



ساخت بسته بندی فعال با استفاده از اسانس اکالیپتوس و اسانس نعنا فلفلی به روش الکتروریسی: بررسی

ویژگی ها و خاصیت ضد باکتریایی

زهرا سرگزی^۱، محمد امین میری^{۲*}، محمد علی نجفی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران؛ آزمایشگاه الکتروریسی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

هدف از انجام این تحقیق، تقویت خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف فعال حاوی اسانس اکالیپتوس با استفاده از غلظت های مختلف اسانس نعنا فلفلی برای استفاده به عنوان بسته بندی فعال می باشد. نانوالیاف حاوی مخلوط اسانس اکالیپتوس (۱۰ درصد) و اسانس نعنا فلفلی (غلظت های ۰، ۲،۵، ۵، ۱۰ درصد (حجمی/حجمی)) تولید شد. نتایج SEM و Image-J نشان داد که بارگذاری اسانس، قطر الیاف الکتروریسی شده را از ۲۰۰ به ۴۰۰ نانومتر افزایش داد. تصاویر SEM نشان داد که مورفولوژی الیاف الکتروریسی شده به شکل لوله ای است. XRD برای مطالعه ساختار فیزیکی الیاف الکتروریسی شده به کار گرفته شد و دیفراکتوگرام های XRD نشان می دهد که افزودن اسانس به زئین، منجر به تغییر ساختار کریستالی زئین نشده است. ترموگرام های TGA نشان داد که بارگذاری اسانس باعث افزایش پایداری حرارتی الیاف الکتروریسی شده، گردید. طیف FTIR برهمکنش بین الیاف الکتروریسی شده و اسانس را نشان می دهد. آزمایش ضد میکروبی به روش انتشار دیسک انجام شد و نتایج نشان داد که پوشش فیبری حاوی اسانس از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی جلوگیری نموده. با توجه به نتایج این تحقیق، الیاف حاوی مخلوط اسانس های اکالیپتوس و نعنا فلفلی را می توان به عنوان یک بسته بندی فعال برای استفاده در بسته بندی مواد غذایی مختلف مانند پنیر، گوشت و برخی محصولات غذایی دیگر در نظر گرفت.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۱

کلمات کلیدی:

مخلوط اسانس ها ،

الکتروریسی،

زئین،

—خاصیت ضد میکروبی

DOI: 10.22034/FSCT.20.143. 91

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.143.7.9

* مسئول مکاتبات:

ma.miri@uoz.ac.ir

۱- مقدمه

ضدمیکروبی و خواص دیگر آن مورد توجه بوده است. این گیاه منبع غنی از پلی فنل‌ها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن اکالیپتول یا سینئول می‌باشد. از اکالیپتوس برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند آنفلونزا، تونسیلیت، اسهال خونی و بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. اسانس برگ این گیاه دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد درد، آنتی اکسیدان، ضد ازدیاد قند خون، ضد مالاریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی است [۷]. همچنین اسانس اکالیپتوس روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری، سالمونلا پاراتیفی، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس و نیز قارچ کاندیدا آلبیکنس فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داده است. اما طبق مطالعه قبلی [۷]، نانوالیاف حاوی اسانس اکالیپتوس فاقد خاصیت ضد میکروبی قوی برای استفاده در بسته بندی مواد غذایی می‌باشد، لذا در این مطالعه جهت افزایش کارایی اسانس اکالیپتوس، نعنا فلفلی نیز همراه با اسانس اکالیپتوس در نانوالیاف زئین بارگذاری می‌شود.

اسانس نعناع به طور گسترده‌ای در طعم دهنده‌ها، عطرها، داروها و کاربردهای دارویی تولید و مصرف می‌شود. معروف‌ترین و پرمصرف‌ترین نوع تیره نعنائیان، نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita L.* می‌باشد که گونه ای هیبریدی و از پیوند بین دو گونه *M. aqatica L.* و *M. spicata L.* بدست می‌آید [۸]. ثابت شده است که اسانس نعناع فلفلی دارای چندین خاصیت مهم مانند ضد قارچ، ضد ویروس، ضدباکتری، حشره‌کش، لاروکش و دافع پشه است و بیشتر به عنوان ترکیبات غیر سمی برای انسان و بسیار کشنده برای پاتوژن‌ها در نظر گرفته می‌شود. ماده موثره اصلی اسانس نعناع فلفلی، منتول می‌باشد که حدود ۱۹ تا ۲۹ درصد اسانس را تشکیل می‌دهد [۹].

بسته‌بندی‌های فعال زیست‌تخریب‌پذیر در حال حاضر سیستم‌های امیدوارکننده و جالبی در صنایع غذایی برای افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی هستند [۱]. نانوالیاف الکترورسی شده برای بسته بندی مواد غذایی به دلیل چندین مزیت از جمله ساختار بهم پیوسته، نسبت سطح به حجم بزرگتر، و ویژگی‌های تخلخل بیشتر که باعث به تله افتادن ترکیبات زیست فعال بیشتر می‌شود، جذابیت بیشتری نسبت به فیلم‌ها برای بسته‌بندی مواد غذایی دارند [۱، ۲]. زئین، پروتئین ذرت، به عنوان یک پلیمر طبیعی و قابل بازیافت شناخته شده است. زئین یکی از پلیمرهای زیستی است که به دلیل خواصی مانند غیر سمی بودن، هزینه کم، آب‌گریزی و سازگاری برای ساخت نانوالیاف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این بیوپلیمر از نظر شیمیایی پایدار است و FDA زئین را به عنوان یک ترکیب ایمن برای کاربرد در مواد غذایی و دارویی تأیید نموده است. این پلیمر زیست تخریب پذیر را می‌توان برای تشکیل الیاف و انکپسول به روش الکترورسی استفاده نمود [۳].

الکترورسی یک روش ساده، انعطاف‌پذیر و کارآمد برای ساخت الیاف با قطر میکرون تا نانو می‌باشد. ویژگی‌های محلول پلیمری و شرایط فرایند، مورفولوژی و قطر الیاف الکترورسی شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴]. نانوالیاف الکترورسی را می‌توان با استفاده از ترکیبات زیست فعال مانند عوامل آنتی اکسیدانی یا ضد باکتریایی یا با بارگذاری تعداد زیادی از اجزای فعال زیستی مانند اسانس‌ها فعال کرد [۱، ۵، ۶]. اسانس اکالیپتوس می‌تواند فعالیت‌های ضد باکتری، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی را به نانوالیاف الکترورسی شده به دلیل وجود اکالیپتول یا سینئول القا کند [۷].

اکالیپتوس با نام علمی *Eucalyptus globulus* یکی از معروف‌ترین گیاهان دارویی است که از دیرباز اثرات

فیلیم‌ها توسط طلا (Sputter Coater- BAL-TEC, SCDOOS) پوشش داده شده و باتصویر برداری، مورفولوژی و اندازه قطر آن‌ها با استفاده از نرم افزار Image J مورد بررسی قرار خواهد گرفت [۱۰].

طیف سنجی تبدیل فور مادون قرمز (FTIR):

آنالیز شیمیایی به منظور بررسی واکنش شیمیایی بین زئین و اسانس اکالیپتوس و اسانس نعناع فلفلی بارگذاری شده بوسیله FTIR spectroscopy انجام خواهد گرفت [۱۱].

گرما سنجی وزنی (TGA)

پایداری حرارتی و رفتار تخریب حرارتی نانوالیاف با نرخ حرارت دهی ۱۰ درجه سانتیگراد بر دقیقه در فضای حاوی نیتروژن و در گستره دمایی ۲۵ تا ۷۵۰ درجه سانتیگراد بررسی می‌شود [۱۲].

پراش پرتو ایکس (XRD)

پراش پرتو ایکس (XRD) برای بررسی وضعیت فیزیکی اسانس و اسانس نعناع فلفلی در نانوالیاف الکترورسی شده زئین انجام می‌شود. الگوهای پراش XRD از طریق پراش سنج XMD-300 (Unisantis، آلمان)، با استفاده از تابش Cu Ka (1.54 Å) در محدوده $2\theta=4-40^\circ$ و زمان گام اسکن ۵۳ ثانیه به دست می‌آید [۱۳].

راندمان انکپسولاسیون

۱۰ میلی‌گرم از نانوالیاف های حاصل را در ۱۰ میلی لیتر اتانول در ظرف دربسته به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط و سپس توسط فیلتر صاف و جذب آن در ۲۸۲ نانومتر خوانده می‌شود. از روابط زیر برای محاسبه راندمان و میزان بارگیری اسانس استفاده می‌شود:

راندمان درون پوشانی = (مقدار اسانس اکالیپتوس و اسانس نعناع فلفلی درون پوشانی شده / مقدار اسانس اولیه) × ۱۰۰

هدف از این مطالعه طراحی یک ماده بسته بندی از پلیمر طبیعی زیست تخریب پذیر و زیست سازگار مانند زئین می‌باشد که دارای فعالیت ضد باکتریایی مناسب برای استفاده در سیستم‌های بسته بندی مواد غذایی باشد. لذا در این تحقیق جهت تقویت خاصیت ضد میکروبی نانوالیاف زئین، اسانس نعناع فلفلی همراه با اسانس اکالیپتوس در نانوالیاف زئین بارگذاری می‌شود. پس از تهیه بسته بندی فعال ضد میکروب، ویژگیهای بسته بندی فعال و اثرات ضد میکروبی آن علیه ایشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه می‌گردد.

۲- مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه

زئین ذرت (گرید Z3625) از شرکت سیگما-آلدریچ (مادرید، اسپانیا) خریداری گردید و به محض دریافت بدون تخلیص بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. اسید استیک گلاسیال با خلوص ۹۹/۷ درصد و هگزان از شرکت مرک (آلمان) تأمین شد. اسانس اکالیپتوس و نعناع فلفلی از شرکت طبیب دارو تهیه گردید. آب مقطر از آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل تهیه شد.

تهیه محلول پلیمری:

محلول پلیمر زئین از طریق حل نمودن مقدار مشخصی پودر زئین در اسید استیک و همزدن با استفاده مگنت استیرر در دمای اتاق، تهیه خواهد شد. اسانس نعناع فلفلی با درصدهای ۱۰، ۵ و ۲/۵، به محلول حاوی اسانس اکالیپتوس (۱۰٪) و زئین افزوده خواهد شد [۶].

فرآیند الکترورسی:

از روش الکترورسی تک محوره با استفاده از دستگاه موجود در آزمایشگاه الکترورسی دانشگاه زابل (مدل ES1000، شرکت فناوران نانومقیاس، ایران) استفاده شد [۳].

تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی (SEM):

ویژگی‌های ضد میکروبی

روش انتشار دیسک برای سنجش خواص ضد میکروبی نانوالیاف الکترورسی شده در برابر گونه‌های میکروبی از جمله باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و گرم منفی *اشریشیا کلی* که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد، بکار رفت. سوسپانسیون باکتری مطابق استاندارد نیم مک فارلند $10^8 \times 1/5$ CFU/mL در طول موج ۶۲۵ nm تهیه می‌شود. از سوسپانسیون باکتری، به وسیله سواب کشت انجام استریل برداشته و بر روی محیط کشت می‌شود. از نانوالیاف زئین حاوی مخلوط اسانس اکالیپتوس (غلظت ۱۰٪) و اسانس نعناع فلفلی (غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۵ و ۱۰٪) به وسیله پانچ استریل، و در کنار شعله دیسک‌هایی به قطر ۱۰ میلی‌متر تهیه شد. دیسک‌های تهیه شده از زئین فاقد اسانس نعناع فلفلی به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. سپس دیسک‌های تهیه شده به وسیله پنس استریل بر روی محیط کشت قرار داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت، اندازه قطر‌هاله عدم رشد به وسیله کولیس تعیین می‌شود [۶].

طرح آماری

آزمایشات در سه تکرار صورت می‌گیرد. آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ ($p < 0.05$) انجام شد. نتایج آزمون‌ها به صورت میانگین سه تکرار همراه با انحراف استاندارد ذکر گردید.

۳- نتایج و بحث

مورفولوژی نانوالیاف

تصاویر SEM حاصل از بارگذاری اسانس نعناع فلفلی در نانوالیاف زئین در شکل ۱ نشان داده شده است. این تصاویر توسط نرم افزار Image-J آنالیز شدند و میانگین قطر الیاف محاسبه شده است و نتایج در جدول ۱ درج شده است. همانطور که در تصاویر مشخص است، نانوالیاف با مورفولوژی مناسب، فاقد گویچه، یکدست و یکنواخت تشکیل شده‌اند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسانس نعناع فلفلی بر قابلیت الکترورسی محلول زئین و شکل نانوالیاف تأثیر نمی‌گذارد. با افزایش اسانس از ۰٪ به ۱۰٪ در محلول، قطر نانوالیاف زئین از ۲۰۰ nm به ۴۰۰ nm افزایش یافت (جدول ۱) که می‌توان آن را به هدایت الکتریکی محلول نسبت داد. با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی بار الکتریکی محلول کاهش می‌یابد. به طور کلی، با کاهش هدایت الکتریکی محلول، تراکم بار الکتریکی در فواره حاصل از محلول بیوپلمر برای الکترورسی کاهش یابد. تراکم کمتر بارهای الکتریکی، کشش فواره را می‌کاهش می‌دهد که به نوبه خود باعث افزایش قطر نانوالیاف می‌شود [۱۴-۱۶].

افشار و همکاران (۱۳۹۷) در مطالعه‌ای گزارش کردند که با افزودن اسانس نعناع به محلول کیتوزان-پروتئین گاودانه، هدایت الکتریکی کاهش یافته که دلیل آن غیریونی بودن ساختار اسانس نعناع است. نتایج حاصل از این تحقیق مشابه نتایج حاصل از مطالعات [۱۷، ۱۸] می‌باشد.

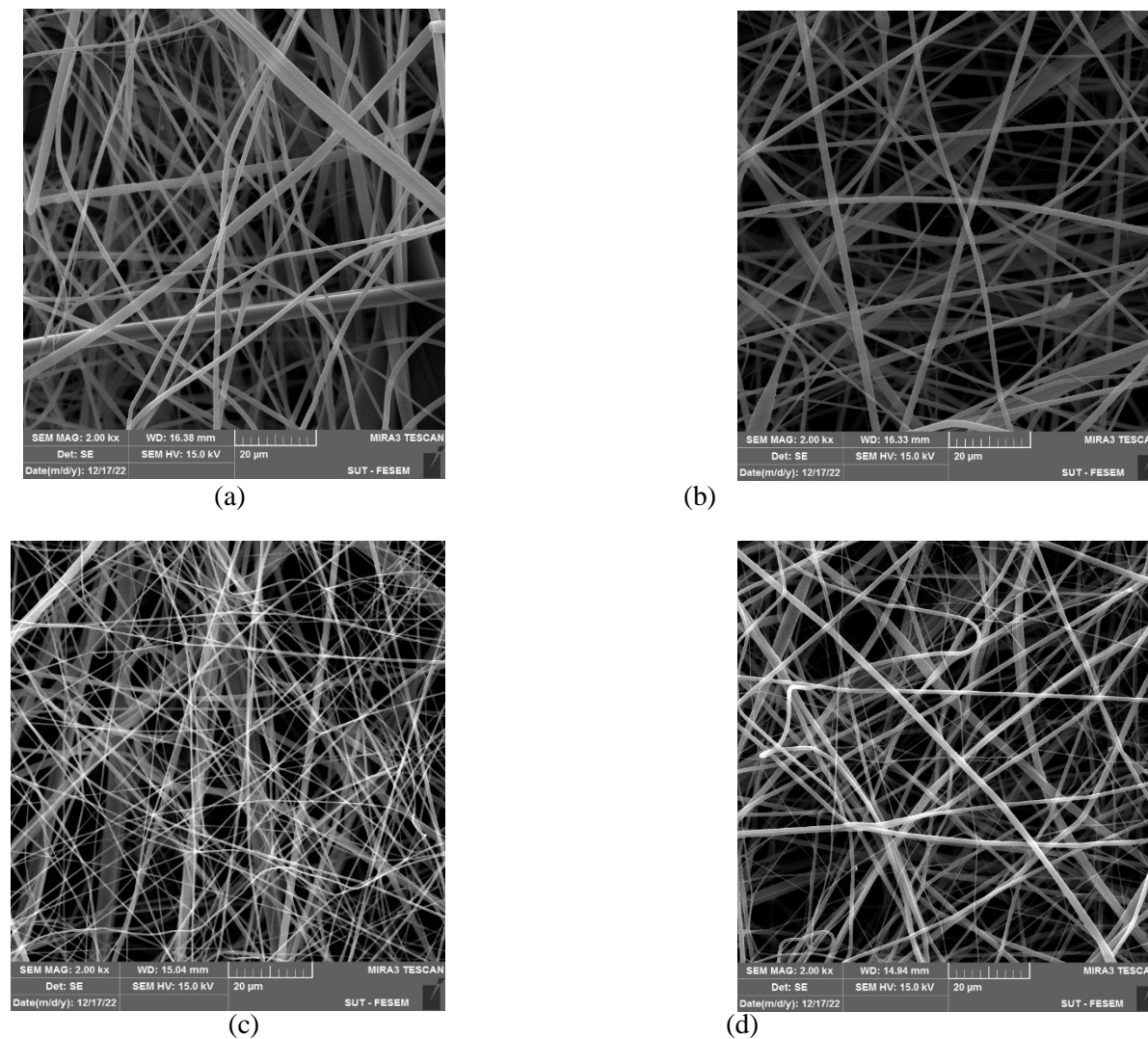


Figure 1 SEM images of eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0%, 2.5%, 5%, and 10% peppermint essential oil.

Table 1 Electrical conductivity and average diameter of eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with different concentration of peppermint essential oil*

Peppermint essential oil content (%)	Morphology	Electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Average fiber diameter (nm)
0	Fibers free of beads	25.8 ± 0.032	103.7 ± 19.3^a
2.5	Fibers free of beads	20.64 ± 0.1	104.6 ± 19.3^a
5	Fibers free of beads	18.34 ± 0.5	153.6 ± 19.3^b
10	Fibers free of beads	15.8 ± 0.87	193.9 ± 19.3^c

*Means bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm SD ($n=3$).

داده شده است. نوارهای کششی گروه‌های O-H از ترکیبات هیدروکسیله شده اسانس نعناع فلفلی در 3000 cm^{-1} با پیک‌های N-H پهن شده زئین همپوشانی دارند. نوار جذبی کششی O-H و N-H در 3318 cm^{-1} به ترتیب غلظت ۲/۵- تا ۱۰٪ به فرکانس‌های 3328 و 3315 cm^{-1} در الیاف الکترورسی شده جابجا شده‌اند. نوار جذبی کششی آمیدی I در 1658 cm^{-1} علاوه بر افزایش شدت، به فرکانس‌های 1655 و 1642 و 1657 cm^{-1} برای نانوالیاف زئین-اسانس با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد بترتیب جابجا شده‌اند. نوار جذبی کششی (پیک آمیدی II) در 1536 cm^{-1} تیزتر شده و به ترتیب برای نانوالیاف زئین-اسانس با غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ درصد به فرکانس‌های 1536 ، 1538 و 1538 cm^{-1} منتقل شده‌اند. تغییرات در طیف FTIR زئین، برهمکنش بین زئین و اسانس نعناع فلفلی را نشان می‌دهد. نتایج فوق بیانگر این هست که اسانس نعناع فلفلی با موفقیت در نانوالیاف زئین بارگذاری شده است [۱۱، ۱۹].

واکنش بین زئین و اسانس‌ها

طیف FTIR نمونه زئین (۰٪) در شکل ۲ نشان داده شده است. پیک‌های شاخص زئین در 3318 cm^{-1} (نوار کششی O-H, N-H) و 2933 cm^{-1} (نوار کششی C-H) مشاهده گردید. پیک‌های شاخص آمید I (گروه عاملی C=O) و آمید II (گروه N-H) در 1658 cm^{-1} و 1536 cm^{-1} مشاهده گردید [۱۹]. طیف FTIR اسانس نعناع فلفلی در شکل ۲، نشان داده شده است که شامل یک پیک ضعیف در 3476 cm^{-1} (پیوندهای O-H) می‌باشد. پیک‌های 2958 cm^{-1} و پیک‌های دیگری که به صورت شانه‌هایی در کنار آن مشاهده شد و پیک 1444 cm^{-1} به ترتیب متعلق به نوارهای کششی نامتقارن C-H، نوارهای کششی متقارن CH- و نوارهای خمشی C-H می‌باشد. پیک‌های قوی اسانس در 1752 cm^{-1} (نوارهای کششی C=O) به خاطر حضور استر‌هایی مانند متیل استات، 1675 cm^{-1} (نوارهای کششی C=O) به خاطر وجود کارون و پولگون، 1374 cm^{-1} (نوارهای خمشی CH_3)، 1219 cm^{-1} (نوارهای کششی جذبی C-O-C) مشاهده گردید [۲۰].

طیف FTIR الیاف الکترورسی شده زئین-اسانس نعناع فلفلی در غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰٪ در شکل ۲ نشان

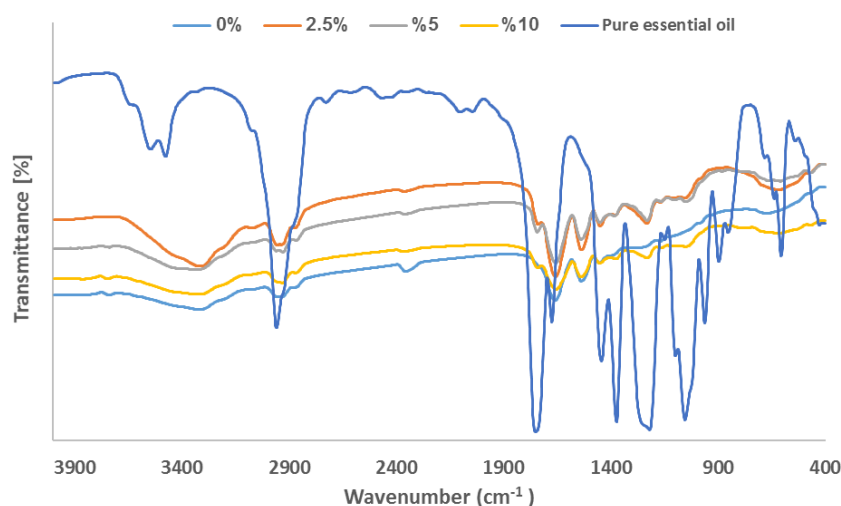


Figure 2. FTIR spectra of eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with different concentration of peppermint essential oil and pure peppermint essential oil.

آزمون XRD

جهت بررسی ساختار کریستالی نمونه های مورد بررسی از آزمون XRD استفاده شده و نتایج حاصل در شکل ۳ نشان داده شده است.

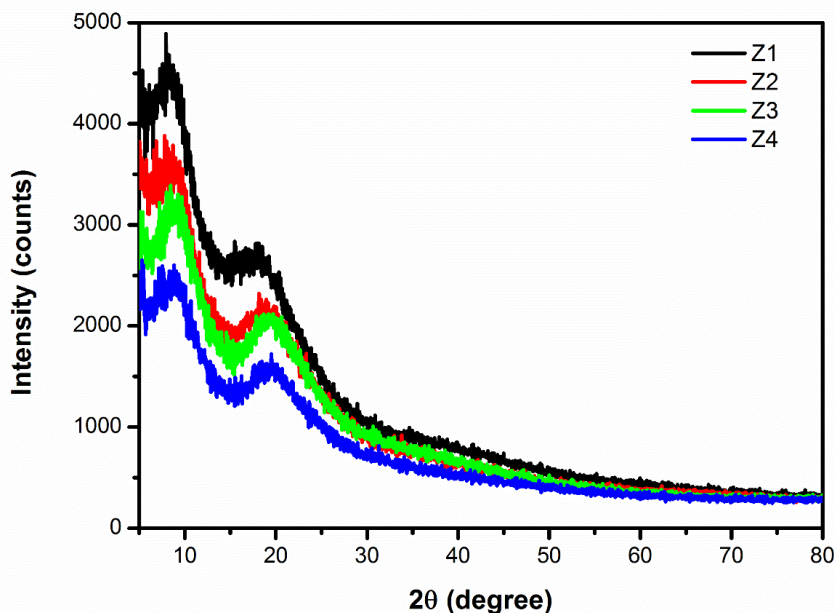


Figure 3. X-ray diffraction patterns of eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0% (Z1), 2.5% (Z2), 5% (Z3), and 10% (Z4) of peppermint essential oil.

ساختار غیر کریستالی (آمورف) ترکیبات موجود در اسانس، با افزایش غلظت این ترکیبات در نانوالیاف، شدت پیکها نسبت به نمونه زئین خالص کاهش یافته است. این کاهش شدت پیکهای زئین با افزودن فازهای آمورف به آن در مطالعات دیگری نیز مشاهده شده است [۲۴, ۲۵]. با این حال، نبود اثری از پیکهای مربوط به این ترکیبات بیانگر آن است که افزودن اسانس به زئین، منجر به تغییر ساختار کریستالی زئین نشده است.

تحلیل نتایج آزمون TGA

به منظور بررسی خواص حرارتی نمونه های مورد بررسی از آزمون TGA استفاده شده و نمودارهای TGA و DTG در شکل ۴ و مقادیر کاهش وزن مربوط به هر مرحله در جدول ۲ آورده شده است.

مطابق شکل ۱، در همه نمونه ها دو پیک قابل مشاهده است که در زوایای حدود ۹ درجه (با فاصله صفحات حدود ۱۰ آنگستروم) و ۱۹/۵ درجه (با فاصله صفحات حدود ۴/۵ آنگستروم) واقع شده و مربوط به ساختار زئین است که در مقالات دیگری نیز این پیک ها برای این ماده در همین زوایا شناسایی شده است [۲۱, ۲۲]. اعتقاد بر این است که فاصله صفحات مربوط به پیک اول مربوط به بسته های بین مارپیچی^۱ یا میانگین فاصله مارپیچ های همسایه است و فاصله صفحات پیک دوم مربوط به میانگین فاصله ساختارهای α -مارپیچ در استخوان بندی زئین است [۲۳]. مطابق این شکل شدیدترین پیک ها در بین این نمونه ها متعلق به نمونه زئین خالص است که بیانگر بلورینگی بیشتر این ماده نسبت به دیگر نمونه ها است. در واقع، با توجه به

1- Inter-helix packing

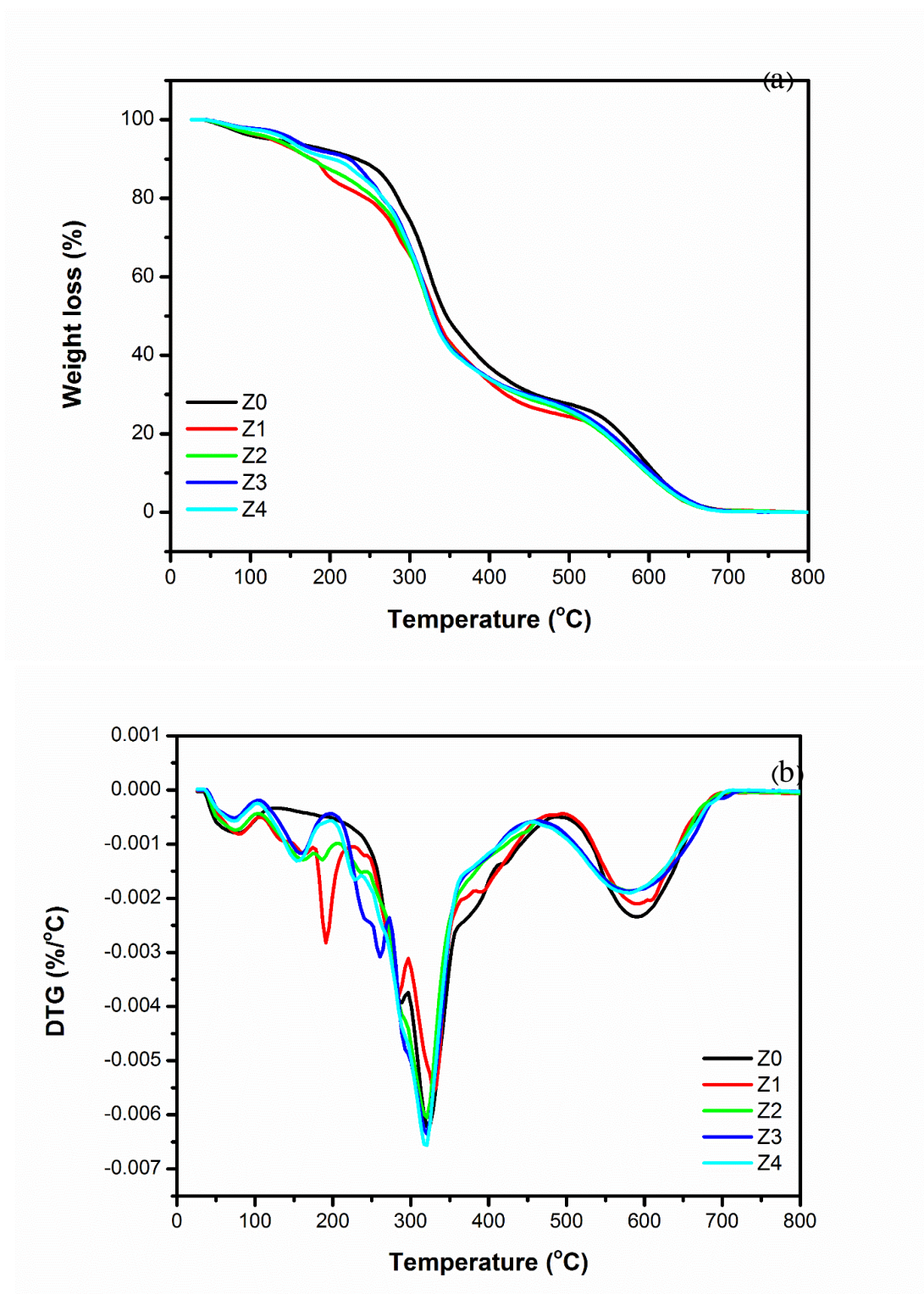


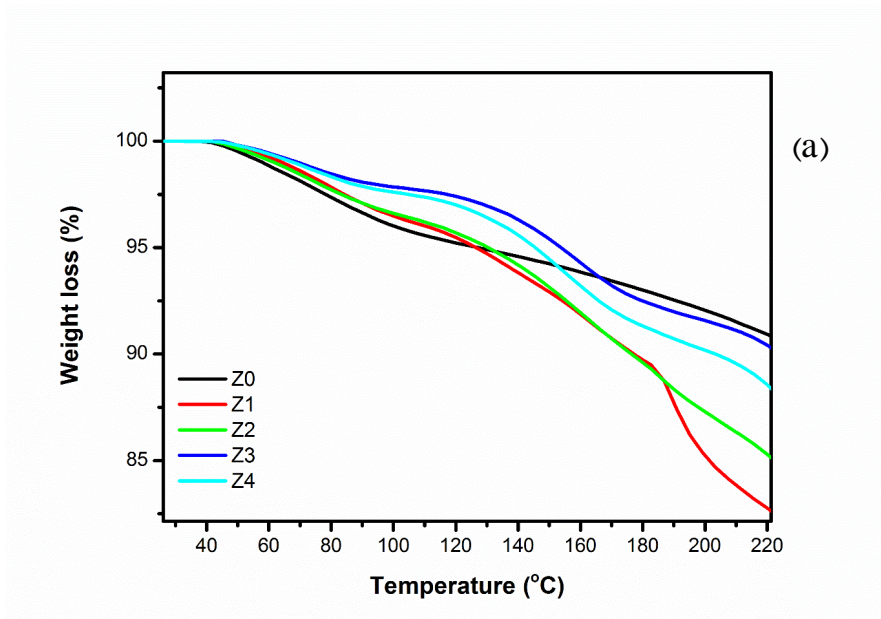
Figure 4. TGA (a), and DTG (b) of zein powder (Z0) and eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0% (Z1), 2.5% (Z2), 5% (Z3), and 10% (v/v) (Z4) of peppermint essential oil.

Table 2 Weight loss values related to each step for the samples

Sample	First step		Second step			Third step	
	25-110°C	110-180°C	180-220°C	220-270°C	270-300°C	300-500°C	500-800°C
Z0	4.49	2.44	2.14	5.64	11.27	46.55	27.47
Z1	4.05	6.09	8.07	6.86	10.53	40.08	24.32
Z2	3.87	6.37	4.44	7.93	11.7	40.51	25.18
Z3	2.35	5.08	2.13	11.1	11.89	41.01	26.44
Z4	2.27	5.91	2.82	9.45	12.53	41.26	25.7234

محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۲۰ درجه سانتی گراد نشان داده شده است.

به منظور بررسی دقیقتر هر مرحله کاهش وزن، در ادامه مراحل مختلف تغییرات وزنی به صورت مجزا در ترموگرام هایی نشان داده شده است. در شکل ۵ ترموگرام مربوط به



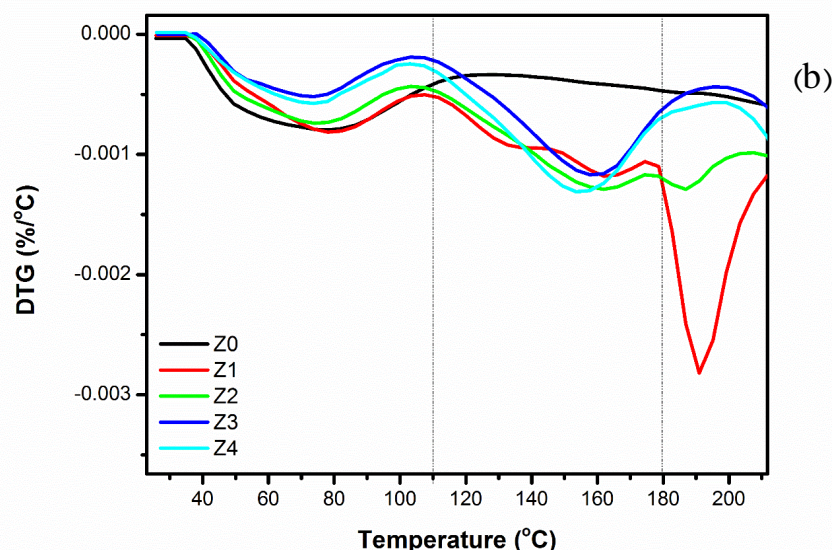


Figure 5. TGA (a), and DTG (b) of zein powder (Z0) and eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0% (Z1), 2.5% (Z2), 5% (Z3), and 10% (v/v) (Z4) of peppermint essential oil, in the range of 25-225 °C

در نمونه های الکترورسی شده و به خصوص نمونه های حاوی اسانس کاهش وزن بیشتری مشاهده می شود. این مرحله می تواند مربوط به مولکول های آبی باشد که با سطح وارد پیوند هیدروژنی شده است [۲۸] و بنابراین به دمای بالاتری نسبت به آب جذب سطحی برای تبخیر نیاز دارند. مطابق جدول ۲ مشخص است که مقدار این آب با افزایش غلظت اسانس بیشتر شده است که این به دلیل وجود ترکیبات قطبی در ترکیبات این ماده است که با آب پیوند هیدروژنی بر قرار نموده اند. در ناحیه سوم (محدوده دمایی ۱۸۰ تا ۲۲۰ درجه سانتی گراد) از این مرحله نیز تنها در نمونه Z1 و به مقدار کمتری نمونه Z2 پیک گرماگیر در نمودار DTG مشاهده می شود که این مورد می تواند مربوط به حلال مورد استفاده در مرحله الکترورسی مانند گلیسرول (با دمای تبخیر ۱۹۸ درجه سانتی گراد) باشد [۲۹] که با افزایش غلظت اسانس، این حلال کمتر در ساختار ماده باقی مانده و بنابراین پیک مربوط به آن تضعیف گردیده است.

مرحله بعدی کاهش وزن در محدوده ۲۲۰ تا ۵۰۰ درجه سانتی گراد نیز به تجزیه حرارتی آمینواسیدهایی با پایداری

مطابق شکل ۵ (a, b)، مرحله اول کاهش وزن در محدوده دمایی ۲۵ تا ۲۲۰ درجه سانتی گراد برای همه نمونه ها مربوط به تبخیر آب جذب سطحی، آب ساختاری و دیگر حلال های موجود در نمونه ها می باشد [۲۶, ۲۷]. مطابق این شکل در این مرحله، سه پیک گرماگیر مختلف در نواحی متفاوت قابل مشاهده است. پیک اول در محدوده دمایی ۲۵ تا ۱۱۰ درجه سانتی گراد مربوط به آب جذب سطحی است که برای تبخیر نیاز به حرارت دهی کمتری دارد. مطابق جدول ۲ بیشترین آب جذب سطحی مربوط به نمونه زئین پودری و پس از آن زئین الکترورسی شده خالص بوده است با افزودن غلظت اسانس در ساختار مقدار آب جذب سطحی کاهش یافته است. در واقع به نظر می رسد در نمونه های حاوی اسانس، ترکیبات موجود در این اسانس به جای مولکول های آب در ساختار ماده جایگزین شده و بنابراین آب کمتری در این نمونه ها وجود داشته است. در قسمت بعد از این مرحله و در محدوده ۱۱۰ تا ۱۸۰ درجه سانتی گراد نمونه پودری کاهش وزن بسیار اندکی داشته اما

وزن در هر محدوده در جدول ۲ گزارش شده است و ترموگرام های مربوط به این مرحله در شکل ۶ نشان داده شده است.

حرارتی پایین و ساختار پروتئینی اولیه زئین است [۳۰]. همچنین ترکیبات موجود در اسانس نیز در این محدوده دمایی تخریب می شود [۳۱]. در این مرحله کاهش وزن نیز سه محدوده مختلف قابل مشاهده است که مقدار کاهش

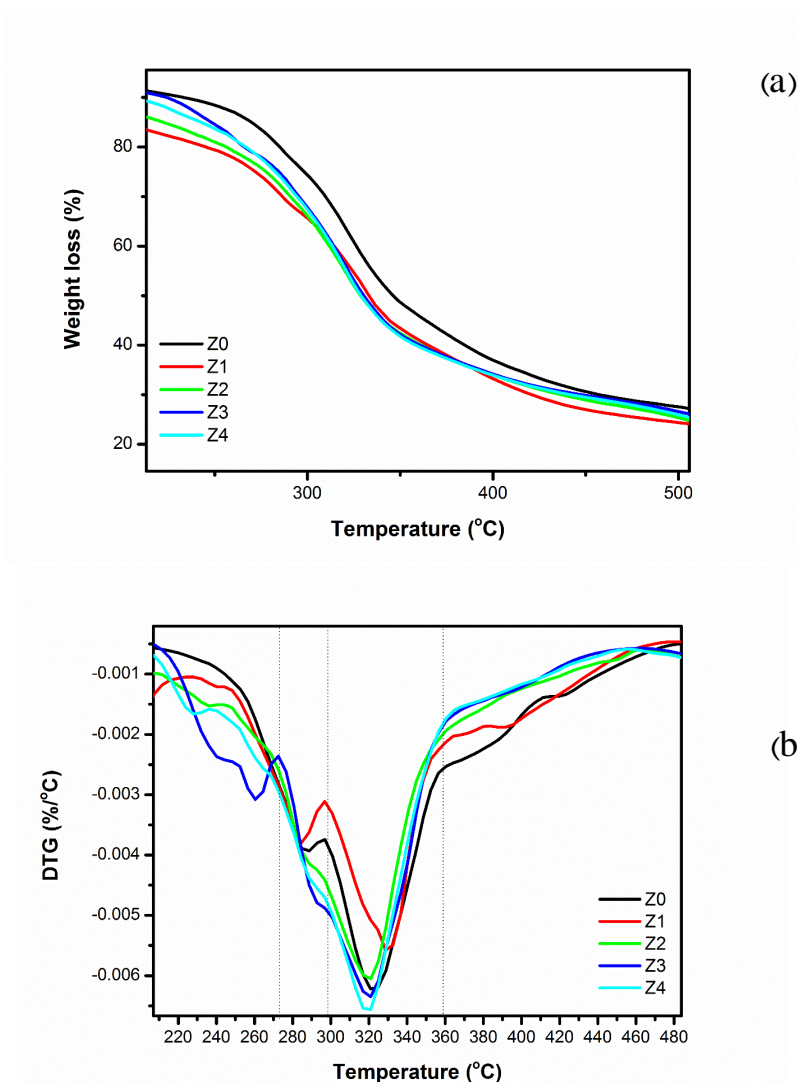


Figure 6. TGA (a), and DTG (b) of zein powder (Z0) and eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0% (Z1), 2.5% (Z2), 5% (Z3), and 10% (v/v) (Z4) of peppermint essential oil, in the range of 220-500 °C

اسانس تا نمونه Z3 مقدار این کاهش وزن نیز بیشتر شده و پس از آن در نمونه Z4 مقداری از این کاهش وزن، کاسته شده است. دلیل بیشتر بودن گروه های هیدروکسیلی در نمونه Z3 نسبت به نمونه Z4 نامشخص است و نیاز به بررسی بیشتری دارد. در محدوده دمایی ۲۷۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد نیز گروه های عاملی دیگری در ترکیب اسانس

مطابق شکل ۶ و جدول ۲، یک پیک گرماگیر در محدوده دمایی حدود ۲۲۰ تا ۲۷۰ درجه سانتی گراد در نمونه های حاوی اسانس قابل مشاهده است که مربوط به حذف گروه های هیدروکسیلی موجود در ترکیبات اسانس می باشد [۳۲]. از جدول ۲ مشخص است که با افزایش غلظت

است که این باعث افزایش مجدد کاهش وزن در نمونه های حاوی مقادیر بالاتر اسانس در این محدوده دمایی شده است.

مرحله پایانی کاهش وزن که به صورت یک پیک گرماگیر در محدوده دمایی ۵۰۰ تا ۸۰۰ درجه سانتی گراد مشخص است نیز مربوط به تجزیه حرارتی آمینو اسیدهایی با پایداری حرارتی بالا مانند گلايسين می باشد [۳۰]. این مرحله کاهش وزن نیز با بزرگنمایی بیشتر در ترموگرام های شکل ۷ نشان داده شده است.

حذف شده است که از آن جمله می توان به ترکیبات کربوکسیلی اشاره نمود [۳۳]. مطابق جدول ۲ در اینجا نیز مشاهده می شود که افزایش غلظت ترکیبات اسانس در ساختار باعث افزایش کاهش جرم در این محدوده حرارتی شده که دلیلی بر بیشتر بودن ترکیبات حاوی این گروه های عاملی در کامپوزیت ها دارای اسانس بیشتر است. در مرحله بعدی کاهش وزن نیز علاوه بر تجزیه حرارتی آمینواسیدهایی با پایداری حرارتی پایین و ساختار پروتئینی اولیه زئین، ترکیبات با پایداری حرارتی بالاتر در اسانس مانند استخوان بندی کربوهیدراتی این ماده نیز تجزیه شده

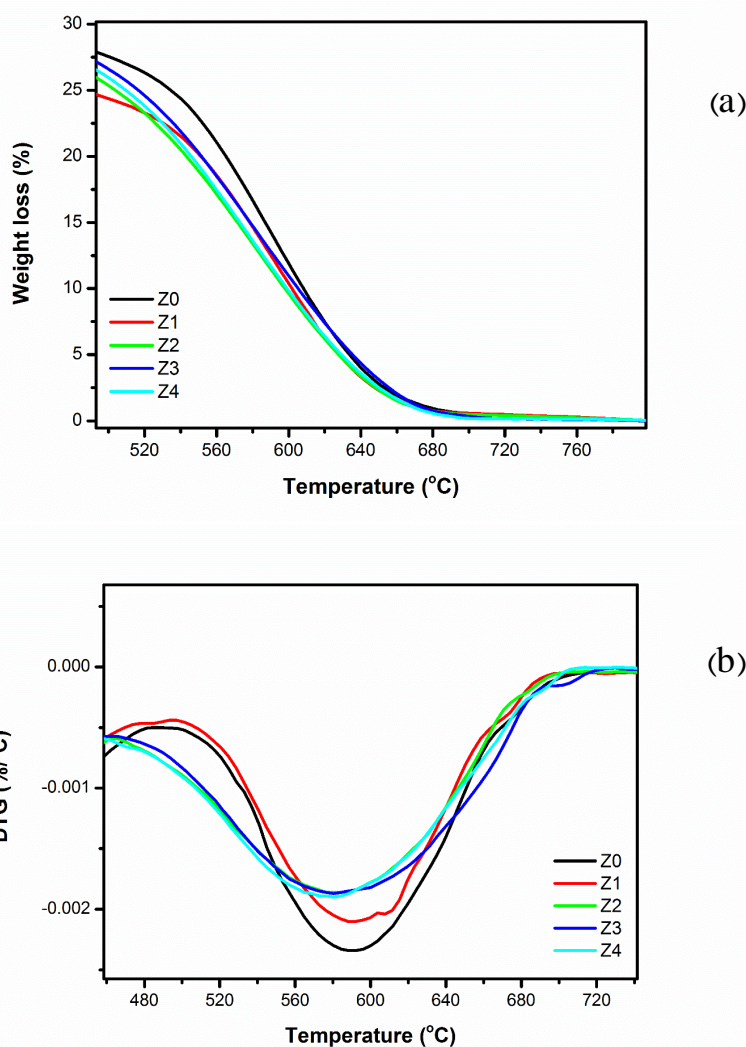


Figure 7. TGA (a), and DTG (b) of zein powder (Z0) and eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with 0% (Z1), 2.5% (Z2), 5% (Z3), and 10% (v/v) (Z4) of peppermint essential oil, in the range of 500-750 °C

مطابق شکل ۷ و جدول ۲ مشخص است که کاهش وزن در این محدوده دمایی در نمونه های فاقد ترکیبات اسانس (نمونه های Z0 و Z1) از نمونه های حاوی این ترکیبات بیشتر بوده است که این به دلیل تجزیه شدن کامل ترکیبات اسانس در محدوده حرارتی کمتر از ۵۰۰ درجه سانتی گراد می باشد و بنابراین تنها ترکیبات باقی مانده، آمینو اسیدهایی با پایداری حرارتی بالا در ساختار زئین است. به علاوه از شکل ۷(a) نیز مشخص است که در دمای ۸۰۰ درجه سانتی گراد، تمامی ترکیبات در همه نمونه ها تجزیه حرارتی شده و تقریباً هیچ ترکیبی به صورت خاکستر باقی نمانده است و وزن باقی مانده در تمامی نمونه ها نزدیک به صفر بوده است.

راندمان انکپسولاسیون

تعیین راندمان یکی از پارامترهای مهم در فناوری انکپسولاسیون است که عبارت است از کارایی نانوالیاف در به دام انداختن اسانس. در این کار، راندمان انکپسولاسیون اسانس نعناع فلفلی در نانوالیاف زئین تقریباً ۹۷ درصد برای تمام سطوح اسانس انکپسوله شده بود. نتایج این تحقیق مطابق نتایج تحقیقات نثو و همکاران (۲۰۱۳)، یلمائیز و همکاران (۲۰۱۹)، قائمپور و مرتضوی (۲۰۱۴) می باشد. نثو و همکاران (۲۰۱۳) راندمان ۱۰۰ درصد انکپسولاسیون اسید گالیک در الیاف الکترورسی شده زئین را گزارش کرد. قائمپور و مرتضوی (۲۰۱۴) اسانس نعناع فلفلی را به روش الکتروپاشش در نانوذرات آلژینات سدیم انکپسوله نموده و راندمان ۹۶ درصد را گزارش نمودند. یلمائیز و همکاران (۲۰۱۹) راندمان ۹۸ درصد را برای انکپسولاسیون اسانس نعناع فلفلی گزارش نموده است.

خواص ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی الیاف الکترورسی شده نقش مهمی در کاربردهای غذایی آنها دارد. نتایج حاصل از تحقق قبلی (رحتی نیا و همکاران، ۱۴۰۱) نشان داد که نانوالیاف حاوی اسانس اکالیپتوس فعالیت ضد میکروبی قوی ندارد. به همین

دلیل جهت تقویت فعالیت ضد میکروبی آن، اسانس نعناع فلفلی در غلظت های مختلف در نانوالیاف حاوی ۱۰٪ اسانس اکالیپتوس (که بیشترین خاصیت ضد میکروبی را دارا بوده) بارگذاری شد. بدین ترتیب فعالیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی بارگذاری شده در نانوالیاف زئین حاوی اسانس اکالیپتوس در برابر *S. aureus* (ATCC 29737)، *E. coli* (ATCC 25922) به روش انتشار دیسک ارزیابی شد. قطر هاله عدم رشد در جدول ۳ نشان داده شد. نتایج نشان می دهد که نانوالیاف بارگذاری شده با اسانس نعناع فلفلی و اسانس اکالیپتوس فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری گرم مثبت (*S. aureus*) و باکتری گرم منفی (*E. coli*) دارند. با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی قطر هاله عدم رشد باکتری نیز افزایش می یابد. نانوالیاف زئین با غلظت های ۰، ۲/۵، ۵، و ۱۰ درصد اسانس نعناع فلفلی در آزمون میکروبی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب دارای ۱۳، ۱۶، ۱۸ و ۲۰ میلی متر قطر هاله عدم رشد می باشد. همچنین، در برابر باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب دارای ۱۴، ۱۵/۵، ۱۷/۶، و ۱۹/۵ میلی متر قطر هاله عدم رشد می باشد. مطالعه دیگری که توسط دباغ مقدم و همکاران (۲۰۱۹) صورت گرفت، نشان می دهد که نانوالیاف زئین بارگذاری شده با ۳٪ اسانس آویشن شیرازی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* با قطر هاله عدم رشد ۲/۲۵ mm، فعالیت ضد باکتریایی نشان می دهند [۲۷].

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت اسانس نعناع فلفلی از ۲/۵ به ۱۰ درصد قطر هاله عدم رشد افزایش یافت (جدول ۳). نتایج نشان دهنده تاثیر تقویت کنندگی دو اسانس مذکور بر خاصیت ضد میکروبی یکدیگر دارد. فعالیت ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی احتمالاً به مقدار زیاد منتول (۴۲٪) و منتون (۱۸٪) نسبت داده می شود. در کل سازوکار اسانس ها در برابر میکروارگانیسم ها می تواند بواسطه تخریب دیواره سلول، واکنش با پروتئین های غشا،

ها در این محصولات شیوع بالایی گوشتی، زیرا این باکتری دارند.

تخریب غشای سیتوپلاسمی افزایش نفوذپذیری سلول، نشت محتوای سلول باشد [۲۸، ۲۹، ۳۰]. بر طبق نتایج مربوط به فعالیت ضد باکتریایی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی می توان از نانوالیاف بارگذاری شده زئین به وسیله اسانس اکالیپتوس و نعناع فلفلی به عنوان ای از فرآورده های غذایی بسته بندی فعال در طیف گسترده استفاده کرد، از جمله برای بسته بندی فرآورده های لبنی و

Table 3 Average diameter of bacteria inhibition zone for eucalyptus/zein electrospun fibers loaded with different concentrations of peppermint essential oil. *

Peppermint essential oil content (%)	Diameter of inhibition zone (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
0	13.0±0.0 ^d	14.0±0.0 ^d
2.5	16.0±0.0 ^e	15.5±0.0 ^e
5	18 ± 0.8 ^b	17.6 ± 0.6 ^b
10	20 ± 1.6 ^a	19.5±0.3 ^a

* Means bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Results are presented as mean \pm SD (n=3).

داد که اسانس زیره بر ساختار ثانویه زئین تأثیر می گذارد. راندمان انکپسولاسیون بالا برای همه نمونه ها به دست آمد. نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد که الیاف حاوی اسانس دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی است. نتایج نشان دهنده تاثیر تقویت کنندگی دو اسانس مذکور بر خاصیت ضد میکروبی یکدیگر دارد. با توجه به نتایج این کار، الیاف حاوی مخلوط اسانس اکالیپتوس و نعناع فلفلی را می توان به عنوان یک بسته بندی فعال در نظر گرفت.

۵- قدردانی

نویسندگان از دانشگاه زابل به خاطر حمایت مالی (IR-UOZ-GR-4249) در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می نمایند.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه، مخلوط اسانس اکالیپتوس و نعناع فلفلی برای اولین بار در الیاف الکترورسی شده انکپسوله شد. پروتئین زئین به عنوان ماتریس استفاده شد. نتایج نشان داد که بارگیری اسانس تأثیری بر مورفولوژی الیاف الکترورسی شده زئین ندارد. همانطور که انتظار می رفت با افزایش غلظت اسانس، قطر الیاف الکترورسی شده، افزایش یافت. تصاویر SEM، مورفولوژی لوله ای الیاف الکترورسی شده را نشان می دهد. نتایج XRD نشان داد که افزودن اسانس به زئین، تغییری در ساختار فیزیکی زئین ایجاد نکرده است. ترموگرام TGA نشان داد که اسانس باعث افزایش پایداری حرارتی الیاف می شود. طیف FTIR نشان داد که بین اسانس و زئین برهمکنش وجود دارد، طیف FTIR نشان

۶- منابع

- [1] Aman Mohammadi M, Ramezani S, Hosseini H, et al (2021) Electrospun Antibacterial and Antioxidant Zein/Polylactic Acid/Hydroxypropyl Methylcellulose Nanofibers as an Active Food Packaging System. *Food Bioprocess Technol.* 14:1529–1541
- [2] Jiang S, Chen Y, Duan G, et al (2018) Electrospun nanofiber reinforced composites: a review. *Polym Chem* 9:2685–2720. <https://doi.org/10.1039/C8PY00378E>
- [3] Ghasemi M, Miri MA, Najafi MA, et al (2022) Encapsulation of Cumin essential oil in zein electrospun fibers: Characterization and antibacterial effect. *J Food Meas Charact.* <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01268-z>
- [4] Miri MA, Ghorani B, Miri HR (2019) Electroencapsulation: Fundamentals and applications in food industry. *JFST* 16:1–21
- [5] Antunes MD, da Silva Dannenberg G, Fiorentini AM, et al (2017) Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex. *Int J Biol Macromol* 104:874–882. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.095>
- [6] Hosseini F, Miri MA, Najafi M, et al (2021) Encapsulation of rosemary essential oil in zein by electrospinning technique. *J Food Sci* 64:1750–3841.15876. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15876>
- [7] Rahmatinia N, Aran M, Miri MA, Ramezan D (2022) Electrospun zein nanofibers as a nanocarrier of Eucalyptus essential oil: Characterization, and antimicrobial properties. *Food Sci Technol* 18:81–91. <https://doi.org/10.52547/fsct.18.121.7>
- [8] Beyki M, Zhavah S, Khalili ST, et al (2014) Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan-cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Ind. Crops Prod.* 54:310–319
- [9] Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee AR, et al (2018) Evaluation antioxidant activity, phytochemical constituents and antimicrobial of Mentha Piperita essential oil on some infectious and poisonous microorganisms. *Food Sci Technol [Persian]* 15:67–76
- [10] Aghaei Z, Ghorani B, Emadzadeh B, et al (2020) Protein-based halochromic electrospun nanosensor for monitoring trout fish freshness. *Food Control* 111:107065. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107065>
- [11] Iranmanesh S, Aran M, Miri MA, Pirnia M (2022) Preparation and Characterization of Zein Electrospun Fibers for Nano Encapsulation of Ajowan (*Trachyspermum copticum* L.) Essential Oil. *J Essent Oil-Bearing Plants* 25:219–233. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2022.2068970>
- [12] Rezaei M, Aran M, Amani AM, et al (2021) Use of electrospun chitosan nanofibers as nanocarriers of *Artemisia sieberi* extract: Evaluation of properties and antimicrobial effects. *J Food Sci Technol* 18:323–334. <https://doi.org/10.29252/fsct.18.03.27>
- [13] Yao ZC, Chang MW, Ahmad Z, Li JS (2016) Encapsulation of rose hip seed oil into fibrous zein films for ambient and on demand food preservation via coaxial electrospinning. *J. Food Eng.* 191:115–123
- [14] Ramakrishna S, Fujihara K, Teo WE, et al (2005) An introduction to electrospinning and nanofibers
- [15] Tan SH, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S (2005) Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer (Guildf)*. 46:6128–6134
- [16] Nayak R, Padhye R, Kyrtzis IL, et al (2013) Effect of viscosity and electrical conductivity on the morphology and fiber diameter in melt electrospinning of polypropylene. *Text Res J* 83:606–617. <https://doi.org/10.1177/0040517512458347>
- [17] Ardekani NT, Khorram M, Zomorodian K, et al (2019) Evaluation of electrospun poly (vinyl alcohol)-based nanofiber mats incorporated with *Zataria multiflora* essential oil as potential wound dressing. *Int J Biol Macromol* 125:743–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.085>
- [18] Teilaghi S, Movaffagh J, Bayat Z (2020) Preparation as Well as Evaluation of the Nanofiber Membrane Loaded with *Nigella sativa* Extract Using the Electrospinning Method. *J Polym Environ* 28:1614–1625. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01700-3>
- [19] Bumedi F, Aran M, Miri MA, Seyedabadi E (2023) Preparation and characterization of zein electrospun fibers loaded with savory

- essential oil for fruit preservation. *Ind Crop Prod* 203:..
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117121> Received
- [20] Yilmaztekin M, Lević S, Kalušević A, et al (2019) Characterisation of peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil encapsulates. *J Microencapsul* 36:109–119.
<https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1607596>
- [21] Ullah S, Hashmi M, Khan MQ, et al (2019) Silver sulfadiazine loaded zein nanofiber mats as a novel wound dressing. *RSC Adv* 9:268–277.
<https://doi.org/10.1039/C8RA09082C>
- [22] Yang SB, Rabbani MM, Ji BC, Han D (2016) Optimum Conditions for the Fabrication of Zein / Ag Composite Nanoparticles from Ethanol / H₂O Co-Solvents Using Electrospinning. *Nanomaterials* 6:1–11.
<https://doi.org/10.3390/nano6120230>
- [23] Oliviero, M., Di Maio, E., & Iannace, S. (2010). Effect of molecular structure on film blowing ability of thermoplastic zein. *Journal of Applied Polymer Science*, 115,(1), pp. 277–287. <https://doi.org/10.1002/app.31116>
- [24] Feng Y, Lee Y (2017) Microfluidic fabrication of hollow protein microcapsules for rate-controlled release. *RSC Adv* 7:49455–49462
- [25] Xu Q, Bai Z, Ma J, et al (2021) Effect of different drying methods on zein-based microcapsules loaded with *Artemisia argyris* essence obtained by anti-solvent precipitation. *J Appl Polym Sci* 138:50921.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/app.50921>
- [26] Roshanghias A, Sodeifian G, Javidparvar AA, Tarashi S (2022) Construction of a novel polytetrafluoroethylene-based sealant paste: The effect of polyvinyl butyral (PVB) and nano-alumina on the sealing performance and construction formulations. *Results Eng* 14:100460.
<https://doi.org/10.1016/J.RINENG.2022.100460>
- [27] Javidparvar AA, Naderi R, Ramezanzadeh B (2019) Epoxy-polyamide nanocomposite coating with graphene oxide as cerium nanocontainer generating effective dual active/barrier corrosion protection. *Compos Part B Eng* 172:..
<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.05.055>
- [28] Ferreira-Villadiego J, García-Echeverri J, Vidal M V, et al (2018) Chemical Modification and Characterization of Starch Derived from Plantain (*Musa paradisiaca*) Peel Waste, as a Source of Biodegradable Material. In: *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*
- [29] Meyer N, Rivera LR, Ellis T, et al (2018) Bioactive and Antibacterial Coatings Based on Zein/Bioactive Glass Composites by Electrophoretic Deposition. *Coatings* 8
- [30] De Figueredo GP, De Carvalho AFM, De Araújo Medeiros RLB, et al (2017) Synthesis of MgAl₂O₄ by Gelatin Method: Effect of Temperature and Time of Calcination in Crystalline Structure. *Mater Res* 20:254–259.
<https://doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2017-0105>
- [31] Akbarzadeh S, Ramezanzadeh M, Ramezanzadeh B, Bahlakeh G (2020) A green assisted route for the fabrication of a high-efficiency self-healing anti-corrosion coating through graphene oxide nanoplateform reduction by *Tamarindus indica* extract. *J Hazard Mater* 390:122147.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122147>
- [32] Javidparvar AA, Naderi R, Ramezanzadeh B (2020) L-cysteine reduced/functionalized graphene oxide application as a smart/control release nanocarrier of sustainable cerium ions for epoxy coating anti-corrosion properties improvement. *J Hazard Mater* 389:122135.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122135>
- [33] Aliyev E, Filiz V, Khan MM, et al (2019) Structural Characterization of Graphene Oxide: Surface Functional Groups and Fractionated Oxidative Debris. *Nanomaterials* 9:1180.
<https://doi.org/10.3390/nano9081180>



Fabrication of active packaging using eucalyptus and peppermint essential oil by electrospinning technique: study the characterization and antibacterial properties

Zahra Sargazi¹, Mohammad Amin Miri*², Mohammadali Najafi³

- 1- M.Sc. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
- 2- Department of Food Science and Technology, University of Zabol, Zabol, Iran; Electrospinning Laboratory, University of Zabol, Zabol, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

ABSTRACT

The purpose of this research is to strengthen the antimicrobial properties of active nanofibers containing eucalyptus essential oil by using different concentrations of peppermint essential oil for use as active packaging. Nanofibers containing a mixture of eucalyptus essential oil (10%) and peppermint essential oil (concentrations of 0, 2.5, 5, 10% (v/v)) were produced. SEM and Image-J results showed that the loading of essential oil increased the diameter of electrospun fibers from 200 to 400 nm. SEM images showed that the morphology of electrospun fibers is tubular. XRD was used to study the physical structure of electrospun fibers and XRD diffractograms show that adding essential oil to zein did not change the crystalline structure of zein. TGA thermograms showed that the loading of essential oil increased the thermal stability of electrospun fibers. FTIR spectrum shows the interaction between electrospun fibers and the essential oil. Antibacterial test was done by disc diffusion method and the results showed that the fibrous coating containing essential oil prevented the growth of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli*. According to the results of this research, fibers containing a mixture of eucalyptus and peppermint essential oils can be considered as an active packaging for use in packaging different food products such as cheese, meat and some other food products.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/6/20
Accepted: 2023/9/2

Keywords:

Mixture of essential oils,
Electrospinning,
Zein,
Antimicrobial properties

DOI: 10.22034/FSCT.20.143.91

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.143.7.9

*Corresponding Author E-Mail:
ma.miri@uoz.ac.ir