(مقاله پژوهشی)

خصوصیات فیزیکوشیمیایی،آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی یک نوع فیلم فعال بر پایه کیتوزان و اسانس‌باریجه

سید علیرضا سجادی[1]، حمید سرحدی[1*]، عبدالواحد صفرزائی[1]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بم، دانشگاه آزاد اسلامی، بم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۴/۰۸

چکیده

فیلم‌های فعال و پوشش‌های خوراکی به منظور محافظت، بهبود کیفیت و افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی استفاده می‌شوند. این مطالعه با هدف تولید یک نوع فیلم فعال بر پایه کیتوزان و غلظت‌های مختلف اسانس باریجه از ۱ تا ۲ درصد (وزنی/وزنی) و بررسی ترکیب شیمیایی، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختار مکانیکی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی فیلم‌های تولیدی بود. ترکیبات اصلی اسانس باریجه با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC/MS) به ترتیب بتا-پینن (۵۵/۵ درصد)، آلفا-پینن (۱۲/۳ درصد)، بولنزول (۸/۳ درصد)، گوایول (۶/۴ درصد) و میرسن (۲/۶ درصد) شناسایی گردیدند. افزودن اسانس به فیلم سبب افزایش ضخامت و زاویه تماس و کاهش محتوای رطوبت، حلالیت در آب و نفوذپذیری به بخار آب گردید. فیلم کیتوزان حاوی اسانس باریجه، مقاومت کم‌تری به شکست و انعطاف‌پذیری و کدورت بیشتری را نسبت به نمونه شاهد از خود نشان داد. اسانس سبب جذب نور در طول موج مرئی گردید و باعث افزایش پارامتر b^* و کاهش پارامترهای a^* و L^* شد. در بررسی فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های حاوی اسانس، *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان حساس‌ترین باکتری و *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان مقاومترین باکتری شناسایی گردید. فیلم حاوی اسانس ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی خوبی را نشان داد به طوری که با افزایش غلظت اسانس تا ۲ درصد، محتوای فنولی کل و فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: فیلم فعال، کیتوزان، اسانس باریجه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی.

[*]مسئول مکاتبات: sarhadi@iaubam.ac.ir

۱-مقدمه

در دهه‌های اخیر با وجود پیشرفت‌های نوین در صنعت مواد غذایی به منظور افزایش عمر انبارمانی محصولات غذایی، بیماری‌ها و فسادهای میکروبی ناشی از مواد غذایی جان بسیاری از انسان‌ها را با خطر مواجه نموده است که این امر یکی از عمده ترین نگرانی‌های تولیدکنندگان مواد غذایی در حوزه سلامت غذا می‌باشد(۱۱). یکی از راه‌های افزایش عمر انبارمانی محصولات غذایی استفاده از بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد که مانند حصاری در اطراف محصول از آلودگی آن توسط عوامل محیطی جلوگیری می‌نماید. از جمله پلیمرهای به‌کار رفته در ساختار بسته‌بندی‌های موادغذایی می توان به پلی‌اتیلن، پلی‌پروپیلن، پلی‌وینیل‌کلراید و غیره اشاره نمود که غیر قطبی بوده و از منابع نفتی غیر تجدید پذیر تولید می‌شوند. این ترکیبات غیر قابل تجزیه پس از کاربرد، منبع عمده ضایعات محسوب گردیده و مشکلات محیطی متعددی را با عنوان آلودگی سفید[1] ایجاد خواهند نمود(۱۷). از این‌رو، مشکلات زیست محیطی متعدد ایجاد شده توسط پلیمرهای سنتزی سبب شده است که صنعتگران امر غذا به استفاده از ترکیبات تجدیدپذیر زیستی روی آورند(۷، ۱۲). در میان بیوپلیمرهای تجزیه‌پذیر، کیتوزان جایگاه ویژه‌ای دارد زیرا یک کربوهیدرات کاتیونی اصلاح شده از طریق استیل‌زدایی کیتین می‌باشد. این پلیمر ترکیب اصلی اسکلت خارجی بندپایانی مانند خرچنگ، میگو و حشرات بوده و به دلیل وزن مولکولی بالا و قابلیت انحلال در محلول‌های اسیدی، خاصیت تشکیل ژل و فیلم را دارا می‌باشد. همچنین کیتوزان برخلاف بسیاری از پلیمرهای زیست تجزیه‌پذیر دیگر دارای خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی می‌باشد(۳). از این‌رو، استفاده از کیتوزان در قالب پوشش ماده غذایی در سال‌های اخیر مورد توجه صنعتگران امر بسته‌بندی مواد غذایی قرار گرفته است. با افزایش آگهی مصرف‌کنندگان مواد غذایی در ارتباط با عوارض سوء نگهدارنده‌های شیمیایی بر بدن و سلامت انسان، گرایش شدیدی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی ایجاد شده است. از جمله ترکیبات طبیعی به‌کار رفته در بسته‌بندی‌های فعال می‌توان به عصاره‌های گیاهی(۱۸)، اسانس‌ها(۲۳)، اسیدسیتریک(۲۴) و غیره اشاره نمود. در این بین، اسانس‌های استخراج شده از گیاهان به متابولیت‌های روغنی و آروماتیک استحصالی از گیاهان اطلاق می‌گردد که افزودن مستقیم آنها به مواد غذایی با محدودیت‌هایی مانند تغییر خاصیت ارگانولپتیک محصول و تجزیه اسانس در تماس با فرآیندهای تبخیر، اکسیداسیون و حرارت‌دهی روبرو می‌باشد. یک روش عمده برای غلبه بر این مشکل استفاده از بسته‌بندی‌های فعال می‌باشد(۳۲). اسانس باریجه از گیاهی از خانواده چتریان (*Umbelliferae*) استخراج می‌گردد. اسانس این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضد دیابت می‌باشد. خانواده چتریان دارای ۱۳۰ گونه بوده و بومی دریای مدیترانه و آسیای مرکزی می‌باشند. باریجه یک نام ایرانی معمول برای صمغ و لاتکس خشک شده این گیاه می‌باشد. اسانس باریجه در ایران به خاطر ویژگی‌های درمانی آن مانند درمان گاستروآنتریت، تهوع و یبوست معروف است و سرشار از ترکیبات فنولی مانند سابینن[2]، آلفا و بتا-پینن[3] می باشد(۱۲).

فیلم‌های بسته‌بندی زیست تجزیه‌پذیر دارای نگهدارنده‌های طبیعی مانند اسانس‌های‌گیاهی با کنترل انتقال رطوبت، اکسیژن، دی اکسید کربن، لیپید، آروما، طعم و افزودنی‌های غذایی از یک طرف و آزادکردن مواد فعال از طرف دیگر، می‌توانند راهکاری امیدبخش در راستای حفظ کیفیت و زمان ماندگاری فرآورده‌های غذایی تلقی گردند. از جمله این بسته‌بندی‌های فعال می‌توان به تولید فیلم فعال پلی لاکتیک اسید حاوی نانواکسید روی و دو اسانس آویشن‌شیرازی و نعناع توسط حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۹) اشاره نمود که حضور اسانس سبب بهبود خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی فیلم خوراکی گردیده بود به گونه‌ای که این

1- White Pollution

2- Sabinene

3- α-pinene and β-pinene

فیلم توانست زمان ماندگاری فیله ماهی را از ۷ روز به ۱۶ روز افزایش دهد. در مطالعه‌ای دیگر، حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۹) موفق شدند اسانس باریجه را در بستر پلیمر زئین بکار برند که این امر منجر به تولید پوششی با خواص ضددیابت، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مناسب گردیده بود(۱۱، ۱۲). از سویی دیگر، مرور پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که اسانس باریجه علی‌رغم اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب تاکنون در هیچ فیلم فعالی بکار نرفته است، از این‌رو در این پژوهش علاوه بر بررسی اثرات غلظت‌های مختلف اسانس باریجه بر خواص فیزیکوشیمیایی فیلم‌های بر پایه کیتوزان، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، مکانیکی و ضدمیکروبی فیلم‌های تولیدی نیز بررسی خواهند شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

کلیه محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده گرید آنالیتیکال بودند. معرف فولین سیوکالچو، اسید گالیک، کربنات سدیم بدون آب (Na_2CO_3)، متانول، کلرید کلسیم، نیترات کلسیم و محیط‌های کشت نوترینت آگار، مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از کمپانی مرک آلمان و ۲و۲-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، پلاستی‌سایر گلیسرول، توئین۸۰ و کیتوزان با وزن مولکولی ۱۱۰۰۰۰-۱۵۰۰۰۰ دالتون از کمپانی سیگما آلمان خریداری شده بودند. اسانس باریجه (بی رنگ یا مایل به زرد) از شرکت باریج اسانس کاشان (ایران) و سویه‌های میکروبی (انتخاب دو گونه گرم مثبت و دو گونه گرم منفی به منظور ارزیابی میزان مقاومت باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در برابر اثرات ضدمیکروبی اسانس) شامل *اشرشیاکلی* (ATCC 25922)، *باسیلوس سرئوس* (ATCC 11778)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) و *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 27853) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیده بودند.

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-تعیین ترکیب شیمیایی اسانس

به منظور تعیین ترکیب شیمیایی اسانس از دستگاه GC/MS (شرکت آب و فاضلاب مشهد، ایران) مجهز به ستون موئینه DB-5 ms EVDX (۶۰mm×۰/۳۲۰mm) و همچنین دتکتورTechnologies, Agilent) 5973 Hewlett- Packard (Wilmington, DE, USA استفاده گردید. برنامه‌ریزی حرارتی ستون به شرح زیر بود: گاز هلیوم (گاز حامل) با سرعت جریان ۱/۵میلی‌لیتر بر دقیقه، سرعت تزریق یک میکرولیتر و نسبت شکافت نمونه ۱ به ۲۰، دمای اولیه ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، اولین افزایش دما تا ۱۳۰ درجه سلسیوس با گرادیان دمایی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه، دومین افزایش دما تا ۲۷۰ درجه سلسیوس با گرادیان دمایی ۷ درجه سلسیوس بر دقیقه و دمای نهایی ۲۷۰ درجه سلسیوس به مدت۳ دقیقه تنظیم شد. در ادامه، ترکیبات شیمیایی اسانس از طریق مقایسه نسبت شاخص بازداری (RI[1]) این ترکیبات به n-آلکن‌ها (C_6-C_{24}) با ترکیبات معتبر تحت شرایطی مشابه شناسایی گردیدند(۱۲).

۲-۲-۲-تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC[2]) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC[3]) اسانس

محلول مادر ۱۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس با استفاده از دی متیل سولفوکساید ۵ درصد آماده گردید و با عبور از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵میکرون استریل شد.باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. سپس از باکتری‌های رشد یافته درون لوله‌های حاوی رینگر استریل اضافه شد تا کدروتی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلند ($۱/۵\times۱۰^۸$ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر) و با

1- Retention Index
2 - Minimum Inhibitory Concentration
3 - Minimum Bactericidal Concentration

جذبی معادل ۰/۱۳-۰/۰۸ در طول موج ۶۲۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر حاصل گردد. جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد از روش میکرودایلوشن[1] استفاده شد. در این روش در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه، نخست درون چاهک‌های ۱۲عددی هر ردیف، میزان ۹۵میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث استریل با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مادر ۱۵۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس به چاهک اول منتقل و غلظت ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس تهیه گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل و غلظت ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از اسانس تهیه شد. این ترتیب برای همه چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۲ که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، ادامه یافت. چاهک شماره ۱۱ به عنوان شاهد و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک شماره ۱۱ برداشته و دور ریخته شد. در ادامه ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند به هر یک از چاهک‌ها به جز چاهک شماره ۱۱ اضافه گردید سپس میکروپلیت به مدت ۷ ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک‌هادر طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد و پس از گذشت این زمان، میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها مجددا توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه گردید. کمترین غلظت اسانس که سبب ممانعت از رشد باکتری گردیده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس نیز با توجه به مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید به طوری که میزان ۵میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار تلقیح و به طور یکنواخت پخش گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پایین‌ترین غلظت اسانس که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نکرده (فاقد رشد باکتری) بودند به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شد(۱۴).

۲-۲-۳-تهیه فیلم فعال کیتوزان حاوی اسانس باریجه

برای دستیابی به فیلم کیتوزان با ویژگی‌های مطلوب، میزان کیتوزان (۲٪ وزنی/حجمی) و نرم‌کننده (گلیسرول) (۰/۴ وزنی/حجمی)طی‌آزمون‌های‌اولیه(شکل ظاهری و خصوصیات مکانیکی) مشخص گردیدند. سپس فیلم‌های کیتوزان حاوی سه غلظت از اسانس باریجه (۱، ۱/۵ و ۲ درصدوزنی/وزنی) با در نظر گرفتن میزان MIC اسانس تهیه شدند. برای تهیه فیلم مورد نظر از روش کاستینگ[2] استفاده شد(۱۱). در این روش پس از تهیه محلول مورد نظر، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از محلول به آرامی درون پلیت قرار گرفت و سپس در دمای محیطی به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. فیلم تولید شده پس از خشک شدن به آرامی از سطح پلیت جدا شد و تا زمان انجام آزمایشات، درون دسیکاتور نگهداری شد.

۲-۲-٤-اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی

۲-۲-٤-۱-ضخامت فیلم

ضخامت فیلم با استفاده از میکرومتر دیجیتال با دقت تفکیک ۰/۰۰۱ میلی‌متر و به صورت میانگین ۵ نقطه تصادفی اندازه‌گیری شد(۱۴).

۲-۲-٤-۲-رطوبت فیلم

پس از آن که فیلم‌ها به منظور تعادل رطوبتی در دسیکاتور قرار گرفتند، قطعات فیلم کیتوزان، توزین شده و درون کپسول‌هایی که از قبل به وزن ثابت رسانده شده بودند، قرار گرفتند. سپس کپسول‌های حاوی فیلم درآون با دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا به وزن ثابت برسند. در نهایت، درصد رطوبت از روی میزان کاهش وزن فیلم‌ها نسبت به نمونه اولیه (معادله ۱) تعیین شد(۲۰).

1- Microdilution

2 - Casting Method

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \times ۱۰۰$$

۲-۲-٤-۳-حلالیت فیلم

حلالیت فیلم‌خوراکی در آب به معنی مقدار درصد ماده خشک نمونه است که پس از ۲۴ ساعت غوطه‌ور نمودن در آب، به حالت محلول در می‌آید. به منظور اندازه‌گیری حلالیت فیلم‌های فعال، از روش تعیین اختلاف وزن خشک نمونه‌ها قبل و بعد از قرار گرفتن در داخل آب مقطر (معادله ۲) به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد(۲۰).

$$\text{درصد حلالیت در آب} = \frac{\text{وزن خشک نهایی} - \text{وزن خشک اولیه}}{\text{وزن خشک اولیه}} \times ۱۰۰$$

۲-۲-٤-٤-نفوذپذیری به بخار آب

نفوذپذیری به بخار آب بر اساس روش اصلاح شده شماره E96-95 مصوب ASTM انجام پذیرفت (۴). بدین منظور مقدار مشخصی از کلریدکلسیم بدون آب درون سل‌های شیشه‌ای ریخته شد و سطح سل‌های شیشه‌ای با استفاده از روکشی از پارافین مذاب پوشانده شد تا درون سل‌ها رطوبت نسبی ۰ درصد ایجاد شود. سپس سل‌ها درون دسیکاتور حاوی آب نمک اشباع قرار داده شدند.آب نمک اشباع در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۵ درصد و اختلاف رطوبت در دوطرف فیلم‌های فعال کیتوزان در دمای ۲۵ درجه سلسیوس،گرادیان فشار بخاری معادل ۵۵/۱۷۵۳ پاسکال ایجاد می‌نماید. در نهایت مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها، از روی افزایش وزن سل‌های شیشه‌ای حاوی درپوش یا از جنس فیلم تعیین شد (۲۰).

۲-۲-٤-۵-آبگریزی فیلم

آبگریزی فیلم‌ها با استفاده از اندازه‌گیری زاویه تماس بررسی شد. یک قطره آب مقطر تقریبا معادل با ۱ میکرولیتر بر روی سطح نمونه‌ها (۶۰mm× ۴۰mm) قرار گرفت و سپس از زاویه تماس ایجاد شده بین قطره با سطح فیلم عکس گرفته شد. در ادامه زاویه تماس قطره با سطح فیلم‌های فعال کیتوزان از نرم افزار Image J اندازه‌گیری شد. آزمایشات در سه تکرار انجام شد(۱۴).

۲-۲-۵-رنگ‌سنجی

به منظور بررسی خصوصیات رنگی فیلم‌های فعال کیتوزان از رنگ‌سنج Minolta ساخت شرکت Minolta Camera Osaka استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری رنگ فیلم‌های فعال، دستگاه رنگ‌سنج توسط صفحه سفید استاندارد تنظیم و پارامترهای استاندارد مرتبط با دستگاه به شکل L*، a* و b* تعیین‌شدند. پارامترهای اندازه‌گیری شده توسط دستگاه رنگ-سنج شامل درخشندگی یا L* (سفید تا سیاه)، a* (سبز تا قرمز) و b* (آبی تا زرد) بودند.آزمایشات در سه تکرار انجام شد(۳۰). به منظور بررسی کدورت فیلم‌ها، نمونه‌ها به صورت قطعات مستطیلی شکل بریده شدند و مستقیما داخل سل اسپکتروفوتومتر قرار داده شدند. مقدار کدورت پس از خواندن جذب در طول موج۶۰۰ نانومتر و تقسیم آن بر ضخامت نمونه‌ها بر حسب میلی‌متر گزارش شد.

۲-۲-٦-خصوصیات مکانیکی فیلم

خصوصیات‌مکانیکی فیلم‌ها با استفاده از دستگاه Universal Testing Machine (فاصله اولیه بین دو فک دستگاه ۴۰ میلی‌متر و سرعت حرکت فک بالایی۵۰ میلی‌متر بر دقیقه) اندازه‌گیری شد. در ابتدا نمونه (۶cm×۱cm) به منظور مشروط‌سازی درون دسیکاتور حاوی نیترات‌کلسیم با دمای ۲۱ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. در نهایت خصوصیات مکانیکی نمونه‌ها (مقاومت کششی[1]و افزایش طول تا نقطه شکست[2]) بر اساس دستورالعمل روش استاندارد ASTM-D882-02 محاسبه شد(۵).

1- Tensile Strength
2- Elongation at Break

۲-۲-۷-تعیین فعالیت ضدمیکروبی

به منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها بر باکتری‌های پاتوژن *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* از روش انتشار آگار[1] استفاده شد. بدین منظور، نخست فیلم‌ها به صورت دیسک‌های ۶میلی‌متری بریده شدند و سپس درون پلیت‌های میکروبی حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار که از قبل با ۱۰۰ میکرولیتر کشت مایع شبانه تقریبا معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر از باکتری‌های مذکور کشت سطحی داده‌شده بودند، قرار گرفتند. در نهایت مساحت منطقه بازدارندگی بر حسب میلی‌متر مربع محاسبه شد(۱۲).

۲-۲-۸-ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فیلم

محتوای فنولی کل[2] فیلم‌ها توسط رنگ‌سنجی به روش فولین سیوکالچو[3] اندازه گیری شد(۱۲). نخست ۲۰میلی‌گرم از نمونه در ۱۰میلی‌لیتر آب‌مقطر قرار گرفت و سپس ۰/۱ میلی‌لیتراز محلول به دست آمده با ۷ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچو مخلوط شد. محلول حاصله به مدت ۸دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد و ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد تا حجم نهایی محلول به۱۰ میلی‌لیتر رسانده شود. محلول به‌دست آمده در تاریکی کامل و در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت نگهداری شد. سپس جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسیدگالیک در غلظت‌های مختلف رسم گردید. در نهایت مقدار ترکیبات فنولی کل از روی معادله خط رسم شده بر مبنای اسید گالیک (معادله ۳) و به صورت میلی‌گرم در گرم فیلم ازطریق معادله ۴ محاسبه گردید:

معادله(۳) $y = 0.0659x + 0.0117$

معادله(۴) $T = \frac{CV}{M}$

که در این معادله T: محتوای کل ترکیبات فنولی، C: غلظت اسید گالیک بدست آمده از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، V: حجم عصاره فیلم (میلی‌لیتر) و M: وزن فیلم خشک (گرم) می‌باشد. به منظور بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH استفاده شد(۲۰). برای انجام این آزمون، نمونه در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و محلول حاصله در غلظت‌های متفاوت (۴۰۰۰-۲۰۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) آماده گردید. سپس محلول رقیق شده با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی‌مولار DPPH مخلوط گردید و در دمای محیط به مدت ۶۰ دقیقه نگهداری شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها طبق معادله زیر محاسبه شد:

معادله ۵

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = \left(\text{AbsDPPH} - \frac{\text{Abs extract}}{\text{AbsDPPH}}\right) \times 100$$

که در این معادله: Abs_{DPPH}: مقدار جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر برای محلول متانولی DPPH و $Abs_{extract}$: مقدار جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر برای عصاره فیلم می‌باشد.

۲-۲-۹-روش آماری

در بخش‌های مختلف تحقیق تمامی آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار آماری SPSS درقالب طرح کاملا تصادفی انجام پذیرفت. میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- تعیین ترکیب شیمیایی اسانس باریجه با استفاده از دستگاه GC/MS

تعیین ترکیب‌شیمیایی‌اسانس‌باریجه‌به‌منظور بررسی خصوصیات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا بخش زیادی از فعالیت ضدمیکروبی و

1- Agar Diffusion Method
2 - Total Phenolic Content (TPC)
3- Folin Ciocalteu

آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی به ترکیبات شیمیایی موجود در آن بر می‌گردد(۱۵). در این بررسی حدود ۱۴ترکیب عمده اسانس باریجه با استفاده از دستگاه GC/MS شناسایی گردید که در جدول شماره ۱ به آنها اشاره شده است. بتا-پینن (۵۵/۵ درصد)، آلفا-پینن (۱۲/۳ درصد)، بولنزول[1] (۸/۳ درصد) و گوایول[2](۶/۴ درصد) مهم‌ترین ترکیبات اسانس باریجه بودند. تحقیقات مشابه نشان داد که بتا-پینن و آلفا-پینن ترکیبات اصلی‌اسانس باریجه هستند(۲۲). ترکیبات شیمیایی اسانس باریجه در این بررسی از لحاظ کمی و کیفی با سایر مطالعات تفاوت‌هایی داشتند که این تفاوت‌ها مربوط به تفاوت در گونه‌های گیاهی، اکوتیپ‌وشرایط‌جغرافیایی‌رشد گیاه می‌باشد. افزودن مستقیم اسانس باریجه تحت عنوان نگهدارنده به محصولات غذایی با محدودیت‌های عمده‌ای از قبیل تغییر در ویژگی‌های ارگانولپتیک ماده غذایی، ایجاد بو و مسمومیت شدید، تبخیر، غیرفعال شدن اسانس توسط ترکیبات ماده غذایی و یا مهاجرت اسانس از سطح ماده غذایی به درون آن همراه است(۲۷). از این‌رو، یک روش عمده به منظور غلبه بر این مشکلات، افزودن اسانس باریجه به پلیمربسته‌بندی مانند کیتوزان می‌باشد.

۳-۲-تعیین MIC و MBC اسانس باریجه

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی(MBC) اسانس باریجه بر روی چهار باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس*، *اشریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* در جدول شماره ۲ گزارش شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *استافیلوکوس اورئوس* حساسترین و *سودوموناس آئروژینوزا* مقاومترین باکتری نسبت به تاثیرات ضد باکتریایی اسانس باریجه بودند. به عبارتی دیگر، باکتری‌های گرم منفی حساسیت کمتری را نسبت به اسانس باریجه نشان دادند. این امر به دلیل وجود دیواره اضافی در باکتری‌های گرم منفی است که در برابر ترکیبات ضدمیکروبی مقاومت بیشتری ایجاد می‌نماید(۱۴). در تحقیقی مشابه، حیدری مجد و همکاران (۲۰۱۹) ضمن بررسی نانوالیاف زئین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس باریجه دریافتند که باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری را به اسانس باریجه نشان داده‌اند. خاصیت ضد باکتریایی اسانس باریجه به دلیل حضور ترکیبات فعالی مانند آلفا و بتا-پینن در ساختار اسانس باریجه می‌باشد(۱۲).

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس باریجه

تعداد	ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)	میزان (درصد)
۱	α-Pinene	۹/٦۹٤	۱۲/۳
۲	β-Pinene	۱۲/٤۳۳	٥٥/٥
۳	Myrcene	۱۳/٦۹۲	۲/٦۰
٤	Carene	۱٤/٤۹۷	۱/٤۰
٥	r(+)-Limonen	۱٥/۹۷۷	۳/۷
٦	*trans*-β-Ocimene	۱۸/۱۱	۰/٥
۷	γ-Terpinen	۲٤/۷۲٦	۰/۹٥
۸	α-Terpinolene	۲۷/۸	۱/۱۰
۹	α-Terpineol acetate	۲۸/۷۸	۰/۸٥
۱۰	Guaiol	۳۰/۱۰٦	٦/٤
۱۱	Bulnesol	۳۰/۸۷٥	۸/۳
۱۲	myrtenal	۳۲/۸۱٦	۱/٤
۱۳	Cpaene	۳۳/٥۸٦	۱/۱
۱٤	Linalyl butyrate	۳۹/۲۳۳	۰/۹

1 - Bulnesol
2 - Guaiol

جدول ۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس باریجه بر روی باکتری‌های بیماری‌زا

میکروارگانیسم	MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MIC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
استافیلوکوکوس اورئوس	۰/۲۹	۰/۱۵
اشریشیاکلی	۱/۱۷	۰/۵۸
باسیلوس سرئوس	۰/۵۸	۰/۲۹
سودوموناس آئروژینوزا	٤/٦٨	۱/۱۷

۳-۳-ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فیلم‌های فعال کیتوزان

اثر افزودن غلظت‌های مختلف اسانس باریجه بر ضخامت فیلم کیتوزان در جدول شماره ۳ آورده شده است. افزودن اسانس به فیلم خالص کیتوزان سبب افزایش ضخامت فیلم گردید که گستره آن بین ۰/۰۸۱ تا ۰/۰۹۳ میلی‌متر می‌باشد. افزایش در ضخامت فقط در غلظت ۱/۵ و ۲ درصد اسانس باریجه ($P<۰/۰۵$) معنی‌دار بود. در مطالعاتی مشابه، قادری قهفرخی و همکاران (۲۰۱۷) و عبداللهی و همکاران (۲۰۱۲)، افزایش ضخامت فیلم خالص کیتوزان را بر اثر افزایش هر یک از اسانس‌های‌دارچین و رزماری گزارش کردند (۱، ۱۰). افزودن اسانس احتمالا به دلیل ایجاد بافت اسفنجی در ساختار فیلم سبب افزایش ضخامت فیلم می‌گردد. همچنین علت افزایش ضخامت فیلم می‌تواند به علت محبوس‌شدن قطرات ریز اسانس در ساختار فیلم کیتوزان باشد که منجر به تولید فیلمی نرم با ساختار اسفنجی می‌شود(۲). تاثیر افزودن غلظت‌های مختلف اسانس بر محتوای رطوبت فیلم خالص کیتوزان در جدول شماره ۳ آورده شده است. فیلم خالص کیتوزان دارای محتوای رطوبت ۲۱ درصد و تقریبا مشابه با محتوای رطوبت (۲۰/۸۰ درصد) فیلم خالص کیتوزان تولید شده توسط اجاق و همکاران (۲۰۱۰) است(۲۰). نتایج نشان داد که افزودن غلظت‌های مختلف اسانس باریجه سبب کاهش معنی‌دار در میزان رطوبت فیلم کیتوزان می‌شود. افزودن اسانس سبب ایجاد باندهای کوالانسی میان گروه‌های عملکردی کیتوزان می‌گردد و در نتیجه این امر سبب کاهش موجودیت گروه‌های هیدروکسیل و آمین در سطح پلیمر می‌شود. این کاهش موجودیت سبب کاهش برهم‌کنش‌های آب و پلی‌ساکارید کیتوزان از طریق باندهای هیدروژنی شده و در نتیجه میزان رطوبت فیلم کیتوزان کاهش می‌یابد(۲۱). میزان حلالیت فیلم‌های کیتوزان در جدول شماره ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که فیلم خالص کیتوزان دارای حلالیت کمی (۱۸/۴۷ درصد) در آب است. این میزان حلالیت برای فیلم خالص کیتوزان مشابه با میزان حلالیت کم‌فیلم کیتوزان (۱۷/۹ درصد) گزارش شده در مطالعه عبداللهی و همکاران (۲۰۱۲) بود(۱). افزودن اسانس باریجه سبب کاهش معنی‌دار حلالیت گردید به گونه‌ای که در اثر افزودن ۱/۵ و ۲ درصد اسانس باریجه میزان حلالیت به ترتیب تا ۱۲و۱۰ درصد کاهش یافت (جدول شماره ۳). کاهش حلالیت در پی افزودن اسانس می‌تواند به دلیل تشکیل پیوندهای عرضی میان اسانس باریجه و گروه‌های آمیدی و استری کیتوزان باشد که در پی آن گرایش فیلم تولیدی به آب‌کاهش یافته و در نهایت میزان حلالیت نهایی فیلم کاهش می‌یابد. نتایج مشابه توسط عاطف و همکاران (۲۰۱۵) در اثر افزودن اسانس مرزه به فیلم آگار و همچنین عبداللهی و همکاران (۲۰۱۲) در اثر افزودن اسانس رزماری به فیلم فعال کیتوزان/نانورس مشاهده شد(۱، ۶). رطوبت یکی از فاکتورهای موثر در واکنش‌های تخریب مواد غذایی و ترکیبات موثر در رشد میکروبی می‌باشد لذا در طراحی یک

فیلم خوراکی بایستی توجه نمود تا نرخ انتقال بخار آب کم باشد تا از طریق کنترل محتوای رطوبت بتوان میزان عمر ماندگاری محصول دربرگیرنده آن را افزایش داد(۲۸). میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های فعال کیتوزان در جدول شماره ۳ آورده شده است. میزان نفوذپذیری به بخار آب برای فیلم کیتوزان خالص بدست آمده در این تحقیق ($۱۰^{-۱۰}$(g $m/Pa\ s\ m^2$) ۰/۸۱) بود که این مقدار، قابل مقایسه با مقدار نفوذپذیری به بخار آب بدست آمده برای کیتوزان خالص ($۱۰^{-۱۰}$ ۰/۷۱ ($m/Pa\ s\ m^2 g$)) در مطالعه عبداللهی و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد(۱). از آن جایی که میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم خالص کیتوزان قابل مقایسه با بسیاری از پلاستیک‌های بسته‌بندی رایج نیست از این‌رو، یک راه حل برای برطرف‌کردن این مشکل استفاده از ترکیبات آبگریز مانند اسانس‌های گیاهی در ساختار فیلم می‌باشد. افزودن غلظت‌های مختلف اسانس باریجه سبب کاهش نفوذپذیری به بخارآب فیلم‌کیتوزان تا مقدار ($۱۰^{-۱۰}$(۰/۳۴ ($g\ m/Pa\ s\ m^2$) گردید. ماهیت آبگریز اسانس بر ماهیت آبدوستی و آبگریزی فیلم‌کیتوزان اثرگذاشته و سبب می‌شود تمایل فیلم کیتوزان به آب، کاهش یافته و در پی آن نفوذپذیری به بخار آب کاهش یابد(۱). نتایج مشابه توسط سالارباشی و همکاران (۲۰۱۳) برای فیلم پلی‌ساکارید محلول سویا بر اثر افزودن اسانس‌های آویشن شیرازی و پونه‌کوهی و همچنین توسط شجاعی علی‌آبادی و همکاران (۲۰۱۳) برای فیلم‌کاراگینان بر اثر افزودن اسانس مرزه مشاهده شد(۲۶، ۳۱). زاویه تماس نشان دهنده میزان آبدوستی سطح و میزان گروه‌های آبدوست در سطح می‌باشد. وجود گروه‌های آب دوست سبب موجودیت آب و کاهش آبگریزی سطح می‌گردد. به طور معمول، زاویه بالای ۶۵ درجه نشان دهنده آبگریزی سطح می‌باشد. جدول شماره ۳، میزان زاویه تماس فیلم‌های فعال کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس باریجه بر اثر چکاندن آب به عنوان یک حلال قطبی بلافاصله بعد از چکاندن را نشان می‌دهد. زاویه تماس (۵۱ درجه) به‌دست آمده برای فیلم خالص کیتوزان نشان دهنده آبدوست بودن سطح می‌باشد و این مقدار قابل مقایسه با مقادیر زاویه تماس (۵۳ درجه) بدست آمده برای فیلم‌خالص کیتوزان در مطالعه مرادی و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد(۱۹). ظرفیت بالای رطوبت‌پذیری فیلم خالص کیتوان را می‌توان به ظرفیت جذب آب زیاد گلیسرول (پلاستی‌سایزر) و همچنین گروه‌های عملکردی کیتوزان نسبت داد که این امر منجر به رطوبت‌پذیری سطح می‌گردد. افزودن اسانس باریجه در غلظت‌های مختلف سبب افزایش معنی‌دار در آبگریزی سطح گردید. علت افزایش آبگریزی سطح می‌تواند به دلیل ماهیت آبگریز اسانس باریجه باشد(۲۰). نتایج مشابه برای فیلم کیتوزان (۲۰) و فیلم پلی‌ساکارید محلول سویا (۲۶) با افزودن اسانس گزارش شد.

جدول ۳- خواص فیزیکوشیمیایی فیلم‌های کیتوزان و ترکیب کیتوزان با اسانس باریجه

فیلم	ضخامت (میلی‌متر)	محتوای رطوبت (درصد)	حلالیت در آب (درصد)	نفوذپذیری به بخار آب ($۱۰^{-۱۰}$ ($g\ m/Pa\ s\ m^2$))	زاویه تماس (درجه)
شاهد	۰/۰۸۱±۰/۰۰۲^{a}	۲۱/۰۵±۱/۲۰^{b}	۱۸/۴۷±۰/۶۷^{a}	۰/۸۱±۰/۰۲^{a}	۵۱/۰±۲/۶۰^{a}
کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس باریجه	۰/۰۸۴±۰/۰۰۱^{a}	۱۹/۳۰±۰/۹۱^{b}	۱۵/۴۰±۰/۵۵^{b}	۰/۶۵±۰/۰۳^{b}	۶۵/۰±۰/۵۰^{b}
کیتوزان حاوی ۱/۵ درصد اسانس باریجه	۰/۰۸۹±۰/۰۰۱^{b}	۱۶/۲۵±۰/۸۷^{a}	۱۲/۴۰±۰/۵۵^{c}	۰/۴۵±۰/۰۴^{c}	۷۳/۰±۳/۵۰^{c}
کیتوزان حاوی ۲ درصد اسانس باریجه	۰/۰۹۳±۰/۰۰۱^{b}	۱۳/۹۰±۰/۶۵^{a}	۱۰/۱۳±۰/۳۲^{d}	۰/۳۴±۰/۰۴^{c}	۸۴/۰±۱/۹۰^{d}

*داده‌ها میانگین ۳ تکرار می‌باشند. حروف متفاوت در یک ستون حاکی از تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین میانگین‌ها می‌باشند.

۳-٤-رنگ‌سنجی

اثرات افزودن اسانس باریجه بر پارامترهای رنگی (L*، a* و b*) در جدول شماره ۴ گزارش شده است. کیتوزان خالص نسبت به سایر فیلم‌های حاوی اسانس از شفافیت بیشتری (L* بیشتر) برخوردار بود. افزایش غلظت اسانس باریجه تا میزان ۲ درصد سبب کاهش شفافیت از ۸۴/۸۶ به ۷۸/۵۳ گردید. پارامتر a* نیز از ۱/۷۲- تا ۵/۷۳- کاهش یافت اما پارامتر b* از ۶/۵۰ تا ۲۴/۴۶ افزایش یافت. پس از افزودن اسانس به فیلم خالص کیتوزان میزان زردی در فیلم‌های فعال تولیدی افزایش یافت که این امر می‌تواند دلیل اصلی برای کاهش مقادیر L* و a* و همچنین افزایش در مقادیر b* باشد. دلیل نتایج مذکور را می‌توان به ترکیبات فنولی موجود در اسانس باریجه (مانندآلفا و بتا-پینن) نسبت داد که این ترکیبات توانایی جذب نور در طول موج‌های پایین را دارا می‌باشند(۳۰). نتایج این تحقیق مشابه با نتایج جوکی و همکاران[1](۲۰۱۵) می‌باشد که در آن مطالعه، اسانس پونه کوهی اثرات مشابه بر خواص رنگی فیلم خوراکی موسیلاژ دانه به گذاشت(۱۵). میزان کدورت فیلم‌های فعال کیتوزان حاوی غلظت‌های مختلف اسانس باریجه در جدول شماره ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد که افزودن اسانس باریجه به فیلم‌کیتوزان سبب افزایش کدورت (کاهش‌شفافیت) گردید. بیشترین میزان کدورت (۸۴) در فیلم فعال حاوی ۲ درصد اسانس باریجه مشاهده شد. افزایش کدورت در اثر افزودن اسانس به دلیل پراکنش نور ایجاد شده توسط گلبول‌های چربی موجود در اسانس باریجه (با میزان اندیس رفراکت متفاوت نسبت به فار پیوسته) و از سوی دیگر مرتبط با ویژگی‌های امولسیون تولیدی (حجم بخش و غلظت فاز چربی) می‌باشد. نتایج این تحقیق مشابه با پژوهش شجاعی علی آبادی و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد که در آن، غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبب افزایش میزان کدورت فیلم کاپا-کاراگینان شد(۳۱).

جدول ٤-نتایج آزمون رنگ‌سنجی و کدورت فیلم‌های کیتوزان و ترکیب کیتوزان با اسانس باریجه

فیلم	L*	a*	b*	کدورت
شاهد	۸٤/۸٦±۰/۰۰۲[a]	-۱/۷۲±۰/۲٤[a]	٦/۵۰±۰/۵٦[d]	۵۲/۰±۱/٦۰[d]
کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس باریجه	۸۳/۱۰±۰/۰۰۱[b]	-۳/٤۵±۰/۳٤[b]	۱۱/۹۰±۰/۷۵[c]	٦۳/۰±۰/٤۰[c]
کیتوزان حاوی ۱/۵ درصد اسانس باریجه	۸۰/۷۰±۰/۰۰۱[c]	-۵/۳۰±۰/۲۰[c]	۱۹/٤۳±۱/٤٦[b]	۷۰/۰±۲/۵۰[b]
کیتوزان حاوی ۲ درصد اسانس باریجه	۷۸/۵۳±۰/۰۰۱[d]	-۵/۷۳±۰/۲۰[c]	۲٤/٤٦±۰/۵٦[a]	۸٤/۰±۱/۸۰[a]

*داده‌ها میانگین ۳ تکرار می‌باشند. حروف متفاوت در یک ستون حاکی از تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین میانگین‌ها می‌باشند.

1 - Jouki and et al

۳-۵-خصوصیات مکانیکی

نتایج آزمون مکانیکی (مقاومت کششی و درصد کرنش) فیلم‌های فعال کیتوزان در جدول شماره ۵ گزارش شده است. کیتوزان خالص دارای مقاومت کششی ۲۲/۳۱ مگاپاسکال می‌باشد. این میزان بدست آمده برای کیتوزان خالص مشابه با مقدار مقاومت کششی کیتوزان (۲۴ مگاپاسکال) در مطالعه مرادی و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد(۱۹). مقاومت کششی با افزودن اسانس باریجه کاهش یافت به گونه‌ای که کمترین میزان مقاومت کششی (۱۳/۵مگاپاسکال) در فیلم حاوی ۲ درصد اسانس باریجه مشاهده شد. این نتایج مشابه با نتایج شن و کام‌دم[1](۲۰۱۵) برای فیلم کیتوزان می‌باشد. جایگزینی جزئی پیوندهای قوی پلیمر-پلیمر با پیوندهای ضعیف پلیمر-روغن در حضور اسانس و کاهش پیوستگی فیلم دلیلی برای کاهش مقاومت کششی فیلم می‌باشد(۳۰). از سوی دیگر با افزایش مقادیر اسانس باریجه از ۱ تا ۲ درصد، مقادیر کرنش از ۳۲/۹۳ تا ۳۹/۷۶ درصد افزایش یافت. اثرات پلاستی‌سایزری اسانس سبب افزایش درصد کرنش شد. نتایج مشابه در اثر افزودن اسانس پونه‌کوهی به فیلم کیتوزان و ژلاتین در مطالعه حسینی و همکاران (۲۰۱۵) حاصل گردید(۱۳).

جدول ۵- بررسی خصوصیات مکانیکی فیلم‌های فعال کیتوزان حاوی اسانس باریجه

فیلم	مقاومت کششی (مگاپاسکال)	افزایش طول تا نقطه شکست (درصد)
شاهد	۲۲/۳۱±۰/۲۶^{a}	۳۰/۵۰±۰/۷۰^{c}
کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس باریجه	۲۰/۹۰±۰/۹۵^{a}	۳۲/۹۳±۱/۳۵^{c}
کیتوزان حاوی ۱/۵ درصد اسانس باریجه	۱۷/۳۳±۰/۵۸^{b}	۳۶/۷۰±۰/۶۲^{b}
کیتوزان حاوی ۲ درصد اسانس باریجه	۱۳/۵۰±۰/۵۰^{c}	۳۹/۷۶±۱/۰۷^{a}

*داده‌ها میانگین ۳ تکرار می‌باشند. حروف متفاوت در یک ستون حاکی از تفاوت معنی‌دار ($P<0/05$) بین میانگین‌ها می‌باشند.

1 - Shen and Kamdem

۳-٦-فعالیت ضدمیکروبی فیلم

نتایج‌آزمون ضدمیکروبی فیلم فعال کیتوزان حاوی اسانس باریجه در برابر چهار باکتری بیماری‌زا (*اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا*) در جدول شماره ۶ آورده شده است. بررسی منابع نشان می‌دهد که کیتوزان دارای خاصیت ضدمیکروبی است و این خاصیت وابسته به وزن مولکولی، درجه استیلاسیون، دما، pH و شرایط تشکیل فیلم کیتوزان می‌باشد. به عنوان مثال، کیتوزان با وزن مولکولی پایین و درجه استیلاسیون زیاد از فعالیت ضدمیکروبی بالایی برخوردار است که دلیل این امر به خاطر حلالیت زیاد و چگالی زیاد بار مثبت کیتوزان می‌باشد که این امر نقش مثبتی در تخریب غشای سلولی باکتری‌های پاتوژن دارد. فیلم خالص‌کیتوزان در این پژوهش از خود خاصیت ضدمیکروبی نشان نداد که این ممکن است ناشی از شرایط تولید فیلم‌کیتوزان و درجه استیلاسیون کم کیتوزان بکاررفته در این مطالعه باشد. در برخی مطالعات مشابه نیز فیلم کیتوزان خالص از خود فعالیت ضدمیکروبی نشان نداده است(۲۰). هنگامی که یک ترکیب ضدمیکروبی مانند اسانس به ساختار فیلم اضافه می‌شود این ترکیب از طریق ژل آگار نفوذ نموده و منجر به تشکیل یک هاله مشخص در اطراف دیسک‌های ساخته شده از فیلم در محیط کشت می‌گردد. فیلم کیتوزان حاوی ۱درصد اسانس باریجه بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* اثر ضدباکتری نشان نداد. با این وجود با افزایش غلظت اسانس باریجه تا ۲ درصد، فعالیت ضدمیکروبی معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بر روی همه میکروب‌های مورد مطالعه در این پژوهش مشاهده شد. بیشترین فعالیت بازدارندگی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* با منطقه بازدارندگی‌تقریبی ۴۴۰ میلی‌متر مربع مشاهده گردید. *باسیلوس سرئوس* بیشترین منطقه بازدارندگی را با مقدار تقریبی ۴۰۱ میلی‌متر مربع بعد از *استافیلوکوکوس ارئوس* به خود اختصاص داد. در میان باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش، باکتری‌های گرم‌منفی (*اشریشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) بیشترین مقاومت را نسبت به اسانس باریجه از خود نشان دادند.این امر می‌تواند به علت حضور غشای اضافی خارجی در اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد(۸). نتایج مشابه توسط سالارباشی و همکاران (۲۰۱۴) گزارش شد که در آن فیلم برپایه پلی‌ساکارید محلول نشاسته سویای فعال شده با هر یک از اسانس‌های آویشن و نعناع، رشد باکتری‌های گرم مثبت را بیشتر نسبت از باکتری‌های گرم منفی مهار نمود(۲۷). فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های فعال حاوی اسانس باریجه در این پژوهش می‌تواند به علت حضور ترکیبات فنولی (مانند آلفا-پینن و بتا-پینن) موجود در اسانس باریجه باشد(۱۶). مکانیسم ضدمیکروبی ترکیبات فنولی موجود در اسانس متعدد می‌باشد. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به اخلال در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری و خروج یون‌ها و محتوای داخل سلولی آن، غیر فعال‌سازی مسیر سنتز آنزیم‌های تنفسی در میتوکندری، اخلال در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی و آزادسازی لیپوپلی‌ساکاریدها اشاره نمود(۸).

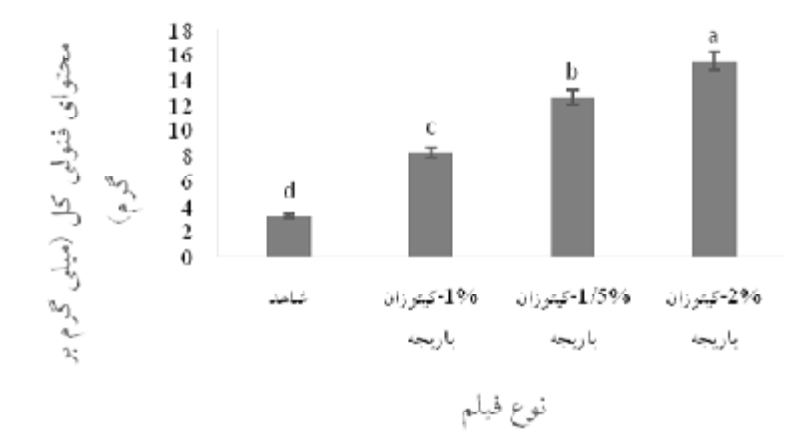
جدول ٦- فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های فعال کیتوزان

فیلم	هاله بازدارندگی (میلی‌متر مربع)			
	اشریشیاکلی	*سودوموناس آئروژینوزا*	*باسیلوس سرئوس*	*استافیلوکوکوس اورئوس*
شاهد	ND^{c}	ND^{c}	ND^{d}	ND^{d}
کیتوزان حاوی ۱ درصد اسانس باریجه	ND^{c}	ND^{c}	۷۱/۲±۳۳/۳۳^{c}	۹۱/۲±۳۰/۲۰^{c}
کیتوزان حاوی ۱/۵ درصد اسانس باریجه	۱۱۰/۵±۲۵/۲۰^{b}	۲۹/۳±۲۰/۵۰^{b}	۲٦۰/۱±۱۱/۷۰^{b}	۳۵۰/۲±۲۰/۲۰^{b}
کیتوزان حاوی ۲ درصد اسانس باریجه	۲۰۰/۳±۵۰/۳٦^{a}	۸۱/۳±۱۵/۵۰^{a}	٤۰۱/٤۰±۵۰/٦٦^{a}	٤٤۰/۳±۳۰/۵۰^{a}

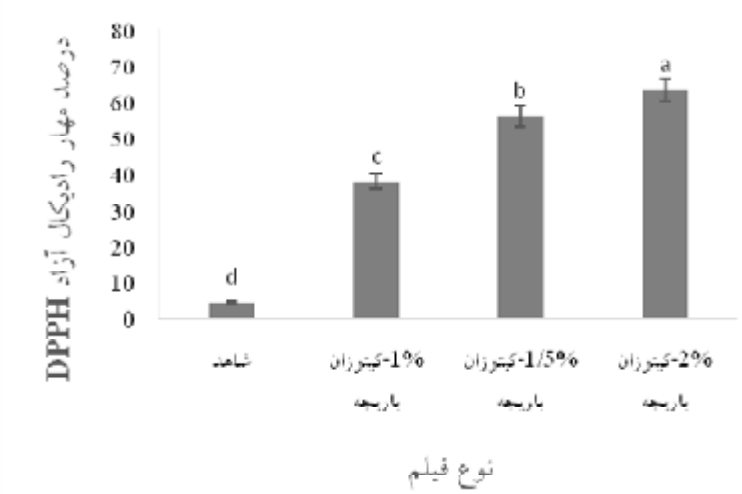
ND: شناسایی نشد، مقادیر ذکر شده برای هاله بازدارندگی به صورت میانگین و انحراف استاندارد از سه تکرار می‌باشند. حروف متفاوت در یک ستون حاکی از تفاوت معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین میانگین‌ها می‌باشند.

۳-۷-ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

محتوای‌فنولی‌کل فیلم‌های فعال به عنوان پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). نتایج نشان داد که فیلم خالص کیتوزان میزان فنول کل بسیار کم معادل با ۳/۲ میلی‌گرم اسید گالیک در یگ گرم را از خود نشان داد. این مقدارکم مرتبط با ترکیبات غیرفنولی کاهنده موجود در فیلم‌کیتوزان و برهم‌کنش آن‌ها با معرف فولین سیوکالچو که توانایی ایجاد ترکیبات رنگی را دارا می‌باشد، است(۹، ۳۱). نتایج مشابه توسط مرادی و همکاران (۲۰۱۲) برای محتوای فنول کل فیلم خالص کیتوزان با میزان فنول کل بسیار کم معادل با ۴ میلی‌گرم اسیدگالیک در یک‌گرم مشاهده گردید(۱۹). میزان ترکیبات فنولی با افزایش غلظت اسانس باریجه افزایش یافت به صورتی که بیشترین میزان محتوای فنولی (۱۵/۵میلی‌گرم اسید گالیک در یگ گرم فیلم) در فیلم فعال حاوی ۲ درصد اسانس باریجه مشاهده شد. نتایج مشابهی در اثر افزودن اسانس رزماری و آویشن شیرازی به فیلم فعال کیتوزان مشاهده گردید(۱، ۱۹). این امر مرتبط با ترکیبات فنولی موجود در اسانس باریجه (مانند آلفا-پینن، بتا-پینن و میرسن) می‌باشد. این ترکیبات موثره موجود در اسانس از جمله مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که به دلیل ساختار فنولی خود قابلیت برهم‌کنش با معرف فولین سیوکالچو و در نتیجه ایجاد ترکیبات رنگی را دارا می‌باشند. در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم به عنوان درصد مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه گیری شد. شکل ۲ میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط فیلم‌های کیتوزان را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با افزایش اسانس افزایش یافت. بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد (۶۳/۵ درصد) در فیلم‌حاوی ۲درصد اسانس باریجه مشاهده شد. در پژوهش‌های قبلی‌اشاره‌شده‌است‌که افزودن اسانس به فیلم زیست تجزیه‌پذیر سبب افزایش مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. به عنوان مثال فیلم کاپا-کاراگینان در اثر افزودن اسانس مرزه، خاصیت مهار رادیکال آزاد را نشان داد(۳۰). همچنین مرادی و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که افزودن اسانس آویشن شیرازی و عصاره دانه انگور سبب بهبود فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد گردید (۱۹). در مطالعه حاضر نیز افزودن اسانس باریجه سبب بهبود خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم کیتوزان گردید.



شکل ۱- محتوای فنولی کل فیلم کیتوزان حاوی غلظت‌های متفاوت از اسانس باریجه (داده‌ها میانگین ۳ بار اندازه‌گیری هستند. بازه‌های خطا معرف انحراف معیار هستند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین میانگین‌ها است.)



شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم کیتوزان حاوی غلظت‌های متفاوت از اسانس باریجه (داده ها میانگین ۳ بار اندازه‌گیری هستند. بازه های خطا معرف انحراف معیار هستند. حروف لاتین غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین میانگین‌ها است).

٤-نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، ترکیبات اصلی اسانس باریجه شناسایی شد و بتا-پینن (با بیشترین میزان نسبت به سایر ترکیبات) مهم‌ترین ترکیب آن تشخیص داده شد. سپس، فیلم طبیعی بر مبنای کیتوزان و غلظت‌های‌مختلف اسانس‌باریجه تهیه و ویژگی‌های مختلف فعال حاصل بررسی شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی فیلم کیتوزان با افزودن مقدار اسانس بهبود یافت. اسانس به دلیل اثر پلاستی‌سایزری سبب افزایش انعطاف‌پذیری و کاهش مقاومت کششی فیلم گردید. افزایش غلظت اسانس تا ۲ درصد سبب بهبود ویژگی‌های‌آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی فیلم فعال کیتوزان گردید. در نهایت پیشنهاد می‌شود با توجه به خصوصیات مذکور، اثر پوشش‌دهی این فیلم بر روی محصولات مختلف غذایی بررسی شود.

٥-منابع

1. 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.
2. Ahmed, J., Hiremath, N. and Jacob, H. 2017. Antimicrobial efficacies of essential oils/nanoparticles incorporated polylactide films against *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* on contaminated cheese. *International Journal of Food Properties*, 20(1): 53-67.
3. Aider, M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. *LWT-food science and technology*, 43(6): 837-842.
4. ASTM. 1994. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA., 08.01(E96-95), 65-70.
5. ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (D882-02). In Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing Materials.
6. 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.
7. Bourtoom, T. 2008. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3): 237-248.

8. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology,* 94(3): 223-253.
9. Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G. and Picci, N. 2009. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 57(13): 5933-5938.
10. Ghaderi-Ghahfarokhi, M., Barzegar, M., Sahari, M., Gavlighi, H. A. and Gardini, F. 2017. Chitosan-cinnamon essential oil nano-formulation: Application as a novel additive for controlled release and shelf life extension of beef patties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 19-28.
11. Heydari-Majd, M., Ghanbarzadeh, B., Shahidi-Noghabi, M. and Najafi, M. A. 2019. A new active nanocomposite film based on PLA/ZnO nanoparticle/essential oils for the preservation of refrigerated Otolithes ruber fillets. *Food Pacjagong anf Shelf Life*, 19: 94-103.
12. Heydari-Majd, M., Rezaeinia, H., Shadan, M. R., Ghorani, B. and Tucker, N. 2019. Enrichment of zein nanofibre assemblies for therapeutic delivery of Barije (*Ferula gummosa Boiss*) essential oil. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 54: 101290.
13. Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. and Farahmandghavi, F. 2015. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare L.* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67: 403-413.
14. Javidi, Z., Hosseini, S. F. and Rezaei, M. 2016. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated *rainbow trout. LWT - Food Science and Technology,* 72: 251-260.
15. Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Koocheki, A. and Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with *oregano* or *thyme* essential oil on shelf life extension of refrigerated *rainbow trout* fillets. *International Journal of Food Microbiology,* 174: 88-97.
16. Kamkar, A., Javan, A. J., Asadi, F. and Kamalinejad, M. 2010. The antioxidative effect of Iranian Mentha pulegium extracts and essential oil in sunflower oil. *Food and Chemical Toxicology,* 48(7): 1796-1800.
17. Lagaron, J.M. and Lopez-Rubio, A. 2011. Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies. *Trends in food science & technology*, 22(11): 611-617.
18. Lin, Q.B., Li, H., Zhong, H.N., Zhao, Q., Xiao, D.H. and Wang, Z.W. 2014. Migration of Ti from nano-TiO2-polyethylene composite packaging into food simulants. Food *Additives and Contaminants: Part A*, 31(7): 1284-1290.
19. Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S. M., Oromiehie, A. R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J. and Hadian, M. 2012. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora Boiss* essential oil and *grape seed* extract. *LWT - Food Science and Technology,* 46(2): 477-484.
20. Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H. and Hosseini, S. M. H. 2010. 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. Park, S.i. and Zhao, Y. 2004. Incorporation of a high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films.*Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7): 1933-1939.
22. Pavlović, I., Petrović, S., Milenković, M., Radenković, M., Branković, S., Couladis, M. and Pavlović-Drobac, M. 2010. Chemical composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii*

Martínez, C. and Cháfer, M. 2011. Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1): 57-63.

29. Shakouri, S., Ziaolhagh, H. R., Sharifi-Rad, J., Heydari-Majd, M., Tajali, R. and Nezarat, S. 2015. The effect of packaging material and storage period on microwave-dried potato (*Solanum tuberosum L.*) cubes. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6): 3899-3910.
30. Shen, Z. and Kamdem, D. 2015. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International journal of biological macromolecules*, 74: 289-296.
31. Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., Hosseini, S. M. and Khaksar, R. 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ-carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52: 116-124.
32. Siripatrawan, U., and Harte, B. R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8): 770-775.
33. 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.

Griseb. ex Heuffel (Apiaceae) essential oils. *Food Chemistry*, 130(2): 310-315.

23. Perdones, Á., Vargas, M., Atarés, L. and Chiralt, A. 2014. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan–cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36: 256-264.
24. Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. and Martin-Belloso, O. 2013. Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1): 240-246.
25. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M. and Khalighi-Sigaroodi, F. 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora Boiss.* from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1562-1567.
26. Salarbashi, D., Tajik, S., Ghasemlou, M., Shojaee-Aliabadi, S., Shahidi Noghabi, M. and Khaksar, R. 2013. Characterization of soluble soybean polysaccharide film incorporated essential intended for food packaging. *Carbohydrate polymers*,98(1), 1127-1136.
27. Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R. and Noghabi, M. S. 2014. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora Boiss* and Mentha pulegium essential oils. *Food Chemistry*, 146: 614-622.
28. Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-

(Original Research Paper)

Hysicochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of a Type of Active Film Based on Chitosan and Barijeh (Ferula gummosa Boiss) Essential Oil

Seyyed Alireza Sajjadi[1], Hamid Sarhadi[1*], Abdolvahed Safarzaei[1]

1-Department of Food Science and Technology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran.

Received: 18/02/2020 Accepted:28/06/2020

Abstract

Active films and edible coatings are used to protect, improve quality and extend the shelf life of food products. The aim of this study was to produce an active film based on chitosan containing different concentrations of Barije essential oil (BEO) from 1 to 2% (w/w) and investigation its chemical composition, physicochemical properties, mechanical structure, antioxidant and antimicrobial activity in the produced films. The major components of BEO were identified by using gas chromatography (GC/MS): β-Pinene (55.5%), α-pinene (12.3%), bulnesol (8.3%), guaiol (6.4%), and myrcene (2.6%), respectively. The incorporation of BEO into film increased the thickness and contact angle (CA), but reduced moisture content (MC), water solubility (WS) and water vapor permeability (WVP). Chitosan/BEO films were less resistant to breakage, more flexible and more opaque than the control film. BEO increased the absorption of color in the visible region, which in turn led to increase of the parameter b* but reduced of a* and L* parameters. In the investigation of antimicrobial activity of the films containing essential oil, Staphylococcus aureus was identified as the most sensitive bacterium and Pseudomonas aeruginosa as the most resistant bacterium. The film containing essential oil showed good antioxidant properties, which by increasing the essential oil concentration by up to 2% improved total phenolic content and activity of scavenging free radicals.

Keywords: Active Film, Chitosan, Barijeh Essential Oil, Physicochemical Properties

[*]Corresponding Author: sarhadi@iaubam.ac.ir