبی کیتوزان به دو شکل نانوذره و فیلم بر علیه دو باکتری بیماری زا با منشا غذا می باشد تا در جهت بسته بندی های ضد میکروبی و زیست تجزیه پذیر مواد غذایی بتوان از آن استفاده نمود.

مواد و روش ها

باکتری *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 از کلکسیون باکتری ها و قارچ های سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و باکتری *Listeria monocytogenes* از انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. کیتوزان با درجه داستیله ۷۵٪ از شرکت سیگما، پنتاسدیم تری پلی فسفات، اسید استیک، محیط های کشت تریپتیک سوی آگار، تریپتیک سوی برات، مولر هینتون آگار و مولر هینتون برات از شرکت مرک تهیه گردید.

روش ساخت نانوذره کیتوزان: ۰/۵ گرم کیتوزان در ۱۰۰ میلی لیتر اسیداستیک ۱٪ حل کرده در محلول ۰/۲۵٪ تری پلی فسفات پنتاسدیم به نسبت ۳ به ۱ (به ترتیب محلول کیتوزان به محلول تری پلی فسفات پنتاسدیم) به خوبی حل گردید. سپس لیوفلیزه نموده و به بررسی اندازه نانوذره کیتوزان به وسیله دستگاه زتا سایزر پرداخته شد (Mohammadpour Dounighi et al., 2012).



شکل ۱- تشکیل کیتوزان از کیتین

درجه استیلاسیون و pH، میزان بار کیتوزان را تعیین می کند. در pH پایین عمده گروه های آمینو که در موقعیت

- بررسی اثر ضد میکروبی نانوذره کیتوزان بر روی باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا

برای این مورد به بررسی کمترین غلظت بازدارنده رشد و کمترین غلظت کشنده نانوذره کیتوزان بر علیه دو گونه از باکتری *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* پرداخته شد.

نانوذره کیتوزان را به مقدار $3/5 \mu\text{g/mL}$ در اسیداستیک ۰/۱٪ استریل حل نموده و جهت تعیین MIC از سری رقت ۱۰ تا ۱ در میکروتیتر پلیت با روش کدورت سنجی چشمی به طور مقایسه‌ای با کنترل مثبت بر روی ۰/۱ نیم مک فارلند (معادل 10^6 cfu/mL) باکتری‌های مذکور بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. همین‌طور یک لوپ کامل از هر چاهک را جهت بررسی MBC در محیط MHA کشت داده شد (Qi et al., 2004).

کنترل مثبت: حاوی محیط MHB و باکتری‌های مورد نظر و اسیداستیک ۰/۱٪

کنترل منفی: حاوی محلول نانوذره کیتوزان (حل شده در اسید استیک ۰/۱٪) و محیط MHB

- بررسی اثر ضد میکروبی فیلم کیتوزان بر روی دو گونه باکتری بیماری‌زا با منشأ غذا

برای بررسی اثر ضد میکروبی فیلم کیتوزان تهیه شده از دو روش کیفی و کمی استفاده شد.

روش کیفی: نمونه‌های فیلم کیتوزان ساخته شده را به وسیله یک قیچی استریل، در اندازه 1×1 سانتی‌متری برش داده و با استفاده از روش نفوذ ماده ضد میکروبی در محیط آگاردار این اثر اندازه‌گیری شد. بر این اساس از کشت شبانه باکتری‌های *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 و *Listeria monocytogenes* ۰/۵ مک فارلند تهیه نموده و روی محیط مولر هینتون آگار کشت چمنی داده و سپس فیلم مورد نظر را روی آن گذاشته شد. هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد.

روش کمی: برای این مورد باکتری‌های بیماری‌زاهای *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* PTCC 1431 در 30 mL لیتر تریپتیک سوی برات

روش ساخت فیلم کیتوزان: ۴ گرم پودر کیتوزان در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول اسیداستیک ۱٪ و ۱ گرم گلیسرول حل نموده (از گلیسرول به عنوان ماده بهبود دهنده برای شکل‌گیری و جلوگیری از شکنندگی فیلم استفاده گردید) و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول حاصل برای جداسازی مواد حل نشده با کاغذ صافی واتمن فیلتر گردید. سپس محلول مورد نظر را در یک ظرف چهارگوش شیشه‌ای پیرکس (۲۴ در ۳۰ سانتی متری) به آرامی ریخته شد. این فیلم در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز خشک و سپس از قالب شیشه‌ای خارج گردید (Rhim et al., 2006).

- اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم

اندازه‌گیری ضخامت فیلم: ضخامت فیلم‌های تولیدشده با استفاده از یک میکرومتر با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان رطوبت فیلم: پس از آن که فیلم‌ها به تعادل رطوبتی رسیدند، تکه‌های فیلم وزن شده و درون ظرفی گذاشته شد. سپس در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت حرارت داده شدند. سپس از روی میزان کاهش وزن نمونه‌ها نسبت به نمونه اولیه، درصد رطوبت تعیین شد.

اندازه‌گیری میزان حلالیت فیلم: پس از تعیین میزان رطوبت موجود در هر فیلم میزان مواد جامد موجود در آن قابل تعیین بود. با توجه به این مسأله، تکه‌های فیلم را پس از توزین، درون ۵۰ سی سی آب مقطر انداخته و به مدت ۶ ساعت عمل هم زدن آرام در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس مخلوط فیلم و آب بر روی یک کاغذ صافی، صاف شد. کاغذ صافی به همراه نمونه تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. درصد حلالیت فیلم‌ها در آب از رابطه زیر محاسبه گردید (حسینی و همکاران، ۱۳۸۷).

$100 \times (\text{وزن روکش خشک پس از غوطه‌وری} - \text{وزن ماده خشک اولیه موجود در روکش}) = \text{درصد حلالیت}$

وزن ماده خشک اولیه موجود در روکش

بررسی خاصیت ضد میکروبی نانوذره و فیلم کیتوزان

دارای اندازه ۲۷۳ نانومتر است. بر اساس مشاهدات نتایج MIC, MBC نانوذره کیتوزان برای هر دو باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا ۳/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد. فیلم کیتوزان حاصله رنگ زرد متمایل به سفید داشته (شکل ۳) و ضخامت فیلم در حدود $4/2 \pm 69/43$ میکرومتر، میزان رطوبت در حدود ۱٪ و میزان حلالیت فیلم ۵۲٪ بوده است.

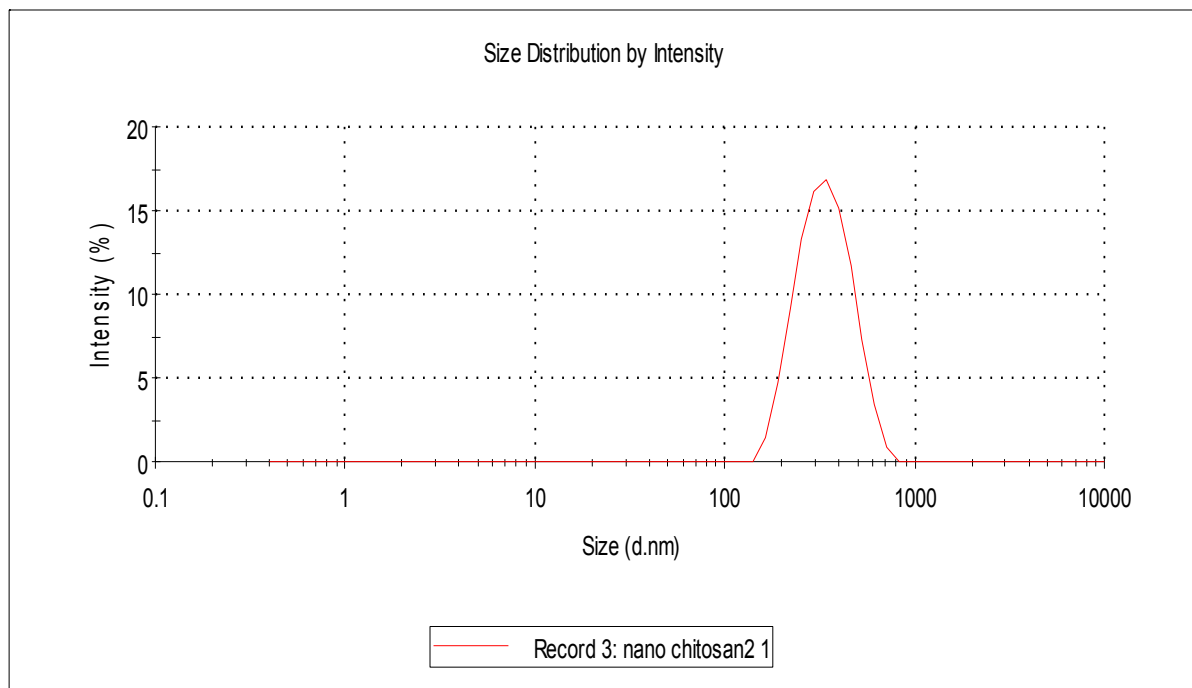
بررسی اثر ضد میکروبی فیلم کیتوزان (ابعاد 1×1 سانتی‌متری) به صورت کیفی نشان داد که روی باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذا اثر کشندگی داشته و هاله عدم رشد مشاهده گردید (شکل ۴).

در روش کمی منحنی رشد باکتری‌های ($0/01$ نیم مک فارلند) بیماری‌زا در حالت عادی و در حضور فیلم کیتوزان (ابعاد 10×10 سانتی‌متری) در محدوده زمانی ۲۴ ساعت در نمودارهای ۱ و ۲ نشان از اثر کشندگی فیلم کیتوزان در این دوره زمانی را می‌دهد.

در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور 7000 g سانتریفوژ نموده با سرم فیزیولوژی شستشو داده و دوباره با همان شرایط سانتریفوژ نموده و توده سلولی را در 100 میلی‌لیتر تریپتیک سوی برات حل نموده و به حجم 900 میلی‌لیتر با آب مقطر می‌رسانیم (محلول حاضر حاوی $10^6 \times 1/0 - 2/5$ cfu/ml). در هر ارلن به میزان 100 میلی‌لیتر از تلقیح مورد نظر به همراه یک فیلم کیتوزان در اندازه 10×10 سانتی‌متری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و هر ۲ ساعت از نمونه‌ها با رقت نمودن روی تریپتیک سوی اگر کشت داده شد (شاهد شامل ارلن‌های حاوی باکتری‌های بیماری‌زا اما بدون حضور فیلم کیتوزان می‌باشد) (Rhim et al., 2006).

یافته‌ها

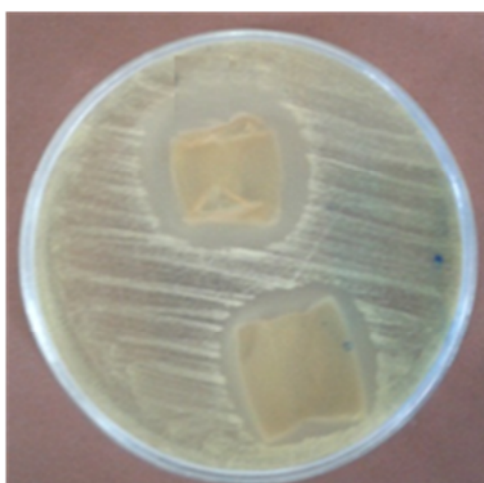
نانو ذره کیتوزان سنتز شده به صورت پودر سفید رنگ درآمده و بر طبق هیستوگرام توزیع اندازه نانوذره کیتوزان،



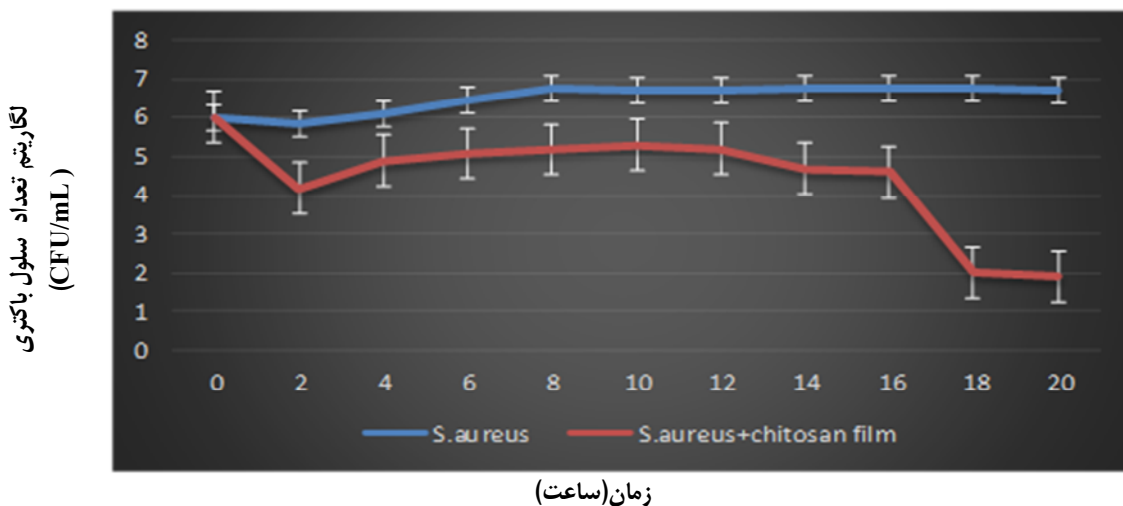
شکل ۲- هیستوگرام توزیع اندازه نانوذره کیتوزان $Z\text{-Average}(d\text{-nm}) = 273$



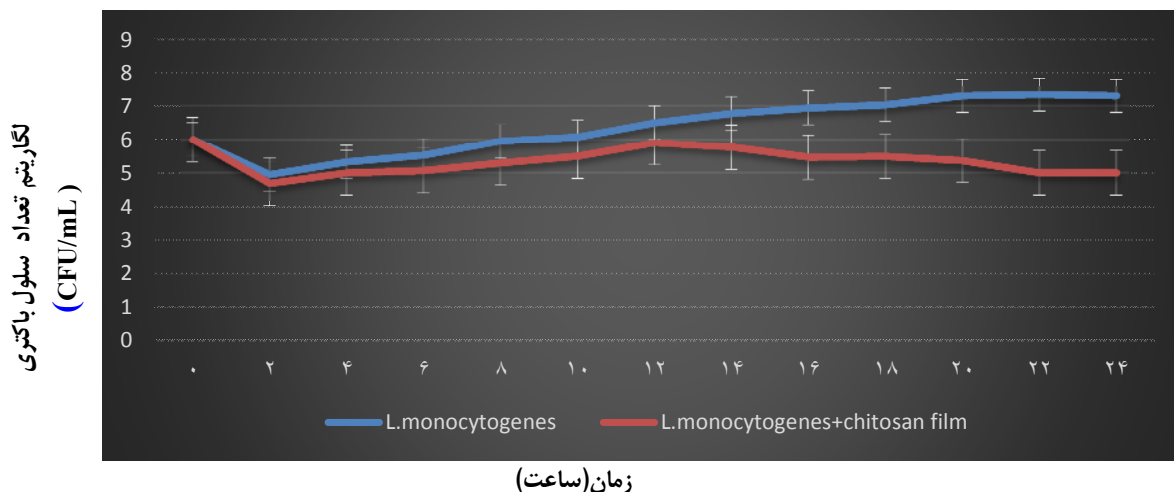
شکل ۳- فیلم کیتوزان ساخته شده



شکل ۴- هاله عدم رشد فیلم کیتوزان در ابعاد ۱ در ۱ سانتی متر بر علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1431 (نیم مک فارلند)



نمودار ۱- منحنی رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1431 (۱/۰+ / نیم مک فارلند) در حضور و عدم حضور فیلم کیتوزان (قطعه ۱۰×۱۰ سانتی متر) به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد



نمودار ۲- منحنی رشد باکتری لیستریا منوسایتوجنز (۱/۰ نیم مک فارلند) در حضور و عدم حضور فیلم کیتوزان (قطعه ۱۰×۱۰ سانتی متر) به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد

بحث

موادی که در صنایع غذایی بکار می‌روند همان طور که گفته شد باید تجزیه پذیر بوده و اثرات مخرب‌زایی بر روی ماده غذایی نداشته باشند. به همین علت کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر طبیعی در این زمینه انتخاب گردید (Leceta *et al.*, 2013). لیفنگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ نانوذرات کیتوزان با اندازه ۸۰ نانومتری ساختند و گزارش دادند که غلظت (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان غلظت MIC و MBC برای باکتری‌های بیماری‌زای مذبور محسوب شده است (Qi *et al.*, 2004). در پژوهش حاضرین غلظت ۳/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر برای باکتری‌های بیماری‌زا به دست آمد که یکی از دلایل اختلاف در این غلظت را می‌توان به تفاوت در اندازه نانوذرات حاصله دانست. اندازه نانوذرات اثر ضد میکروبی آن‌ها بسیار تأثیرگذار است و هرچه این اندازه کوچک‌تر باشد، اثر ضد میکروبی بیشتری از خود نشان می‌دهد (Clara *et al.*, 2011). به علاوه نوع باکتری نیز در حساسیت به نانوذرات موثر است. علت اختلاف در اندازه نانوذره کیتوزان را می‌توان به نوع کیتوزان مورد استفاده هم نسبت داد (Konga *et al.*, 2010).

فیلم کیتوزان ساخته شده نیز سبب کاهش ۱۰۰٪ تعداد باکتری‌های بیماری‌زا در مدت ۲۴ ساعت می‌گردد. درجه پلیمریزاسیون، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، نوع حلال و وزن مولکولی کیتوزان نیز از فاکتورهای موثر در این فعالیت می‌باشند که مطالعات تجربی نشان داده است افزایش وزن مولکولی سبب بالا رفتن فعالیت ضد میکروبی آن می‌گردد

(Elsabee & Abdou, 2013; Mellegard *et al.*, 2011). از سوی دیگر فیلم‌های کیتوزان نفوذپذیری کمی نسبت به اکسیژن و رطوبت دارند. بنابراین مانع بسیار خوبی برای گازها و بخار آب می‌باشند. کیتوزان در pH کمتر از ۶ پلی‌کاتیونیک است و با ترکیبات دارای بار منفی مثل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدهای آنیونی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدها واکنش نشان می‌دهد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۲)

امروزه از اسانس‌های گیاهی در فیلم‌های زیست تجزیه‌پذیر برای بهبود اثرات ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و بهبود خصوصیات نفوذپذیری فیلم استفاده می‌گردد. در پژوهشی که توسط مرادی و همکاران در سال ۱۳۸۹ قرار گرفت، نشان داد که فیلم کیتوزان حاوی آویشن شیرازی اثرات ضد میکروبی معنادار بیشتری بر علیه لیستریا منوسایتوجنز نسبت به فیلم کیتوزان بدون اسانس، دارد (مرادی و همکاران، ۱۳۸۹).

مکانیسم ضد میکروبی کیتوزان دقیقاً مشخص نیست. اما چندین پیشنهاد در این زمینه داده شده است و طبیعت ذاتی کیتوزان که پلی‌کاتیونیک است مهمترین پیشنهادی است که داده شده است (Benhabilesa *et al.*, 2012). تحقیقات اخیر نشان داده است که کیتوزان غشای خارجی باکتری‌ها را تخریب می‌کند. به طور کلی مکانیسم عمل ضد میکروبی کیتوزان شامل:

۱- تداخل طبیعت پلی‌کاتیونی کیتوزان با بار منفی

ماکرومولکول‌های سطح سلول‌ها

Clara, S., Donatella, D. & Sossio, C. (2011). Food packaging based on polymer nanomaterials. *Progress in Polymer Science*, 36 (12), 1766-1782.

Elsabee, M. & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering*, 33 (4), 1819-41.

Dutta, P. K., Shipra, T. & Mehrotra, G. K. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114 (4), 1173-1182.

Fernandez-Saiza, P., Lagarona, J. M., Hernandez, P. & Ocio, M. J. (2008). Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. *Food Microbiology*, 124 (1), 13-20.

Fernandez, P., Solera, C., Lagarona, J. M. & Ocio, M. J. (2010). Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *Food Microbiology*, 137 (2-3), 287-394.

Goy, R., Britto, D. & Assis, O. (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polimeros*, 19 (3), 241-247.

Konga, M., Chena, X., Xing, K. & Park, H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Food Microbiology*, 144 (1), 51-63.

Luis, E., Chávez, P., Resin, A. & Kenneth, A. (2011). Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(11), 3892-3895.

Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I. Dueñas, M. T. & Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Food Engineering*, 116 (1), 889-899.

Mohammadpour Dounighi, N., Eskandari, R., Avadi, M. R. Zolfagharian, H., Mir Mohammad Sadeghi, A. & Rezayat, M. (2012). Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing *Mesobuthus eupeus* scorpion venom as an antigen delivery system. *Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18 (1), 44-52.

Mellegard, H., Strandb, S. P., Christensen, B. E., Granuma, P. E. & Hadrda, S. P. (2011). Antibacterial activity of chemically defined chitosans: Influence of molecular weight,

۲- ورود پلیمر کیتوزان به سلول و جلوگیری از انتقال DNA به RNA می‌شود (Fernandez et al., 2010).

خاصیت ضد میکروبی نانوذرات کیتوزان در حذف بیوفیلم باکتری *Streptococcus mutans* نیز به اثبات رسیده است (Luis et al., 2011)، از این رو می‌توان پیشنهاد نمود که در حذف بیوفیلم‌های باکتریایی تشکیل شده در مواد غذایی که سبب فساد و ضربه‌های اقتصادی در این زمینه می‌شوند، از آن به توان استفاده نمود (Van Houdt & Michiels, 2010). از آنجا که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان چه به صورت نانوذره‌ای و چه به صورت فیلمی بر روی باکتری‌های بیماری‌زا با منشا غذای مذکور به اثبات رسید و با توجه به توانایی تجزیه پذیریزی کیتوزان، پیشنهاد می‌گردد در بسته‌بندی‌های ضد میکروبی مواد غذایی استفاده گردد.

منابع

حسینی، م.، رضوی، ه. و موسوی، ا. (۱۳۸۷). بررسی خواص فیزیکی، مکانیکی، ضد باکتریایی و ریزساختاری فیلم‌های خوراکی تولید شده از کیتوزان محتوی اسانس‌ها آویشن و دارچین. فصلنامه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، سال اول، شماره ۲، صفحات ۴۷-۶۶.

طاهری، ع.، سقیان، ا. و جلالی نژاد، س. (۱۳۹۲). اثر ضد میکروبی و ضد قارچی کیتوزان محلول در اسید و آب پوسته میگوی سفید هندی. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، سال سوم، شماره ۱، ۴۹-۵۵.

مرادی، م.، تاجیک، ه.، رضوی روحانی، م.، ملکی نژاد، ح. و ساعی دهکردی، س. (۱۳۸۹). ارزیابی خصوصیات آنتی اکسیدانی، رنگ و اثرات ضد باکتریایی فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن شیرازی علیه لیستریا منوسایتوجنز. مجله ارمان دانش، دوره ۱۵، شماره ۳، ۳۰۳-۳۱۵.

Ahmed, I. A. & Robinson, R. K. (1999). The ability of date extracts to support the production of aflatoxins. *Food Chemistry*, 66 (3), 307-312.

Benhabilesa, M. S., Salaha, R., Lounicia, H., Drouichea, N., Goosen, M. & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29 (1), 48-56.

degree of acetylation and test organism. Food Microbiology, 148 (1), 48-54.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C. & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. Carbohydrat Research, 339 (16), 693-2700.

Rhim, J. W., Hong, S. I. & Park, H. M. (2006). Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. Agricultural and Food Chemistry, 54 (16), 5814-22.

Van Houdt, R. & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a

focus on the bacterial outer surface. Applied and Environmental Microbiology, 109(4), 1117-1131.

Ye, M., Neetoo, H. & Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. Food Microbiology, 25 (2), 260-268.

Zivanovic, S., Chi, S. H. & Draughon, F. (2006). Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. Food Science, 70 (1), 45-51.