



## بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ضد میکروبی و مکانیکی نانوکامپوزیت حاصل از صمغ غلاف داخلی باقلا حاوی نانو ذره دی اکسید تیتانیوم و اسانس پونه کوهی

مژگان نصیری شهری<sup>۱</sup>، علی محمدی ثانی<sup>۱\*</sup>، وحید حکیم زاده<sup>۱</sup>، مصطفی شهیدی نوقابی<sup>۲</sup>

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

۲- گروه شیمی مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵

کلمات کلیدی:

اکسید تیتانیوم،

باقلا،

پونه کوهی،

زیست تخریب پذیر،

سودوموناس آئروژنزا.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.353

\* مسئول مکاتبات:

mohamadisani@yahoo.com

فیلم‌های خوراکی که علاوه بر ایجاد اثرات سودمند از طریق حمل ترکیبات ضد میکروبی، آنتی-اکسیدانی و غیره، دارای خصوصیات زیست تخریب پذیر هستند، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. در این تحقیق از صمغ حاصل از غلاف درونی باقلا به همراه دو غلظت از گلیسرول (۴۰ و ۶۰٪) و سه غلظت ۱، ۲ و ۳ درصد از اسانس پونه کوهی برای تولید فیلم‌ها استفاده شد. پس از بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مکانیکی فیلم‌ها، بهترین تیمار با نانوذره اکسید تیتانیوم در دو غلظت ۱ و ۲ درصد تهیه و خصوصیات ضد میکروبی آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش اسانس بر ضخامت فیلم افزوده شد در حالی که غلظت‌های بالای اسانس سبب کاهش رطوبت فیلم‌ها گردید. افزودن اسانس به نمونه سبب کاهش حلالیت آن نسبت به نمونه شاهد شد و نمونه‌های با مقادیر بیشتر اسانس نیز حلالیت کمتری را نشان دادند. افزایش غلظت اسانس سبب افزایش کدورت و درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH گردید. غلظت‌های بالای اسانس فاکتور روشنایی فیلم‌ها را کم کرد اما فاکتور زردی و قرمزی را نسبت به نمونه کنترل افزایش داد. به دلیل برهمکنش روغن موجود در اسانس با صمغ، پیوستگی شبکه پلیمر کاهش یافت و در نتیجه مقاومت کششی و نیز فاکتور افزایش طول در نقطه پارگی کاهش پیدا کرد. اثر ضد میکروبی فیلم‌های با ۳ درصد اسانس و حاوی ۲ درصد اکسید تیتانیوم به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) با سایر نمونه‌ها بیشترین ناحیه بازدارندگی را در آزمون انتشار دیسک بر میکروارگانیسم‌های استاف آرئوس، ایشرشیاکلی، سالمونلا تیفوئید، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژنزا ایجاد کرد.

## ۱- مقدمه

معمول (مانند خواص بازدارندگی در برابر گازها و بخار آب و تنش های مکانیکی)، با تغییر شرایط بسته بندی، ایمنی، ماندگاری و یا ویژگی های حسی ماده غذایی را بهبود می بخشد و در عین حال کیفیت ماده غذایی را حفظ می کنند [۴].

صمغ ها گروهی از پلی ساکاریدها یا همان پلیمرهای زیستی هستند که از منابع گیاهی دریایی دانه ای و میکروبی بدست می آیند. این مواد اغلب به واسطه توانایی در ایجاد گرانشی بالا قوام در غلظت های پایین شناخته می شوند. پیچیدگی ساختاری صمغ ها به گونه ای است که در بین آنها می توان از ساختار خطی تا ساختار بسیار شاخه دار مشاهده نمود. این تنوع در ساختار تعیین کننده ویژگی انحصاری هر یک از صمغ ها می باشد [۵].

صمغ پوسته باقلا به عنوان یک منبع جدید دارای خواص جالب توجهی است که می تواند جایگزین مناسبی برای صمغ های مرسوم نظیر گوار و خرنوب باشد. با آگاهی از اثرات مضر مواد افزودنی شیمیایی تمایل مصرف کنندگان به استفاده از مواد افزودنی طبیعی افزایش یافته است. با توجه به استفاده گسترده از هیدروکلوئیدها در مواد غذایی و قیمت بالای این ترکیبات، معرفی منبع جدید صمغ های طبیعی از اهمیت زیادی برخوردار است. بازدهی استخراج صمغ از غلاف داخلی باقلا و برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن را می توان در جدول ۱ مشاهده نمود. مطابق با بیشتر صمغ های استخراجی، pH طبیعی صمغ غلاف لوبیا نیز در مقایسه با صمغ عربی و فارسی کمی اسیدی تر بود. مقایسه مقدار PH با صمغ های استخراجی دیگر مانند صمغ عربی و صمغ فارسی نشان داد که آن کمی اسیدی تر بود [۶].

آلودگی ناشی از مواد بسته بندی تولید شده از مشتقات نفتی و پلیمرهای شیمیایی و از طرفی مشکلات ناشی از روش های مختلف آلودگی زدایی آن ها (مانند دفن کردن، سوزاندن و بازیافت آنها) توجه پژوهشگران را طی سال های اخیر به یافتن جایگزین های مناسب برای این نوع مواد بسته بندی معطوف کرده است تا با بازیافت آسان آن کمترین خسارت به محیط زیست وارد آید [۱]. بنابراین در صورتی که بتوانیم موادی را تولید کنیم که هم دارای خصوصیات کاربردی مورد نیاز در بسته بندی مواد غذایی باشند و هم در صورت رها شدن در محیط زیست، با تغییر در ساختمان شیمیایی به دیگر ترکیباتی نظیر آب، دی اکسید کربن، مواد معدنی و فرآورده های حد واسط مانند بیومس و مواد آلی تبدیل و جذب محیط زیست شوند؛ توانسته ایم بر این مشکل فائق آییم. به چنین موادی، پلیمرهای زیست تخریب پذیر می گویند. اگرچه جایگزینی کامل مواد بسته بندی در حال حاضر با مواد بسته بندی زیست تخریب پذیر تقریباً غیرممکن است ولی می توان برای موارد خاص در بسته بندی مواد غذایی حتی الامکان از بیوپلیمرها استفاده نمود [۲]. فیلم و پوشش های خوراکی از بیوپلیمرهایی مانند پروتئین ها، پلی ساکاریدها کربوهیدرات و صمغ و لیپیدها تولید می شوند. معمولاً پلاستی سایزرها و سایر افزودنی ها به همراه بیوپلیمرهای تشکیل دهنده فیلم، برای تغییر خواص فیزیکی و کاربردی فیلم ها بکار می روند [۳].

از مهمترین مزایای فیلم ها و پوشش های خوراکی در مقایسه با پلیمرهای سنتزی اینست که این نوع پوشش ها می توانند به عنوان حامی برای افزودنی ها و ترکیبات مختلف مانند مواد ضد میکروبی، آنتی اکسیدان ها و غیره عمل کنند. این نوع فیلم ها علاوه بر داشتن خواص بازدارندگی اصلی مانند بسته بندی های

Table 1 general characteristic of the bean inner pod gum [6]

Yield (%)	pH	Protein	Ash	Moisture	TDS	WBC
5.1	5.1	6.4	22.6	9.6	90.4	17.8

نسبت به فیلم شاهد داشت و فیلم ها با افزودن آویشن شیرازی اثر آنتی اکسیدانی خوبی را نشان دادند. بنابراین در این پژوهش علاوه بر بررسی اثرات اسانس پونه و نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر خواص فیزیکیوشیمیایی فیلم‌های بر پایه صمغ غلاف داخلی باقلا، اثرات ضد میکروبی آن نیز بررسی شد.

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱- استخراج صمغ

برای این منظور از حلال اتانول استفاده شد به این صورت که پودر غلاف خشک شده باقلا که از شیکر الک با اندازه مش ۲۵۰ میکرون بدست آمده بود سه مرتبه با اتانول به نسبت ۱:۱۰ و به مدت ۲ ساعت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در هر بار مخلوط شد تا لیبیدها رنگدانه‌ها و ساپونین آن خارج شود. پس از حذف اتانول با کاغذ صافی، ترکیبات باقی‌مانده روی کاغذ صافی در دمای محیط و زیر هود خشک شد و در نهایت به نسبت ۱:۱۰ با استن در حمام آب گرم ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای رنگبری تیمار گردید. ماده خشک باقی‌مانده با آب مقطر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا مواد غیرقابل حل در آب جدا شوند. بخش مایع در لوله‌های سانتریفیوژ جمع‌آوری و توسط روتاری اپراتور (مدل Laborota 4003 ساخت آلمان) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. در مرحله بعد به محلول غلیظ شده، به نسبت ۱:۳ اتانول اضافه گردید تا هیدروکلئیدها از محلول آبیکی توسط اتانول رسوب داده شود و سپس هیدروکلئید باقی‌مانده جمع‌آوری و در هوای محیط خشک شدند. برای خالص‌سازی صمغ نیز ابتدا ۸ گرم پودر صمغ خام را با ۸۰ سی‌سی آب مقطر مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از هیدراته شدن به منظور جداسازی ناخالصی‌ها، از سانتریفیوژ (مدل ای بی آ ساخت آلمان) در ۶۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ استفاده گردید و محلول زلال فوقانی حاصل از سانتریفیوژ، مجدداً به نسبت ۱:۳ با اتانول

پونه با نام علمی *Mentha pulegium* از گیاهان آروماتیک و دارویی متعلق به خانواده *Labiatae* می‌باشد. این گیاهان بومی اروپا، شمال آفریقا، آسیا و خاورمیانه بوده و غنی از ترکیبات فنولیک و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و ضد قارچی می‌باشد [۷] که با توجه به خصوصیات بالقوه فوق می‌تواند در بسته‌بندی‌های فعال و نانوکامپوزیت‌ها به منظور بهبود نگهداری مواد خوراکی به کار رود.

در این رابطه ابراهیمی و همکاران [۸]، به بررسی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و ضد میکروبی فیلم‌های زیست‌تخریب پذیر که به شکل نانوکامپوزیت از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اسانس مرزه در بستری از کربوکسی متیل سلولز تشکیل شده بود پرداختند. نتایج ایشان نشان داد که با افزایش غلظت اسانس، ضخامت فیلم افزایش، رطوبت فیلم کاهش، حلالیت افزایش، جذب آب کاهش، نفوذپذیری نسبت به بخار آب افزایش، کدورت افزایش، شاخص ترکیبات فنلی افزایش، خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش، مقاومت کششی و افزایش طول در نقطه شکست کاهش و خاصیت ضد میکروبی افزایش یافت که با توجه به غلظت‌های مختلف اسانس ارزیابی شد. همچنین عثمان و همکاران [۹]، طی تحقیقی نانو ذره دی اکسید تیتانیوم را با غلظت‌های در پوشش پلی اتیلن با دانسیته کم به عنوان فیلم بسته بندی مواد غذایی به کار بردند و مشاهده کردند که خاصیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی نانو ذره دی اکسید تیتانیوم، با افزایش غلظت نانو ذره دی اکسید تیتانیوم و نیز افزایش مدت زمان تحت تاثیر نور فلورسنت و UV افزایش نشان داد. علیرضا داشی پور و همکاران [۱۰]، ویژگی‌های ضد میکروبی و ضد اکسیدانی و فیزیکی فیلم‌های زیست‌تخریب پذیر تهیه شده با غلظت‌های مختلفی از اسانس آویشن شیرازی را در فیلم کربوکسی متیل سلولز بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که فیلم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی نسبت به فیلم شاهد میزان استحکام کششی بالاتری را دارد. نمونه فیلم شاهد نیز کمترین نفوذپذیری به آب و بخار را نشان داد. با افزایش غلظت آویشن شیرازی شفافیت فیلم‌ها و نیز انحلال پذیری در آب کاهش یافت. بالاترین غلظت آویشن شیرازی اثر مضاعفی بر باکتری‌ها

## ۲-۵- اندازه گیری حلالیت فیلم در آب

تکه های فیلم پس از توزین درون ۵۰ سی سی آب مقطر انداخته شد و به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به آرامی در هم زنی با سرعت ۲۰۰ درو در دقیقه هم زده شد. سپس مخلوط بر روی یک کاغذ صافی که قبلاً به وزن ثابت رسیده و دقیقاً توزین شده بود صاف شد. کاغذ صافی (واتمن ۴۵، ۰) به همراه نمونه در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا به وزن ثابت برسد و سپس درصد حلالیت فیلم ها در آب از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۲].

درصد حلالیت =

وزن فیلم خشک پس از غوطه وری - وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم

وزن ماده خشک اولیه موجود در فیلم

## ۲-۶- رنگ سنجی

برای رنگ سنجی نمونه های فیلم از نرم افزار Image J و اسکنر مدل Sony استفاده شد. با تعیین میزان شفافیت \*L، قرمزی \*a و زردی \*b\* و با استفاده از رابطه ۳ فاکتور تغییر رنگ بررسی شد برای این امر حداقل ۳ نقطه از فیلم اندازه گیری شد [۸ و ۱۳].

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

## ۲-۷- اندازه گیری کدورت

فیلم های مورد نظر به صورت مستطیلی بریده شده و به طور مستقیم در داخل سل اسپکتروفوتومتر (مدل HACH DR5000 ساخت آمریکا) قرار گرفت. همچنین از یک سل خالی به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. در نهایت اندیس کدورت با استفاده از معادله ۴ محاسبه گردید.

$$\text{Turbidity} = \text{Abs}_{600} / x$$

که در این معادله Abs600 مقدار جذب در ۶۰۰ نانومتر و X مقدار ضخامت فیلم بر حسب میلی متر می باشد [۱۴].

## ۲-۸- اندازه گیری خصوصیات مکانیکی

ارزیابی های مکانیکی فیلم ها با استفاده از دستگاه آنالیز مکانیکی - کششی (Stable microsystem TA-XT plus) و

رسوب داده شد و صمغ، پس از جمع آوری درآون (مدل ELF ساخت ایران) خشک شد [۶].

## ۲-۲- روش تولید فیلم

برای رسیدن به فیلم مورد نظر از روش قنبرزاده و همکاران [۱۱] با کمی تغییرات استفاده شد. به این صورت که ابتدا میزان ۴ گرم از صمغ خشک شده و دو غلظت ۴۰ و ۶۰ درصد وزنی صمغ از نرم کننده (پلاستی سایزر) گلیسرول که طی آزمون های اولیه مشخص گردید به همراه امولسیفایر تویین ۲۰ در آب مقطر ۹۰ درجه سانتیگراد مخلوط گردید. سپس مخلوط نهایی با سه غلظت از اسانس پونه (۱، ۲ و ۳٪ حجمی/حجمی) تحت اولتراتوراکس (مدل IKA T25 ساخت آلمان) آمیخته گردید و در یک پلیت استریل ریخته شد تا خشک گردد. پس از انجام آزمایشات مربوط به فیلم و بدست آوردن بهترین فرمول آن، نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در دو غلظت برای ایجاد خاصیت ضد میکروبی به آن اضافه گردید.

## ۲-۳- اندازه گیری ضخامت فیلم

برای این منظور و اطمینان از مناسب بودن سطح کستینگ فیلم ها از میکرومتر دیجیتالی با دقت نزدیک به ۰/۰۰۰۱ میلی متر استفاده شد. حداقل ۱۰ نقطه تصادفی هر فیلم اندازه گیری گردید. اندازه گیری ضخامت فیلم ها برای آزمایشات مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب ضروری می باشد.

## ۲-۴- اندازه گیری رطوبت فیلم

برای انجام این آزمایش، نمونه های فیلم در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد آون برای رسیدن به وزن ثابت قرار داده شدند. سپس فیلم های خارج شده از آون در دسیکاتور قرار داده شد و پس از سرد شدن با ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین گردیدند تا وزن نمونه خشک را بدست آید. محتوای رطوبت فیلم ها مطابق رابطه ۱ محاسبه گردید. در این آزمایش تبخیر پلاستی سایزر در درون فیلم ها ناچیز در نظر گرفته شد [۸].

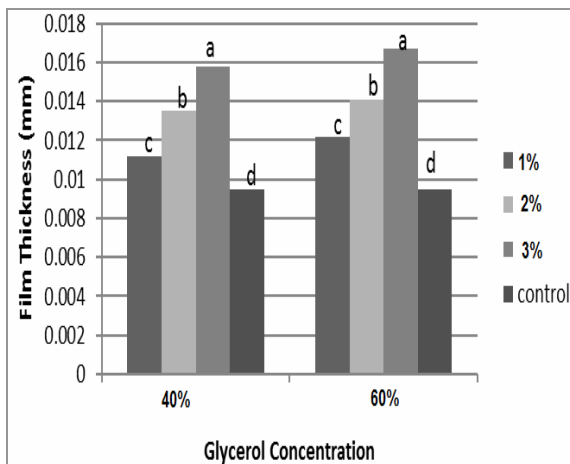
درصد رطوبت بر مبنای وزن مرطوب =

$$100 \times (\text{جرم نمونه مرطوب} / \text{جرم آب نمونه})$$

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تغییرات ضخامت فیلم

همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود با افزایش غلظت اسانس و درصد گلیسرول، ضخامت نمونه های فیلم افزایش یافت. به طوری که افزایش غلظت اسانس تفاوت معنی داری با سایر نمونه ها در ضخامت فیلم ایجاد کرد اما افزایش غلظت گلیسرول تفاوت معنی داری نداشت. افزایش ضخامت می تواند به علت افزایش میزان مواد جامد ناشی از حضور اسانس و گلیسرول در فیلم باشد [۱۷ و ۲۳]. همچنین حضور اسانس می تواند سبب پر شدن حفرات بافت متخلخل ماتریکس صمغ شود [۸]. بدیهی است که نمونه کنترل با تفاوتی معنی داری کمترین میزان ضخامت را در بین تیمارها دارا بود



**Fig 1** Film thickness changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

#### ۳-۲- تغییرات رطوبت فیلم

مطابق شکل ۲ مشاهده شد که با افزایش غلظت اسانس، رطوبت نمونه های فیلم کاهش پیدا کرد. مطابق با یافته ها و تحقیقات انجام شده توسط سالارباشی و همکاران [۱۴] و همچنین داشی پور و همکاران [۱۸] علت این پدیده احتمالاً افزایش میزان مواد جامد و همچنین اثر دافعه اسیدهای چرب موجود در اسانس بوده که با پوشاندن گروه های فعال صمغ سبب از دسترس خارج نمودن آن ها و در نتیجه جلوگیری از اتصالات هیدروژنی توسط مولکول های آب با آن گروه ها می شود. از طرفی طبیعتاً افزایش درصد گلیسرول نیز جذب آب را بالا می برد که البته بین دو مقدار ۴۰ و ۶۰ درصد تفاوت معنی داری نداشت.

براساس روش استاندارد ASTM-D 882 انجام گرفت. ابتدا فیلم ها به شکل مستطیل به ابعاد ۶×۱ سانتی متر بریده شد و در دسیکاتور با رطوبت ۵۰٪ نیترات منیزیم و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت حداقل ۴۸ ساعت مشروط سازی شدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۴۰ میلی متر و سرعت حرکت فک ها ۲۵ میلی متر بر دقیقه تنظیم شدند. در نهایت مقاومت کششی (TS)، افزایش طول تا نقطه شکست (EB) و مدول یانگ محاسبه گردید [۱۵].

#### ۲-۹- اندازه گیری DPPH

برای انجام آزمون DPPH به روش بیان و کیم با اندکی تغییرات عمل شد. ۱۰۰ میلی گرم نمونه فیلم در ۵ میلی لیتر آب مقطر حل شد. سپس میزان ۰/۱ میلی لیتر از عصاره حاصل را به ۲/۹ میلی لیتر محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار DPPH افزوده و محلول گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد سپس جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-Vis خوانده شد [۱۶]. در نهایت درصد مهارکنندگی رادیکال های آزاد طبق معادله ۵ محاسبه گردید.

$$\text{DPPH Scavenging Activity}\% = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}} - (\text{Abs}_{\text{Extract}} / \text{Abs}_{\text{DPPH}})}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}}$$

#### ۲-۱۰- تعیین فعالیت ضد میکروبی

برای تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم های فعال حاوی اسانس پونه بر استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سرئوس، ایشرشیا کلی، سالمونلا تیفوئید و سودوموناس آئروژنزا از روش انتشار دیسک استفاده شد. به این صورت که محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده شد و سپس فیلم های تهیه شده به شکل دیسک بر روی آن ها قرار داده شد و قطر هاله عدم رشد آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت [۸ و ۱۴].

#### ۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در غالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS version 22.0، و در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. و به منظور مقایسه میانگین داده ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده شد.

### ۳-۴- تغییرات کدورت

نتایج مطابق با شکل ۴ نشان داد، افزودن اسانس منجر به افزایش فاکتور کدورت در فیلم ها نسبت به نمونه کنترل می گردد که می تواند به علت پراکنده کردن نور توسط اسانس روغنی توزیع شده در سرتاسر شبکه پلیمری باشد. دلیل دیگر می تواند ایجاد سطح ناهموار در سطح فیلم در زمان خشک شدن باشد چراکه اسانس جمع شده در سطح منجر به این ناهمگونی می شود [۱۹]. اما افزایش غلظت اسانس از شدت کدورت کاست. ابراهیمی و همکاران [۸] طی بررسی خصوصیات نانوکامپوزیت حاصل از کربوکسی متیل سلولز به همراه اسانس مرزه نیز کاهش کدورت در غلظت های بالای اسانس را احتمالاً به دلیل انعکاس سطح روغنی فیلم دانستند. افزایش میزان گلیسرول به سبب توزیع یکنواخت تر ترکیبات در فیلم میزان کدورت را کمی کاهش داد که اختلاف آن معنی دار نبود

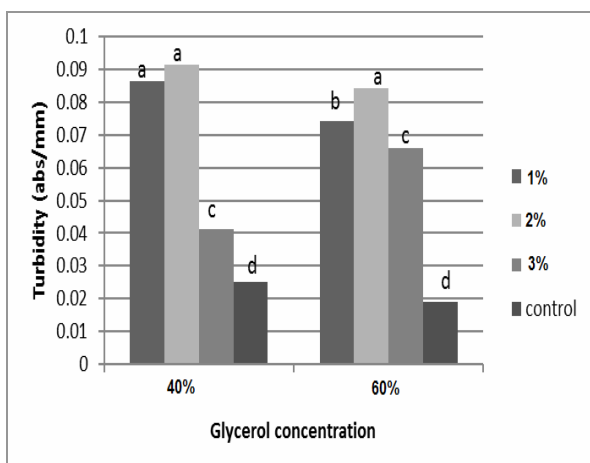


Fig 4 Film Turbidity changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

### ۳-۵- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم های زیست تخریب به میزان ترکیبات ناشی از اسانس و عمدتاً ترکیبات فنلی آن بستگی دارد. نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد (شکل ۵) که با افزایش غلظت اسانس پونه، میزان رادیکال های آزاد کاهش می یابد. دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی خیلی کم نمونه کنترل نیز می تواند مربوط به ترکیبات طبیعی آنتی اکسیدان صمغ حاصل از غلاف داخلی باقلا باشد. قدرت آنتی اکسیدانی تمامی نمونه ها با نمونه کنترل

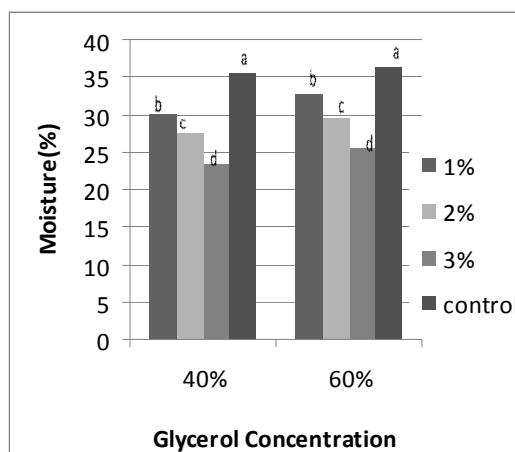


Fig 2 Film Humidity changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

### ۳-۳- تغییرات حلالیت فیلم

نتایج نشان داد که میزان حلالیت فیلم ها در آب با افزایش غلظت اسانس افزایش پیدا کرد (شکل ۳). هرچند که نمونه شاهد نیز به دلیل خاصیت بالای آبدوستی بالاترین حلالیت را نسبت به سایر نمونه ها دارا بود. بر اساس یافته های مالی و همکارانش [۱۹] در سال ۲۰۰۴ افزودن اسانس به فیلم ها سبب می شود تا در اثر برهمکنش بین روغن های ضروری و پلی ساکاریدها ساختار پایدار فیلم بر هم ریخته و حلالیت افزایش یابد. همچنین ابراهیمی و همکاران [۸] بیان داشتند افزایش میزان گلیسرول سبب می شود تا به دلیل وجود گروه های هیدروکسیل در ساختار فیلم ها حلالیت افزایش یابد.

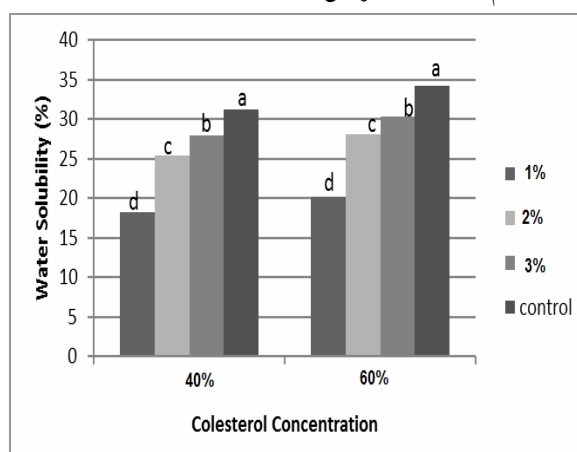


Fig 3 Film solubility changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

### ۳-۶- رنگ سنجی

نتایج نشان داد (جدول ۲) که نمونه‌های کنترل دارای بالاترین میزان روشنایی (L) و کمترین میزان قرمزی (a) و زردی (b) بودند. کاهش شدت روشنایی که در نمونه‌های اسانس‌دار شاهد بودیم احتمالاً به علت کدورتی است که در فیلم‌های اسانس‌دار نسبت به نمونه کنترل ایجاد شد و در نتیجه بر روی شاخص روشنایی تاثیر گذاشت. همچنین این امر می‌تواند به علت پراکنده کردن نور توسط قطرات چربی ناشی از اسانس توزیع شده در سرتاسر شبکه پروتئینی مربوط باشد. هرچند گلیسرول نیز موجب کاهش اندکی در این پارامتر شد [۱۹ و ۲۲]. فاکتور قرمزی برای نمونه‌های حاوی اسانس پونه و نمونه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. در مورد زردی نمونه‌های حاوی اسانس شاهد اختلاف معنی‌دار و بعضاً منفی (در مورد نمونه کنترل و اسانس‌دار پونه) بودیم که فیلم‌های فاقد اسانس منفی‌ترین میزان را داشتند [۱۸]. در مورد اختلاف رنگ نمونه‌ها  $\Delta E$  با فیلم کنترل، نتیجه معنی‌دار بود که احتمالاً به حرکت فاز روغنی اسانس به سطح فیلم‌ها که طی خشک کردن رخ می‌دهد و بر روی ویژگی رنگی نمونه‌ها موثر است، ارتباط دارد [۸].

تفاوت معنی‌داری داشتند. این نتایج حاکی از ارتباط مستقیم ترکیبات فنلی اسانس و قدرت ضداکسایشی آن‌ها می‌باشد [۱۴، ۲۰ و ۲۱]. افزایش میزان گلیسرول در فیلم‌ها کمی به فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزود که احتمالاً به دلیل وجود گروه‌های عاملی هیدروکسیل در گلیسرول و واکنش آن‌ها با ترکیبات فنلی می‌باشد.

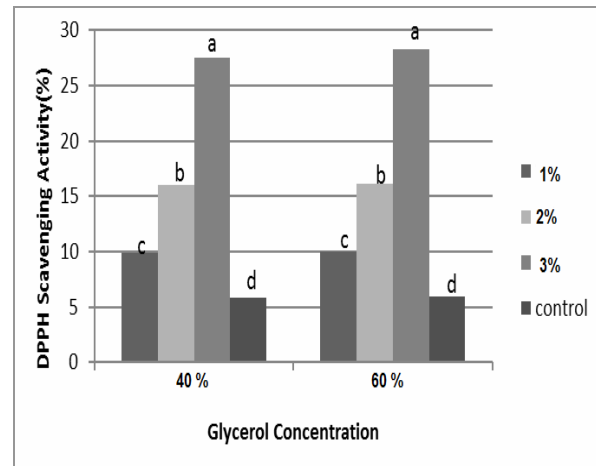


Fig 5 Free Radical changes in DPPH at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

Table 2 Colorimetric factors changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

Oregano Essential Oil	Glycerol	$\Delta E$	b	a	L
1%	40%	7.52±1.23c	1.02 ±0.005b	1.001± 0.00a	61.587±1.23b
2%		9.62±1.025b	0.523±0.00c	1.012±0.00a	61.001±0.52b
3%		18.125±2.52a	-0.012±0.005d	1.026 ±0.005a	60.221±2.52c
Control		0.33±0.005d	3.362±0.25a	0.998±0.005a	62.652 ± 0.775a
1%	60%	6.87±1.02c	1.11±1.25a	0.921±0.00a	59.112±0.253a
2%		10.25±0.005b	0.98±0.487b	0.917±0.00a	58.255±1.78b
3%		16.165±1.1a	0.2±0.00c	0.988±0.251a	57.411±0.554c
Control		0.68±0.005d	1.152±0.005a	0.916±0.005a	59.421±1.255a

پیوند ضعیف پلیمر-روغن موجود در اسانس نسبت داد که منجر به کاهش پیوستگی شبکه پلیمر و در نتیجه کاهش مقاومت کششی و نیز کاهش فاکتور افزایش طول در نقطه پارگی نمونه‌ها می‌گردد. علت افزایش فاکتور افزایش طول در نقطه پارگی نمونه‌های حاوی اسانس نسبت به نمونه کنترل را نیز می‌توان به خاصیت پلاستی‌سایزری اسانس‌ها به علت ساختار روغنی آن‌ها نسبت داد [۲۳].

### ۳-۷- تغییرات خصوصیات مکانیکی

طبق نتایج حاصل از این پژوهش (جدول ۳)، نمونه فیلم کنترل دارای بالاترین میزان مقاومت کششی، مدول یانگ و کمترین افزایش طول در نقطه پارگی بود. به طوری که با افزایش غلظت اسانس، مقاومت کششی نمونه‌ها کاهش یافت. علت این امر را می‌توان به جایگزینی پیوند قوی پلیمر-پلی ساکارید صمغ با

کششی را در پی خواهد داشت [۲۲]. افزایش میزان گلیسرول نیز به دلیل نرم تر کردن فیلم نیز مقاومت کششی را کمی افزایش داد. مدول یانگ رابطه مستقیمی با مقاومت کششی نمونه‌ها دارد [۲۴].

دلیل دیگر برای تبیین نتایج مشاهده شده را می‌توان به ترکیبات فنولیک موجود در اسانس‌ها نسبت داد که منجر به کاهش چگالی شبکه فیلم شده و در نتیجه موجب جابه‌جایی آسان زنجیره‌های پلیمری تحت استرس مکانیکی شده و در نتیجه کاهش مقاومت

**Table 3** Mechanical Parameter changes at different concentrations of Oregano essential oil and glycerol

Oregano Essential Oil	Glycerol	Young's modulus (Mpa)	Elongation at break point (%)	Tensile Strength (Mpa)
1%	40%	117.7±4.25b	13.46± 1.25a	0.0147±0.00b
2%		115.2±7.52c	12.27±1.01b	0.0122±0.005c
3%		110.09±3.48d	10.49±0.65c	0.0121±0.075c
Control		376.2±12.24a	5.37±0.254d	0.0252±0.005a
1%	60%	121.3±11.2b	11.24±1.02a	0.0152±0.005b
2%		118.2±9.52c	10.32±0.42b	0.0141±0.00c
3%		115.9±11.10d	9.01±1.24c	0.0135±0.005d
Control		371.2±6.76a	5.01±0.75d	0.0287±0.005a

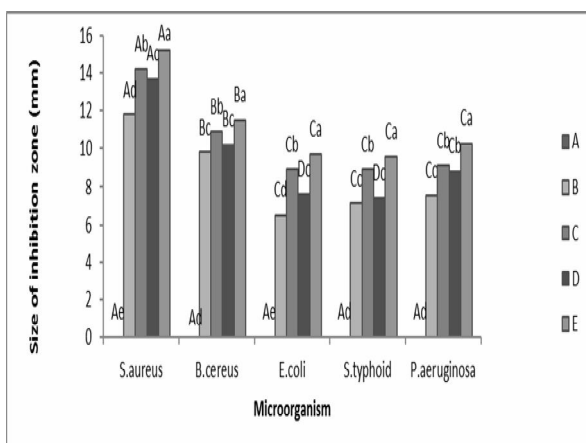
### ۳-۸- فعالیت ضد میکروبی

ضخامت بیشتر، کدورت کمتر و خصوصیات آنتی اکسیدانی بالاتر با مقدار گلیسرول ۶۰ درصد انتخاب شدند تا با دو غلظت ۱ و ۲ درصد از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر اساس جدول ۴ به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی تیمار بندی شوند.

بر اساس نتایج بدست آمده در قسمت قبل دو نمونه ی با غلظت ۱ درصد از اسانس پونه به دلیل ایجاد خصوصیات فیزیکی مناسب تر از قبیل نفوذپذیری کمتر به آب، حلالیت کمتر، مقاومت کششی بیشتر و نمونه ی با غلظت ۳ درصد به دلیل

**Table 4** Treatment based on the concentration of titanium dioxide nanoparticles to evaluate its antimicrobial activity

Treatments	Percentage of Oregano Essential oil (v/v)	Percentage of Titanium dioxide particles (w/v)
A (control)	0	0
B	1	1
C	1	2
D	3	1
E	3	2



**Fig 6** Comparison of the difference between the microbial inhibitory region-s by different treatments based on the amount of essential oil and nanoparticles

تاثیر ضد میکروبی نانوکامپوزیت حاوی دی اکسید تیتانیوم بر پایه صمغ در شکل ۶ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده افزایش غلظت اسانس پونه و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم خاصیت ضد میکروبی را افزایش داد به طوری که نمونه حاوی ۳ درصد اسانس پونه و ۲ درصد نانوذرات بیشترین ناحیه بازدارندگی را ایجاد کرد. تاثیر بازدارندگی بین تیمار ها نیز به صورت  $E > C > D > B > A$  دیده شد.

بر اساس شکل ۶ استافیلوکوکوس آرتوس به عنوان یک باکتری گرم مثبت بیشتر از گرم منفی ها تحت تاثیر بازدارندگی اسانس و نانوذره قرار گرفت.



فعالیت رادیکال آزاد DPPH گردید. غلظت های بالای اسانس روشنایی را کم اما فاکتور زردی و قرمزی را نسبت به نمونه کنترل افزایش داد. به دلیل برهمکنش روغن موجود در اسانس با صمغ، پیوستگی شبکه پلیمر کاهش و در نتیجه مقاومت کششی و نیز فاکتور افزایش طول در نقطه پارگی کاهش پیدا کرد. اثر ضد میکروبی فیلم های با ۳ درصد اسانس و حاوی ۲ درصد اکسید تیتانیوم به طور معنی داری ( $p < 0.05$ ) با سایر نمونه ها بیشترین ناحیه بازدارندگی را در آزمون انتشار دیسک بر میکروارگانیزم های ساپروفیت و پاتوژن مانند استاف آرئوس، ایشرشیاکلی، سالمونلا تیفوئید، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آروژنزا ایجاد کرد.

#### ۵- منابع

- [1] Ray, S.S and Bousmina, M. 2005. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. Progress in Materials Science, 50, 962-1079.
- [2] Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. and Zahedi, Y. 2009. Biodegradable and edible biopolymers in food and drug packaging. Amir Kabir Press, Tehran University (In Persia).
- [3] Gennadios, A. 2002. Soft gelatin capsules. In: Protein based Films and Coatings, pp: 393–443. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [4] Han, J.H. and Rooney, M. L. 2002. Personal communications, Active Food Packaging. Workshop, Annual Conference of the Canadian Institute of Food Science and Technology (CIFST).
- [5] Izydorczyk, M., Cui, S.W. and Wang, Q., 2005. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications, 293, p.299.
- [6] Taghizadeh, N. and Hakimzadeh, V. 2017. Extraction and evaluation of physicochemical and rheological properties of bean pod shell gum. International Journal of Advanced Life Sciences. 10(2), 226-230.
- [7] Han, J. H. 2003. Antimicrobial food packaging. In: Novel Food Packaging Techniques. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. pp. 50–70.

در مقابل باسیلوس سرئوس مقاومت بیشتری را نشان داد که بیشتر به خاطر فرم اسپوری آن است. مقاومت بیشتر گرم منفی ها همانطور که قبلا نیز گزارش شده است مربوط به وجود لایه پلی ساکاریدی است که آن ها را در برابر رنگ ها، آنتی بیوتیک ها و ضد عفونی کننده ها مقاوم می کند. در مقابل وجود پپتیدوگلیکان در گرم مثبت ها نفوذ پذیری را بیشتر می کند [۲۵]. ساختار آبدوست دیواره باکتری های گرم منفی که عمدتاً از لیپو پلی ساکارید تشکیل شده اند نفوذ ترکیبات هیدروفوب مانند روغن ضروری اسانس را به داخل باکتری مسدود می کنند بنابراین گرم مثبت ها بسیار به روغن های ضروری حساس ترند [۲۶].

دی اکسید تیتانیوم نیز به نوان یک فوتوکاتالیست موثر، غیر سمی با پایداری شیمیایی عمدتاً در دسته ترکیبات GRAS شناخته شده است [۲۷]. دی اکسید تیتانیوم در سایز نانو به دلیل افزایش سطح موثر، فعالیت فوتوکاتالیستی بیشتری از حالت توده ای آن دارد [۲۸]. همچنین روغن های ضروری به طور گسترده ای به منظور فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسیداتیویشان در مواد خوراکی استفاده می شوند. با این حال به دلیل شدت طعم بالای روغن های ضروری در اسانس ها به جای استفاده مستقیم در مواد غذایی عمدتاً در فیلم های خوراکی استفاده می شوند. فعالیت ضد میکروبی روغن های ضروری بیشتر در رابطه با ترکیبات فنلی مثل تیمول، کارواکرول و ترکیبات ترپنیک می باشد که تاثیر متفاوتی در اتصال به پروتئین غشاء سلول میکروبی و نفوذ پذیری آن دارد [۲۹]. از مهمترین ترکیبات فنلی پونه کوهی می توان به menthone و pulegone اشاره کرد [۳۰].

#### ۴- نتیجه گیری کلی

در این تحقیق افزودن اسانس پونه کوهی به صمغ حاصل از غلاف داخلی باقلا و سپس اضافه کردن ۱ و ۲ درصد از نانوذرات اکسید تیتانیوم در بهترین نمونه از فیلم های حاوی اسانس، نشان داد که با افزایش غلظت اسانس بر ضخامت فیلم افزوده شد در حالیکه غلظت های بالای اسانس سبب کاهش رطوبت فیلم ها گردید. اگرچه افزودن اسانس سبب کاهش حلالیت شد اما در تیمارهای دارای اسانس، افزایش اسانس حلالیت فیلم را کاهش داد. افزایش غلظت اسانس سبب افزایش کدورت و کاهش

- using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 100(2), pp.239-244.
- [17] Arafat, M.T., Tronci, G., Yin, J., Wood, D.J. and Russell, S.J. 2015. Biomimetic wet-stable fibres via wet spinning and diacid-based crosslinking of collagen triple helices. *Polymer*, 77, pp.102-112.
- [18] Mali, S., Grossmann, M.V.E., García, M.A., Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. 2005. Mechanical and thermal properties of yam starch films. *Food Hydrocolloids*, 19(1), pp.157-164.
- [19] Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A. and Chafer, M. 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3(1), pp.1-16.
- [20] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A. and Koocheki, A. 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties, *Food Hydrocolloids*, 36: 9-19.
- [21] Gómez-Estaca, J., Bravo, L., Gómez-Guillén, M. C., Alemán, A., and Montero, P. 2009. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts, *Food Chemistry*, 112(1): 18-25.
- [22] Akhtar, M. J., Jacquot, M., Jamshidian, M., Imran, M., Arab-Tehrany, E. & Desobry, S. 2013. Fabrication and physicochemical characterization of HPMC films with commercial plant extract: Influence of light and film composition. *Food Hydrocolloids*, 31, 420-427.
- [23] Shojae-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M., Hosseini, S. M. and Khaksar, R. 2013. Characterization of antioxidantantimicrobial carrageenan films containing *Satureja hortensis* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 52, 116-124.
- [24] Pires C, Ramos C, Teixeira B, et al. Hake protein edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloid* 2013; 30: 224–231.
- [25] Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S., Ramteke, R.S. 2004. [8] Bazzaz, A.E., Hakimzadeh, V. and Noghabi, M.S. 2019. Preparation and study of carboxymethyl cellulose biodegradable films properties containing *Mentha pulegium* essential oil. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, p.0892705719864148.
- [9] Othman, S.H., Abd Salam, N.R., Zainal, N., Kadir Basha, R. and Talib, R.A. 2014. Antimicrobial activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticle-coated film for potential food packaging applications. *International Journal of Photoenergy*, 2014.
- [10] Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., German, J.B., Ghanati, K., Khakpour, M. and Khaksar, R. 2015. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, pp.606-613.
- [11] Ghanbarzadeh B, Almasi H. 2011. Physical properties of edible emulsified based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International journal Biology Macromolecules*, 48: 44-49.
- [12] Park, H. J., Weller, C. L., Vergano, P. J. and Testin, R. F. 2003. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *Journal of Food Science*, 58, (6), 1361–1364.
- [13] Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A. and Yarmand, M.S. 2011. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127(4), pp.1496-1502.
- [14] Salarbashi, D., Tajik, S., Ghasemlou, M. and Shojae-Aliabadi, S. 2013. Characterization of soluble soybean polysaccharide film incorporated essential oil intended for food packaging. *Carbohydrate Polymers*. 98, 1127-1136.
- [15] ASTM, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting D882–02, in *Annual book of ASTM*, Philadelphia, American Society for Testing and Materials, 2002.
- [16] Byun, Y., Kim, Y.T. and Whiteside, S. 2010. Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with  $\alpha$ -tocopherol, BHT and polyethylene glycol

- [28] Lin, B., Luo, Y., Teng, Zi, Zhang, B., Zhou, B., & Wang, Q. 2015. Development of silver/titanium dioxide/chitosan adipate nanocomposite as an antibacterial coating for fruit storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 63(2), 1206-1213.
- [29] Rawdkuen, S. 2018. Edible films incorporated with active compounds: their properties and application. In *Active Antimicrobial Food Packaging*. IntechOpen.
- [30] Jahanpanahi, M., Mohamadi Sani, A. 2016. Antimicrobial effect of nanofluid including Zinc oxide (ZnO) nanoparticles and Mentha pulegium essential oil. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 4(04), 85-89.
- Antioxidant and antibacterial activities of various sea buckthorns (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 92: 119-124.
- [26] Ojeda-Sana, A.M., van Baren, C.M., Elechosa, M.A., Juarez, M.A., Moreno, S. 2012. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food continuation*, 31: 189-195.
- [27] Lian, Z., Zhang, Y., & Zhao, Y. 2016. Nano-TiO<sub>2</sub> particles and high hydrostatic pressure treatment for improving functionality of polyvinyl alcohol and chitosan composite films and nano-TiO<sub>2</sub> migration from film matrix in food simulants. *Innovative Food Science. Emer. Tech.*, 33, 145-153.



## Investigation of physicochemical, antimicrobial and mechanical properties of nanocomposite from bean inner pod gum containing nanoparticles of titanium dioxide and oregano essential oil

Nasiri Shahri, M. <sup>1</sup>, Mahommadi Sani, A. <sup>2\*</sup>, Hakimzadeh, V. <sup>3</sup>, Shahidi Noghbi, M. <sup>4</sup>

1. Ph.D. Student of Department of Food Science and technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
2. Corresponding Author: Associate professor of Department of Food Science and technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
3. Assistant professor of Department of Food Science and technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
4. Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2020/ 11/ 19 Accepted 2021/ 02/ 13</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Beans, Biodegradable, Oregano, Pseudomonas Aeruginosa, Titanium Oxide.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.117.353</p> <hr/> <p>*Corresponding Author E-Mail: Mohamadisani@yahoo.com</p>	<p>Edible films, which in addition to creating beneficial effects by carrying antimicrobial compounds, antioxidants, etc., have biodegradable properties, have attracted the attention of many researchers. In this study, the gum obtained from the inner pod of bean with two concentrations of glycerol (40 and 60%) and three concentration of oregano essential (1, 2 and 3%) oil was used to produce biofilms. After studying the physicochemical and mechanical properties of the resulting films, the best treatment was combined with titanium oxide nanoparticles in two concentrations of 1 and 2% and its antimicrobial properties were also investigated. The results showed that increasing the essential oil raised the film thickness, while high concentrations of essential oil decreased the moisture content of the films. Although the addition of essential oil reduced the solubility of films compared with control sample, but in the treatments with essential oil, increasing the essential oil reduced the solubility of the film. Increasing the concentration of essential oil also increased turbidity and free radical DPPH activity. High concentrations of essential oil decreased the lightness of the films but increased the yellowing and redness compared to the control sample. Due to the interaction of the oil in the essential oil with the gum, the cohesion of the polymer network decreased and consequently, the tensile strength and the elongation factor at the break point decreased. Antimicrobial effect of films with 3% essential oil and 2% titanium oxide had the highest inhibitory area in the disk diffusion test with other samples on Staphylococcus Aureus, Escherichia coli, Salmonella Typhoid, Bacillus Cereus and pseudomonas Aeruginosa significantly (<math>p &lt; 0.05</math>).</p>