

تهیه و بررسی اثر عصاره پنیرباد بر خواص فیزیکوشیمیایی، مکانیکی و ضدمیکروبی فیلم خوراکی نشاسته ساگو

شراره لشکریزاده بمی^{1*}، حمید سرحدی^{1*}، عبدالواحد صفرزاده¹

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

(تاریخ دریافت: 98/12/22 تاریخ پذیرش: 99/02/13)

چکیده

امروزه مطالعات متعددی به منظور توسعه بیوپلیمرهای جدید از منابع زیست تجزیه‌پذیر در حال انجام است. در این پژوهش، فیلمبسته‌بندی فعال برپایه نشاسته ساگو حاوی غلاظت‌های مختلف (1، 1/5 و 2 برابر حداقل غلاظت ممانعت کننده رشد) عصاره پنیرباد تهیه گردید. حداقل غلاظت ممانعت کننده‌رشد و حداقل غلاظت باکتری کشی عصاره‌ها ارزیابی شد. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی (مانند ضخامت، ظرفیت جذب آب، حلالیت در آب، نفوذپذیری به بخار آب، نفوذپذیری به اکسیژن و زاویه تماس)، مکانیکی (مقاومت کششی، ازدیاد طول تا نقطه شکست و مدول الاستیستیه) و آنتی‌اکسیدانی فیلم مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین فعالیت ضدمیکروبی فیلم بر روی دو باکتری پاتوژن اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس ارئوس توسط آزمون دیسک بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش غلاظت عصاره پنیرباد سبب افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) بر روی ضخامت، حلالیت در آب، نفوذپذیری به بخار آب، نفوذپذیری به اکسیژن و زاویه تماس فیلم گردید اما اثری بر ظرفیت جذب آب نداشت. عصاره پنیرباد سبب جذب نور در منطقه مرئی شد که این امر منجر به افزایش پارامترهای رنگی^a و^b شد اما شاخص^{L*} کاهش یافت. افزایش در محتوای عصاره به دلیل اثر پلاستی سایززی سبب کاهش مقاومت کششی و مدول یانگ و در سوی مقابل سبب افزایش میزان ازدیاد طول تا نقطه شکست گردید. فیلم ساگو حاوی غلاظت‌های بالای عصاره پنیرباد بر روی مهار رشد هر دو گونه باکتری تاثیر موفق داشت و تاثیر آن بر باکتری گرم مثبت بیشتر بود. همچنین فیلم ساگو حاوی عصاره پنیرباد، فعالیت مهار رادیکال DPPH خوبی را نشان داد. این نتایج بیانگر آن بود که فیلم فعال نشاسته ساگو حاوی عصاره پنیرباد می‌تواند کاربردهای بسته‌بندی غذایی مختلفی داشته باشد.

کلید واژگان: فیلم خوراکی، نشاسته ساگو، عصاره پنیرباد، خصوصیات فیزیکوشیمیایی

*مسئول مکاتبات: sarhadi@iaubam.ac.ir

میکروارگانیسم‌ها و جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی بسیار مورد توجه صنعتگران امر غذا قرار گرفته است. از جمله ترکیبات نگهدارنده طبیعی با ویژگی ضدمیکروبی می‌توان به انسان‌ها و عصاره‌های گیاهی اشاره نمود [1].

گیاه پنیرباد³ متعلق به خانواده سولاناسه⁴ بوده و به صورت وسیع در پزشکی آیورودا⁵ (یک سیستم سنتی پزشکی در هند و نپال) مورد استفاده قرار می‌گیرد [4]. این گیاه در علم پزشکی دارای مزایای متعددی از جمله ویژگی ضد التهاب، ضدسرطان، ضد استرس و آنتی اکسیدان می‌باشد [5]. همچنین مطالعات نشان داده است که این گیاه دارای فعالیت ضدمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های سالمونولا تیفیموریوم⁶ [6]، استافیلکوکوس ارئوس⁷ [7] و اشريشیاکلی⁸ [7] می‌باشد. پنیرباد گیاهی دارویی است که از لحاظ گیاه‌شناسی به صورت گیاهی پایا، درختچه‌ای، دارای بوته‌هایی خودرو به ارتفاع 30 تا 100 سانتی‌متر در پاکستان و همچنین جنوب غربی هند و افغانستان رشد می‌کند. پراکنش این گیاه در ایران محدود به منطقه بلوجستان در استان پهناور سیستان و بلوجستان می‌باشد و عمدها در رویشگاه‌های شهرستان‌های ایرانشهر، سراوان و خاش مشاهده می‌شود. خواص درمانی و اثرات فارماکولوژیک این گیاه شامل خواص آرامش‌بخش، تقویت کننده و تنظیم کننده فعالیت هورمون‌های رحم می‌باشد [4]. از این‌رو، استفاده از عصاره این گیاه به عنوان یک ترکیب ضدمیکروب و دارای خواص آنتی اکسیدان قوی می‌تواند نقش مهمی در تولید پوشش‌های خوراکی فعال داشته باشد.

تولید و کاربرد فیلم‌های فعال در سالیان اخیر روندی رو به رشد داشته است. به عنوان مثال سالاریاشی و همکاران (2014) موفق به تولید فیلم فعال با منشا پلی‌ساقاراید محلول سویا و دو انسان آویشن شیرازی و نعناع شدند [2]. همچنین حیدری مجید و همکاران (2019) به بررسی اثر دو انسان آویشن شیرازی و نعناع فلغی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلی‌لactیک اسید

3. *Withania Somnifera*

4. *Solanaceae*

5. *Ayurveda*

6. *Salmonella typhimurium*

7. *Staphylococcus aureus*

8. *Escherichia coli*

1- مقدمه

آلودگی محیط زیست یکی از بزرگترین مشکلات چند دهه اخیر است به گونه‌ای که از بزرگترین منابع آلوده کننده آن می‌توان به زباله‌های حاصل از بسته‌بندی مواد غذایی اشاره نمود. بسته‌بندی‌های معمول مواد غذایی اغلب از ترکیبات سنتز شده از مواد نفتی تولید شده‌اند که سال‌های متمادی برای تجزیه آنها در طبیعت وقت لازم است. برای حل این مشکل، صنعتگران مواد غذایی به این فکر افتادند که پوشش‌هایی با سرعت تجزیه بالا تولید نمایند. از این‌رو، موضوع بیو‌پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر مطرح شد و تحقیقات زیادی به منظور ساخت و توسعه آن صورت گرفت [1].

بیوپلیمر یک پلیمر طبیعی است و بیوپلیمر زیست تخریب‌پذیر به پلیمری طبیعی اطلاق می‌گردد که بتواند توسط میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت تجزیه شود و به محصولات طبیعی مثل آب، دی‌اکسیدکربن و غیره تبدیل گردد. بیوپلیمرها از ترکیبات مختلفی مانند پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و غیره تولید می‌گردند [2]. در میان بیوپلیمرهای مختلف، نشاسته ساگو یکی از منابع زیست تجزیه‌پذیر می‌باشد که به تازگی جایگاه ویژه‌ای را در ساخت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به خود اختصاص داده است.

نخل ساگو متعلق به جنس متroxylon¹ و خانواده پالمائه² می‌باشد که به صورت موفقیت‌آمیز در کشورهای جنوب شرق آسیا کشت می‌گردد. نشاسته ساگو ماده‌ای نسبتاً ارزان بوده که از درخت نخل ساگو استخراج می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که از درخت بالغ نخل ساگو، سالانه حدود 550-100 کیلوگرم آرد ساگو تولید می‌گردد و همچنین تخمین زده می‌شود که سالانه حدود شصت میلیون تن نشاسته ساگو از این درخت در کشورهای جنوب شرق آسیا تولید گردد [3].

در سالیان اخیر، کاربرد پوشش‌های خوراکی حاوی ترکیبات نگهدارنده طبیعی به منظور به تاخیر انداختن رشد

1. Metroxylon

2. Palmae

بودند. معرف فولین سیوکالچر، اسید گالیک، کربنات سدیم بدون آب (Na_2CO_3)، اتانول، کلرید کلسیم، نیترات کلسیم، قرص رینگر و محیط‌های کشت نوترینت آگار²، مولر هیتون آگار³ و مولر هیتون براث⁴ از کمپانی مرک آلمان و 2-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، پلاستی‌سایزر‌گلیسرول و تؤین 80 از کمپانی سیگما آلمان خریداری شده بودند. نشاسته ساگو با رطوبت 12 درصد از شرکت سیم⁵ مالزی و سویه‌های میکروبی شامل اشرشیاکلی (ATCC 25922)، باسیلوسیرئوس (ATCC 25923) و (ATCC 11778)، استافیلکوکوساورئوس (ATCC 27853) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیده بودند.

2-2- روش‌ها

1-2-2 استخراج عصاره

برگ‌های گیاه پنیرباداز ارتفاعات کوه خضر در فاصله‌ی 30 کیلومتری شمال غرب منطقه بزمان واقع در شهرستان ایرانشهر از توابع استان سیستان و بلوچستان (شکل 1) جمع آوری و به مدت 48 ساعت در سایه و در دمای محیط خشک گردیدند و پس از آسیاب از الکی با مش 100 به منظور ایجاد ذرات هم اندازه عبور داده شدند. پودر خشک شده گیاه با محلول اتانول 80 درصد به نسبت 1 به 10 (وزنی/حجمی) مخلوط شد و به مدت 24 ساعت بر روی همزن با سرعت 300 دور در دقیقه تکان داده شد. مخلوط حاصله از کاغذ صافی عبور داده شد و جداسازی حلال و تغییط عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای 40 درجه سلسیوس با هدف ممانعت از آسیاب به ترکیبات فنلی و 200 دور در دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغییط شده بر روی پلیت پخش و درون آون خلاء با دمای 40 درجه سلسیوس قرار داده شد تا عصاره به طور کامل خشک گردد. سپس عصاره‌تا انجام فرآیند آزمون در فریزر با دمای 18 درجه سلسیوس نگهداری شد [9].

پرداختند [1]. با توجه به این که فیلم‌های فعال مانند حفاظی در اطراف فرآورده غذایی از طریق کترول میزان ورود و خروج رطوبت و گازها و همچنین از طریق رهایش کترول شده ترکیبات فعال سبب افزایش ماندگاری مواد غذایی نظیر گوشت طیور و آبزیان می‌گرددند لذا در این مطالعه به امکان‌سنگی تولید فیلم فعال نشاسته ساگو پرداخته شده است.

گوشت طیور یکی از مهمترین منابع پروتئینی در تغذیه انسان می‌باشد. همچنین آبزیان به ویژه ماهی‌ها به دلیل داشتن پروتئین زیاد و قابلیت هضم حدود 96 درصد و از سوی دیگر به دلیل وجود اسیدهای چرب امکا-3 از جایگاه ویژه‌ای در جیره غذایی انسان برخوردار هستند. با این وجود، گوشت ماکیان و آبزیان یک محیط ایده‌آل برای رشد میکرووارگانیسم‌هایی از قبیل استافیلکوکوساورئوس، اشرشیاکلی و غیره می‌باشد زیرا گوشت ماکیان دارای رطوبت زیاد و غنی از مواد نیتروژنی، معدنی، فاکتورهای کمکی رشد و همچنین کربوهیدرات‌های قابل تخمیر (گلیکوژن) می‌باشدند. آبزیان نیز به دلیل داشتن رطوبت و پروتئین زیاد و از سوی دیگر وجود درصد بالایی از اسیدهای چرب چند غیر اشباعی در صورت نگهداری در شرایط نامناسب به سرعت توسط باکتری‌های مذکور از کیفیت آنها کاسته می‌شود. لذا لزوم بررسی اثرات ضدمیکروبی فیلم فعال تولیدی بر علیه این باکتری‌ها لازم و ضروری به نظر می‌رسد [1, 8].

با توجه به اینکه تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای در زمینه تولید فیلم فعال حاوی عصاره پنیرباد صورت نگرفته است هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر سه غلاظت مختلف عصاره گیاه پنیرباد بر روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و نوری فیلم فعال تولید شده بر پایه نشاسته ساگو می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد

کلیه محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده گردید آنالیتیکال¹

2. Nutrient Agar
3. Mueller Hinton Agar
4. Mueller Hinton Broth
5. SIM
6. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Analytical Grade

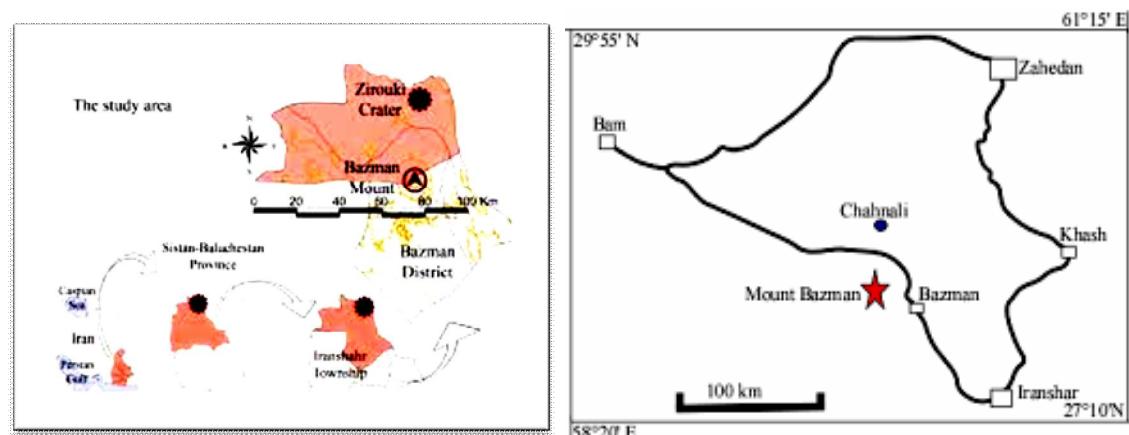


Fig 1 Map of Bazman area of Iranshahr City

قسمت فوقانی آمپول شکسته شد. ابتدا پنبه نسوز عایق بالای ویال درونی و سپس ویال درونی با احتیاط از درون ویال اول خارج گردید. در ادامه با استفاده از پنس استریل پنبه فوقانی ویال درونی خارج و حدود ۰/۵ میلی لیتر از محلول رینگر استریل به ماده خشک درون آن اضافه و با دقت جهت تهیه یک سوسپانسیون یکنواخت مخلوط گردید. کل سوسپانسیون تهیه شده از هر باکتری به طور جداگانه در سطح شیبدار محیط کشت لوله‌ای نوترینت آگار تلخیح و سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس جهت رشد باکتریایی انکوبه گردیدند. به میزانی از باکتری‌های رشد یافته به لوله‌های حاوی رینگر استریل اضافه شد تا کادرتوئی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلنند حاوی $1/5 \times 10^8$ واحد تشکیل دهنده کلی در هر میلی لیتر حاصل گردد. به منظور تهیه محلول رینگر به یک قرص رینگر، ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر اضافه شد پس از انحلال کامل قرص در آب مقطر، محلول در لوله‌های دریچه‌دار تقسیم و درون اتوکلاو استریل گردید.

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد از روش میکرودایلوشن³ استفاده شد. در این روش در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه، نخست درون چاهک‌های ۱۲ عددی هر ردیف، میزان ۹۵ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتوون براث استریل با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مادر ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره به چاهک اول متقل و غلظت

2-2-2- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC¹) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC²) عصاره

غلظت مادر ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره پنیرباد با استفاده از دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد آماده گردید و با عبور از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل شد. استاندارد نیم مک فارلنند با اضافه نمودن ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱/۰۵ درصد باریم ۱/۱۷۵ میلی لیتر کلرید باریم ۶۲۵ نانومتر با میزان جذب ۰/۱۳ تعیین شد. استاندارد نیم مک فارلنند حاوی کدرتی معادل یک سوسپانسیون باکتریایی با $1/5 \times 10^8$ واحد تشکیل دهنده کلی در هر میلی لیتر می‌باشد [۱۰].

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشتریشیاکلی، سودوموناس آئروژنیوزا و باسیلوس سرئوس از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و مطابق دستورالعمل ارسالی به شرح ذیل عمل احیاء سویه‌های خالص انجام گردید: جهت بازکردن هر آمپول لیوفیلیزه، قسمت فوکانی آمپول حرارت داده شد و بلافاصله روی قسمت حرارت دیده، چند قطره آب مقطر (ترجیحاً استریل) ریخته شد تا قسمت حرارت دیده در اثر سرد شدن ترک بردارد. سپس با ضریب پنس به بخش ترک خورده،

1. Minimum Inhibitory Concentration
2. Minimum Bactericidal Concentration

حرارت داده شد تا فرآیند ژلاتینه شدن کامل شود. در ادامه، 45 درصد وزنی/وزنی پلاستی سایزر گلیسروول به محلول جهت جلوگیری از شکنندگی فیلم‌ها اضافه شد. عصاره پنیرباد در سه سطح غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ برابر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به محلول نشاسته ساگو اضافه شد. حجم مناسبی از محلول سازنده فیلم بر رویلیت شیشه‌ای بابعاد 20×20 سانتی‌متر مریع و ضخامت ۲ میلی‌لیتر ریخته شد و طی 24 ساعت در شرایط آزمایشگاه خشک گردید. سپس فیلم‌ها از سطح پلیت جدا گردیدند و در داخل دسیکاتور نگهداری شدند.^[1]

4-2-2-4- اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیلم‌ها
ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر آلتون¹ (ساخت کشور چین) با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر بررسی شد. اندازه‌گیری در ۵ نقطه تصادفی فیلم محاسبه و میانگین آنها گزارش گردید.^[2]

حالیت فیلم نشاسته ساگو در آب به مقدار درصد ماده خشک فیلم اطلاق می‌گردد که پس از 24 ساعت غوطه‌وری در آب مقطر به حالت محلول درآید. اختلاف وزن خشک قطعات فیلم ساگو قبل و بعد از قرار گرفتن در آب مقطر پس از 24 ساعت به عنوان حالیت در نظر گرفته شد.

به منظور تعیین میزان جذب آب فیلم‌ها، نخست نمونه‌ها (با ابعاد 20×20 میلی‌متر مریع) جهت ایجاد رطوبت نسبی ۰ درصد در حضور محلول سولفات کلسیم به مدت 24 ساعت تحت کاندیشینگ قرار گرفتند. بعد از وزن کردن، فیلم‌ها درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیترات کلسیم به منظور حصول رطوبت نسبی ۵۵ درصد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به طور متواالی وزن شدند تا تعادل حاصل گردد. میزان جذب رطوبت از رابطه زیر به دست آمد:^[12]

$$\text{معادله 1}$$

$$\frac{\text{فیلم خشک} - \text{فیلم مرطوب}}{\text{فیلم خشک}} = \text{درصد جذب آب}$$

آبگریزی سطحی نمونه‌ها با استفاده از دوربین دیجیتال بررسی شد. در ابتدا یک قطره آب مقطر بر روی سطح فیلم (با ابعاد 30×50 میلی‌متر مریع) قرار گرفت و بلافصله از سطح تماس قطره با فیلم عکس گرفته شد. سپس برای محاسبه زاویه تماس

100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید. غلظت 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره در چاهک اول از طریق اختلاط کامل نسبت مساوی از 100 میکرولیتر غلظت مادر 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره با 95 میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث استریل با غلظت مضاعف و در نهایت، افزودن 5 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی نیم مک فارلند و نصف‌سازی غلظت عصاره مادر حاصل شد. در ادامه، 100 میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم منتقل و غلظت 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. این ترتیب برای همه چاهک‌ها به جز چاهک شماره 12 که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود، ادامه یافت. چاهک شماره 11 به عنوان شاهد و کنترل منفی در نظر گرفته شد. در انتها 100 میکرولیتر از چاهک شماره 11 برداشته و دور ریخته شد. در ادامه 5 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل کدورت استاندارد نیم مک فارلند به هر یک از چاهک‌ها به جز چاهک شماره 11 اضافه گردید سپس میکرولیت به مدت 7 ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک‌ها در طول موج 625 نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکرولیت در انکوباتور 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری شد و پس از گذشت این زمان، میزان جذب یا کدورت چاهک‌ها مجدداً توسط دستگاه الایزا قرائت و مقایسه گردید. کمترین غلظت عصاره که سبب ممانعت از رشد باکتری گردیده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره نیز با توجه به مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید به طوری که میزان 5 میکرولیتر از چاهک‌هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده بود به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار تلقیح و به طور یکنواخت پخش گردیده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس انکوبه شدند. پایین‌ترین غلظت عصاره که در آن 99/9 درصد باکتری‌ها رشد نکرده (افق رشد باکتری) بودند به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شد.^[11]

4-2-3- تهیه فیلم فعال نشاسته ساگو حاوی عصاره پنیرباد

در ابتدا محلولی با غلظت 4 درصد از نشاسته ساگو با استفاده از آب مقطر تهیه و در دمای 90 درجه سلسیوس به مدت 45 دقیقه

گردیدند. پارامترهای اندازه‌گیری شده توسط دستگاه رنگ‌سنج شامل درخشندگی یا^{*} L (سفید تا سیاه)، a* (سبز تا قرمز) و b* (آبی تا زرد) بودند. آزمایشات در سه تکرار انجام پذیرفتند.

به منظور سنجش کدورت فیلم‌ها، نمونه‌ها به ابعاد 20×20 میلی‌متر مریع درون سل اسپکتروفوتومتر قرار داده شدند. سپس مقدار کدورت فیلم‌ها از تقسیم مقدار جذب در طول موج 600 نانومتر بر ضخامت نمونه‌ها (بر حسب میلی‌متر) بدست آمد [2].

2-7-2 آزمون طیف‌نورسنج (درصد عبور و جذب نور مرئی) فیلم‌ها

به منظور انجام این آزمون، فیلم ساگو در ابعاد 5×5 سانتی‌متر مریع بریده شد و سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری فیلم‌های ساگو در طول موج بین 200 تا 1100 نانومتر قرائت شد. کالیراسیون اسپکتروفوتومتر با هوا انجام گردید.

2-8-2 خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها

خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها با استفاده از دستگاه تستومتریک¹ (فاصله اولیه بین دو فک دستگاه، 50 میلی‌متر و سرعت حرکت فک بالایی 50 میلی‌متر بر دقیقه) اندازه گیری شد. فیلم‌ها (با ابعاد 5×1 سانتی‌متر مریع) به منظور مشروطسازی، درون دسیکاتور حاوی نیترات کلسیم با دمای 21 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 50 درصد به مدت 48 ساعت نگهداری شدند. در نهایت، خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها شامل حداقل نیرو در نقطه پاره شدن²، افزایش طول تا نقطه شکست³ و مدول یانگ⁴ بر اساس دستورالعمل روش استاندارد ASTM-D882-02 محاسبه گردیدند [15].

2-9-2 تعیین فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها

فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها در برابر باکتری‌های پاتوزن اشربیاکلی و استافیلوکوکوساورئوس به کمک روش انتشار از دیسک به آگار برسی شد [1]. در ابتدا از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی (حاوی 10^8 cfu/ml) از باکتری‌های مذکور (مقدار 100 میکرولیتر به محیط کشت مولرهیتون آگار انتقال و کشت سطحی داده شد. سپس فیلم‌های بریده شده به

قطره با سطح فیلم‌ها از نرم افزار J Image استفاده شد [11].

2-5-2-2 میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به بخار آب

میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به بخار آب طبق روش اصلاح شده ASTM E96-95 اندازه گیری شد [13]. در ابتدا در فنجان‌های شیشه‌ای مقدار 8 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و سپس سطح فنجانکها توسط فیلم‌ها با استفاده از حلقه‌های لاستیکی پوشانده شدند و درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای 25 درجه سلسیوس ایجاد رطوبتی به میزان 100 درصد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو طرف فیلم در این دما، اختلاف فشار بخاری معادل $2/337 \times 10^3$ پاسکال ایجاد می‌نماید. در ادامه، میزان افت وزنی فیلم‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت 0/0001 گرم تعیین گردید. نرخ انتقال بخار آب (بر حسب فنجان به زمان، تقسیم بر سطح فنجان می‌باشد. سطح هر فنجان 0/00280 میلی‌متر مریع در نظر گرفته شده بود.

معادله 2

$$\text{سطح فنجان / شب خط} = \text{نرخ انتقال بخار آب}$$

از حاصل ضرب نرخ انتقال بخار آب بر ضخامت روکش و تقسیم آن بر اختلاف فشار دو طرف فیلم‌ها، میزان نفوذپذیری به بخار آب (بر حسب $10^{10} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{g}$) تعیین گردید.

میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به اکسیژن‌به وسیله دستگاه Mocon Oxtran (Minneapolis, USA 2/21)

ASTM Win permTM و با استفاده از روش استاندارد D3985-05

اندازه گیری شد [14]. در ابتدا، نمونه‌های فویل پیچی شده با سطح باز 5 سانتی‌متر مکعب در سل‌های دیفوژیون

نصب شدند. این آزمون در دمای 25 درجه سلسیوس، فشار اتمسفر و رطوبت نسبی به ترتیب 50 و 21 درصد انجام شد.

اکسیژن عبور نموده از نمونه‌ها با گاز حامل نیتروژن و هیدروژن به سنسورهای Colometric هدایت شد. اندازه گیری‌ها در مدت 60 دقیقه و به صورت پیوسته تا حصول تعادل انجام گردید.

2-6-2-2 رنگ‌سنجی

فیلم‌ها به منظور رنگ‌سنجی بر روی صفحه سفید استاندارد قرار

داده شدند و پارامترهای استاندارد *L، a* و b* توسط دستگاه

رنگ‌سنج BYK Bardner (کشور آمریکا) تعیین

1. Testometric
2.Tensile Strength (TS)
3.Elongation at Break (EB)
4.Young,s Modulus (YM)

معادله 4

$$\text{DPPH scavenging}(\%) = \frac{(\text{AbsDPPH} - \text{Abextract})}{\text{AbsDPPH}} \times 10$$

که در این معادله، Abs_{DPPH} : مقدار جذب برای محلول اتانولی DPPH و $\text{Abs}_{\text{extract}}$: مقدار جذب برای عصاره نمونه فیلم ساگو می‌باشد.

2-3- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

در بخش‌های مختلف تحقیق تمامی آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه 22 ساخت شرکت IBM آمریکا در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام پذیرفت. میانگین‌ها در سطح احتمال خطای 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

3-نتایج و بحث

1-3- تعیین MIC و MBC عصاره پنیرباد

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره اتانولی برگ پنیرباد بر روی چهار باکتری استافیلوکوکوس ارئوس، اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا در جدول 1 گزارش شده است. میزان MIC و MBC عصاره اتانولی برگ پنیرباد از روی غلظت‌های سریالی یک دوم تهیه شده از غلظت مادر 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در چاهک‌های دهگانه هر ردیف از میکروپلیت به ترتیب 0/19، 0/78، 1/56، 3/125، 6/25، 12/5، 25، 50، 100 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قابل محاسبه می‌باشد. چاهک یازدهم و دوازدهم در هر ردیف میکروپلیت مربوط به شاهد مثبت و منفی هستند. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس ارئوس حساسترین و سودوموناس آئروژینوزا مقاومترین باکتری نسبت به تاثیرات ضلبacterیابی عصاره بودند. به عبارتی، باکتری‌های گرم منفی حساسیت کمتری نسبت به عصاره گیاه پنیرباد از خود نشان دادند. این امر به دلیل وجود دیواره اضافی در باکتری‌های گرم می‌باشد که در برابر ترکیبات ضدمیکروبی ایجاد مقاومت بیشتری می‌نماید. به عبارتی وجود این غشای اضافی سبب می‌شود که ترکیبات آبگریز دارای خاصیت ضدمیکروبی موجود

صورت دیسک‌های 6 میلی‌متری بر روی محیط کشت قرار داده شدند و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. در نهایت، مساحت منطقه بازدارندگی با استفاده از کولیس دیجیتال بر حسب میلی‌متر مربع اندازه گیری شد.

2-10- ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فیلم

محتوای فنولی کل نمونه‌ها به روش فولین سیوکالچو مطابق با روش حیدری مجید و همکاران (2019) اندازه گیری شد [1]. بدین منظور، 20 میلی‌گرم از هر یک از فیلم‌های نشاسته ساگو با 10 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و سپس 0/1 میلی‌لیتر از محلول ایجاد شده با 7 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر معرف رنگی فولین سیوکالچو مخلوط شد. محلول حاصله پس از 8 دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق با 1/5 میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم 20 درصد و 0/9 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد تا حجم نهایی به 10 میلی‌لیتر رسانده شود. محلول حاصله در محیط تاریک و در دمای اتاق به مدت 120 دقیقه قرار داده شد. در ادامه، جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 765 نانومتر قرائت گردید. منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک در غلظت‌های مختلف رسم شد. در نهایت محتوای فنولی کل فیلم‌های فعال نشاسته ساگو بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک به ازای گرم ماده خشک نمونه مطابق معادله زیر محاسبه گردید:

معادله 3

$$T = CV/M$$

که در این معادله T: محتوای فنولی کل فیلم فعال نشاسته ساگو، C: غلظت اسید گالیک حاصله از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم بر گرم)، V: حجم عصاره فیلم فعال (میلی‌لیتر) و M: وزن فیلم خشک (گرم) می‌باشد.

همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها با استفاده از روش DPPH بررسی شد. بدین منظور، 25 گرم نمونه در 4 میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت 5 دقیقه هم زده شد. محلول حاصل با 1 میلی‌لیتر از محلول 1 میلی‌مولار DPPH مخلوط شد و پس از 30 دقیقه نگهداری در محیط تاریک و دمای اتاق، جذب محلول در طول موج 517 نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها طبق معادله زیر محاسبه شد:

حالیت از مهمترین پارامترهای کلیدی یک فیلم می‌باشد که کاربرد آن را تعیین می‌نماید. جدول 2، نتایج حلالیت در آب فیلم‌های نشاسته ساگو را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که نمونه شاهد کمترین میزان حلالیت (15/6 درصد) را داشت. افزودن عصاره پنیرباد سبب افزایش حلالیت در آب فیلم نشاسته گردید که البته این افزایش فقط در غلظت 1/5 و 2MIC عصاره پنیرباد معنی دار ($p < 0.05$) بود. نتایج مشابه در اثر افزایش حلالیت در آب فیلم استات سلولز بر اثر افزودن عصاره گیاه تشنه‌داری مشاهده شد [20]. همچنین افزودن غلظت‌های مختلف عصاره اکالیپتوس سبب افزایش معنی دار ($p < 0.05$) حلالیت در آب فیلم نشاسته تاپیوکا گردید [19]. نفوذ ترکیبات فنولیک موجود در عصاره پنیرباد به داخل فضای بین رشته‌ای پلیمر نشاسته سبب کاهش اتصالات عرضی می‌شود و در پی آن، حلالیت در آب فیلم نشاسته ساگو افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، خود عصاره نیز ممکن است در آب حل شود و با خروج عصاره بر میزان حلالیت فیلم اثرگذار باشد.

میزان آبدوستی و آبگریزی سطح فیلم را می‌توان از طریق تعیین میزان زاویه تماس بررسی نمود. جدول 2 میزان آبگریزی فیلم نشاسته ساگو حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد را نشان می‌دهد. نشاسته ساگو خالص، زاویه تماس 45 درجه را نشان می‌دهد که این مقدار حاکی از آبدوستی سطح نشاسته ساگو می‌باشد (جدول 2). این مقدار قابل مقایسه با زاویه تماس (41/9) نشاسته ساگو بدست آمده در پژوهش سونداری¹ و همکاران (2018) می‌باشد [21]. ظرفیت جذب آب زیاد گلیسرون (پلاستی سایزر) بکاربرده شده در ساخت فیلم و همچنین وجود گروههای عملکردی آبدوست موجود در ساختار پلیمر نشاسته ساگو می‌تواند دلیلی بر میزان بالای آبدوستی این فیلم باشد. افزودن غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد سبب افزایش میزان زاویه تماس فیلم گردید. علت افزایش آبگریزی سطح با افزایش غلظت عصاره پنیرباد می‌تواند به علت وجود ترکیبات آبگریز در ساختار عصاره باشد. همچنین به علت پیوند میان گروههای OH آزاد موجود در نشاسته ساگو با گروههای عملکردی موجود در عصاره پنیرباد سبب می‌شود که این گروههای آبدوست از دسترس خارج گردند و بنابراین میزان آبدوستی سطح کاهش یابد.

در عصاره‌ها و انسان‌های گیاهی به داخل غشای باکتری، نفوذپذیری کمتری داشته باشند [9, 16, 17].

Table 1 MIC and MBC values of *Withania Somnifera* extracts against four tested bacterial strains

MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	Bacteria
6.25	1.56	<i>S. aureus</i>
25	12.5	<i>E. coli</i>
12.5	12.5	<i>B. cereus</i>
100	50	<i>P. aeruginosa</i>

2-3- ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی فیلم‌های فعال

نشاسته ساگو

فیلم نشاسته ساگو تولید شده توسط روش قالب‌گیری (کاستینگ) دارای سطوح صاف و شفاف بود و از انعطاف‌پذیری خوبی برخوردار بود. این فیلم‌ها به راحتی از پلیت جدا شدند. مقادیر ضخامت نمونه‌ها در جدول 2 گزارش شده است. نمونه شاهد (فیلم فاقد عصاره پنیرباد) دارای قطر 0/090 میلی‌متر بود. افزایش غلظت‌های مختلف عصاره سبب افزایش ضخامت فیلم گردید اما این افزایش ضخامت فقط در غلظت 2 MIC عصاره معنی دار ($p < 0.05$) بود (جدول 2). نتایج مشابهی در اثر افزایش ضخامت فیلم کازئینات سدیم بر اثر افزودن غلظت‌های مختلف عصاره آویشن مشاهد شد [18]. افزایش نسبی ماده خشک فیلم می‌تواند دلیلی بر افزایش ضخامت فیلم با افزودن عصاره باشد. نتایج میزان جذب آب فیلم‌های نشاسته ساگو حاوی عصاره پنیرباد در جدول 2 گزارش شده است. افزودن غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد با هیچ روند قابل ملاحظه معنی داری ($p < 0.05$) را بر میزان جذب رطوبت فیلم نشان نداد. افزودن 1/5 و 2 MIC عصاره به ترتیب سبب افزایش و سپس کاهش غیرمعنی دار میزان جذب رطوبت فیلم نشاسته گردید. رجحانو نوری (2018) نتایجی مشابه و غیرمعنی دار را در اثر افزودن عصاره اولکالیپتوس به فیلم نشاسته تاپیوکا گزارش نمودند [19]. عصاره پنیرباد از یک سو قادر است که با کاهش اتصالات عرضی در بین زنجیره‌های نشاسته سبب افزایش گروههای OH آزاد شود و در نتیجه میزان جذب رطوبت را افزایش دهد و از سوی دیگر، ترکیبات فنولیک و آبگریز موجود در عصاره قادر است مانع جذب رطوبت در فیلم نشاسته ساگو گردد [20].

Table 2 Physicochemical properties of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

Film	Thickness (mm)	water absorption (gr/ gr dry film)	water solubility (%)	contact angle (°)
Starch	0.090±0.005 ^b	1.19±0.10 ^a	15.60±0.566 ^{bc}	41.9±3.02 ^d
Starch/1-MIC	0.090±0.004 ^b	1.20±0.08 ^a	16.53±0.451 ^c	47.10±5.00 ^c
Starch/1.5- MIC	0.092±0.003 ^{ab}	1.33±0.04 ^a	18.45±0.477 ^b	54.0±2.10 ^b
Starch/2- MIC	0.12±0.004 ^a	1.26±0.05 ^a	20.60±0.600 ^a	61.12±6.20 ^a

Values are presented as means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

افزودن عصاره به فیلم خوارکی گزارش نمودند. به عنوان مثال، صفری مذنبو محمدی (2013) و همچنین سیری پاتراوان² و همکاران (2010) کاهش نفوذپذیری به بخار آب را به ترتیب بر اثر افزودن عصاره گیاه رزماری به فیلم بر پایه نشاسته مانگیین و عصاره چای سبز به فیلم بر پایه کیتوزان گزارش نمودند [12, 25]. محققین فوق دلیل کاهش نفوذپذیری به بخار آب در مطالعات خود را ایجاد پیوندهای کوالان یا هیدروژنی میان ترکیبات فنولیک موجود در عصاره با گروههای عاملی موجود در زنجیره پلیمر گزارش نمودند که این امر با محدود نمودن باندھای هیدروژنی در دسترس آب سبب کاهش نفوذپذیری به بخار آب می‌گردد.

نفوذ پذیری به اکسیژن از خصوصیات مهم پوشش‌های بسته‌بندی مواد غذایی است چرا که اکسیژن از فاکتورهای مهم در ایجاد واکنش‌های فساد ماده غذایی نظری اکسیداسیون آنزیمی و اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد و همچنین رشد میکروب‌وارگانیسم‌ها را تسريع می‌نماید. نتایج حاصل از افزودن عصاره پنیرباد بر نفوذپذیری به اکسیژن در فیلم نشاسته ساگو در جدول 3 آمده است. نتایج نشان داد که با افزودن عصاره پنیرباد به فیلم نشاسته ساگو، میزان نفوذپذیری به اکسیژن به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت. افزایش میزان رطوبت فیلم در اثر افزودن عصاره می‌تواند دلیلی بر افزایش میزان نفوذپذیری به اکسیژن باشد. نتایج مشابهی در افزایش میزان نفوذپذیری به اکسیژن فیلم نشاسته تاپیوکا در اثر افزودن عصاره اوکالیپتوس مشاهده گردید [24].

نتایج مشابه توسط جارامیلو¹ و همکاران (2015) بر روی مطالعه فیلم نشاسته کاساوای حاوی عصاره گیاه یربامایت مشاهده گردید [22].

3-3- میزان نفوذپذیری فیلم‌ها

میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم نشاسته ساگو حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد در جدول 3 گزارش شده است. نتایج جدول 3 نشان می‌دهد که افزودن عصاره پنیرباد باعث افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) نفوذپذیری به بخار آب در غلظت‌های 1/5 و 2 MIC عصاره گردیده است اما بین نفوذپذیری به بخار آب فیلم شاهد و فیلم حاوی 1MIC عصاره پنیرباد تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. کمترین میزان نفوذپذیری به بخار آب در نمونه شاهد افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم فعل سلولز باکتریایی در اثر افزودن عصاره گیاه‌تشنه‌داری مشاهده شد [20]. گسیختگی ساختار و کاهش فشردگی ساختار فیلم در اثر افزودن عصاره می- تواند دلیلی بر افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم فعل باشد [23]. همچنین با توجه به اینکه عصاره ماهیت آبدوستی دارد افزایش ماده آبدوست به فیلم سبب افزایش نفوذپذیری به بخار آب می‌گردد. از سوی دیگر، برخی محققین بیان داشتند از آنجایی که آب نقش پلاستی سایزر را ایفا می‌نماید سبب کاهش پیوندهای بین مولکولی زنجیره‌های پلیمری می‌گردد و در نتیجه نفوذ آب از بین زنجیره‌های پلیمری افزایش می‌یابد [24]. البته بررسی منابع نشان داد که برخی محققین، کاهش نفوذپذیری به بخار آبرآ بر اثر

Table 3 Permeability properties of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

Oxygen Permeability (g m ⁻² .s.Pa)10 ¹⁰)	water vapor permeability (Oxygen Trans. Rate cc.[m ² -day])	Film
1.42±0.02 ^c	0.92±0.03 ^b	Starch
1.55±0.04 ^{bc}	1.03±0.15 ^b	Starch/1-MIC
1.65±0.7 ^b	1.69±0.20 ^a	Starch/1.5- MIC
1.92±0.07 ^a	2.09±0.10 ^a	Starch/2- MIC

Values are presented as means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

5-3- خصوصیات مکانیکی

میزان مقاومت به کشش فیلم‌های نشاسته ساگو در جدول 4 گزارش شده است. نتایج نشان داد که افزایش غلظت عصاره پنیرباد سبب کاهش مقاومت کششی فیلم نشاسته ساگو گردید. کمترین مقاومت کششی 18/5 (18/5 مگا پاسکال) در فیلم نشاسته ساگو حاوی 2MIC عصاره پنیرباد مشاهده شد. این نتایج با نتایج بونیلا¹ و همکاران (2011) در تطابق بود. آنها گزارش نمودند که افزودن اسانس ریحان به فیلم کیتوزان سبب کاهش مقاومت نهایی به کشش در فیلم شد [28]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، افزودن عصاره تشنهداری سبب کاهش معنی‌دار مقاومت به کشش فیلم سلولز باکتریایی گردید [20]. کاهش مقاومت کششی فیلم نشاسته ساگو می‌تواند به علت تخربی شبکه فیلم در نتیجه افزودن عصاره پنیرباد باشد. مقاومت کششی، وابسته به همپیوستگی زنجیره‌های پلیمر در ماتریکس ورقه‌ای می‌باشد. از این‌رو، افزودن عصاره پنیرباد به فیلم به دلیل ایفای نقش نرم‌کنندگی سبب کاهش پیوستگی زنجیره‌های پلیمر در ماتریکس ورقه‌ای گردید و در نتیجه مقاومت به کشش کاهش یافت [19, 24].

فاکتور ازدیاد طول تا نقطه شکست، نشان دهنده حداکثر افزایش طول فیلم تا نقطه پاره شدن در اثر اعمال تنش کششی است و نشان دهنده میزان انعطاف‌پذیری فیلم می‌باشد. نتایج (جدول 4) نشان داد که بیشترین مقدار ازدیاد طول تا نقطه شکست (P<0.05) مربوط به نمونه فیلم حاوی 2MIC (درصد)، مربوط به عصاره پنیرباد و کمترین مقدار (3/8 درصد) مربوط به فیلم شاهده می‌باشد. به عبارتی، افزودن عصاره پنیرباد به فیلم نشاسته ساگو سبب افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) ازدیاد طول تا نقطه شکست شد. عصاره به دلیل نقش نرم‌کنندگی و دخالت در ایجاد برهمکنش‌های مناسب بین رشته‌های بیوپلیمر سبب افزایش ازدیاد طول تا

4-3- رنگ‌سنجی

یکی از شاخص‌های مهم در بازار پستدی محصولات غذایی، رنگ و شفافیت بسته‌بندی آن می‌باشد. از آنجایی که غلظت‌های عصاره پنیرباد به طور مستقیم بر رنگ فیلم‌های نشاسته ساگو اثر گذار می‌باشد لذا نتایج مربوط به پارامترهای ^aL* (شفافیت)، ^ab* (قرمزی) و ^{b*}b (زردی) در جدول 4 نمایش داده شده است. نتایج آنالیز رنگ نشان داد که با افزایش درصد عصاره از 1 به 2 MIC 2 شاخص ^aL* که میان سفیدی و شاخص شفافیت فیلم می‌باشد روند کاهشی داشته است اما این کاهش فقط در غلظت 1/5 و 2MIC عصاره پنیرباد معنی‌دار بوده است. بیشترین شفافیت (95/6) در فیلم شاهده مشاهده شد اما با افزودن عصاره پنیرباد، پارامترهای ^ab* و ^{b*}b افزایش یافتدند. در مطالعات قبلی نیز کاهش شاخص ^aL* در اثر افزودن عصاره‌های مختلف به فیلم خوارکی گزارش شده‌اند [20]. اضافه کردن عصاره پنیرباد تاثیر قابل توجهی بر نتایج آزمون رنگ‌سنجی پوشش نشاسته ساگو داشت. دلیل این امر می‌تواند حضور ترکیبات فنولیک و رنگی موجود در عصاره پنیرباد و همچنین ساختار داخلی ایجاد شده در طول خشک کردن فیلم‌ها باشد [26]. نتایج مشابهی برای تغییر رنگ فیلم فعلی کیتوزان حاوی عصاره دانه انگور [27] و عصاره چای سبز [25] گزارش شده است. همان طور که در جدول (4) نشان داده شده است با افزودن عصاره پنیرباد به فیلم‌ها میزان شفافیت به طور معنی‌داری (P<0.05) کاهش یافته است و کمترین مقدار شاخص شفافیت در فیلم حاوی عصاره پنیرباد با غلظت 2MIC مشاهده گردیده است. نتایج این تحقیق موید نتایج سالاریاشی و همکاران (2014) است که گزارش کردند با افزایش غلظت اسانس میزان شفافیت فیلم‌ها کاهش می‌یابد [2].

که بیشترین میزان مدول یانگ (1475 مگاپاسکال)، مربوط به نمونه شاهد و کمترین مقدار (607 مگاپاسکال)، مربوط به فیلم حاوی 2 MIC عصاره پنیرباد می‌باشد. به طور کلی، افزایش مقدار عصاره پنیرباد از MIC 1 به MIC 2 به طور معنی داری (p<0.05) باعث کاهش مدول یانگ گردید. نتایج مشابه در کاهش مدول یانگ بر اثر افرودن عصاره تشنده‌داری به فیلم سلولز باکتریایی مشاهده شد [19].

نقطه شکست گردیده است. نتایج مشابه در افزایش میزان ازدیاد طول تا نقطه شکست در اثر افرودن عصاره‌برگ فوفل (تخل هندی) به فیلم بر پایه نشاسته ساگو مشاهده شد [24]. مدول یانگ یا مدول الاستیسیته، نسبت تنفس کششی به کرنش کششی است در حالیکه رابطه بین این دو خطی باشد و از شب منحنی تنفس-کرنش حاصل می‌گردد و معمولاً برحسب مگاپاسکال بیان می‌شود. نتایج مدول یانگ (جدول 4) نشان داد مگاپاسکال بیان می‌شود. نتایج مدول یانگ (جدول 4) نشان داد

Table 4 Colorimetric and mechanical test results of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

YM (MPa)	EB (%)	TS (MPa)	b*	a*	L*	Film
1475.3±105.8 ^a	3.85±0.91 ^c	24.22±1.44 ^a	0.35±0.07 ^d	1.0±0.1 ^c	95.62±0.7 ^a	Starch
1154.0±179.0 ^{ab}	5.2±1.08 ^c	22.14±1.69 ^{ab}	4.40±0.45 ^c	1.60±0.5 ^c	95.0±0.5 ^a	Starch/1-MIC
823.6±25.1 ^b ^c	9.01±1.25 ^b	19.77±1.18 ^b	7.33±0.45 ^b	3.43±0.2 ^b	92.66±0.7 ^b	Starch/1.5-MIC
607.1±110.2 ^c	12.26±0.86 ^a	18.53±0.45 ^b	10.45±0.44 ^a	5.46±0.2 ^a	90.60±0.5 ^c	Starch/2-MIC

Values are presented as means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences (p < 0.05).

200-1100 نانومتر (محدوده ماوراءبنفس) افزایش یافت. نتایج مشابه در مطالعه صفری مذنب و محمدی (2013) و همچنین نوری و نافچی (2014) در افزایش میزان جذب اشعه فرابنفش در اثر افرودن عصاره رزماری به فیلم نشاسته مانگبین مشاهده شد [24, 12].

شکل 2 (b) حاکی از عبور فرابنفش در بازه 1100-200 نانومتر از فیلم نشاسته ساگو می‌باشد. مطابق نمودار، در اثر افرودن عصاره پنیرباده فیلم نشاسته ساگو، میزان عبور نور به میزان اندکی کاهش پیدا نمود.

6-3- تاثیر عصاره پنیرباد بر میزان جذب و عبور ماوراءبنفس فیلم نشاسته ساگو

میزان عبور و جذب اشعه فرابنفش از ویژگی‌های مهم یک فیلم خوارکی می‌باشد که توسط دستگاه طیف سنج نوری بررسی می‌شود. اشعه فرابنفش به خصوص در رنج تابش 200-1100 نانومتر تاثیرات مخرب بر مواد غذایی دارد. شکل 2(a) نشان‌دهنده جذب فرابنفسدر بازه 1100-200 نانومتر برای فیلم فعال نشاسته ساگو می‌باشد. نتایج نمودار حاکی از آن است که با افزودن عصاره پنیرباده فیلم، میزان جذب اشعه فرابنفش در بازه

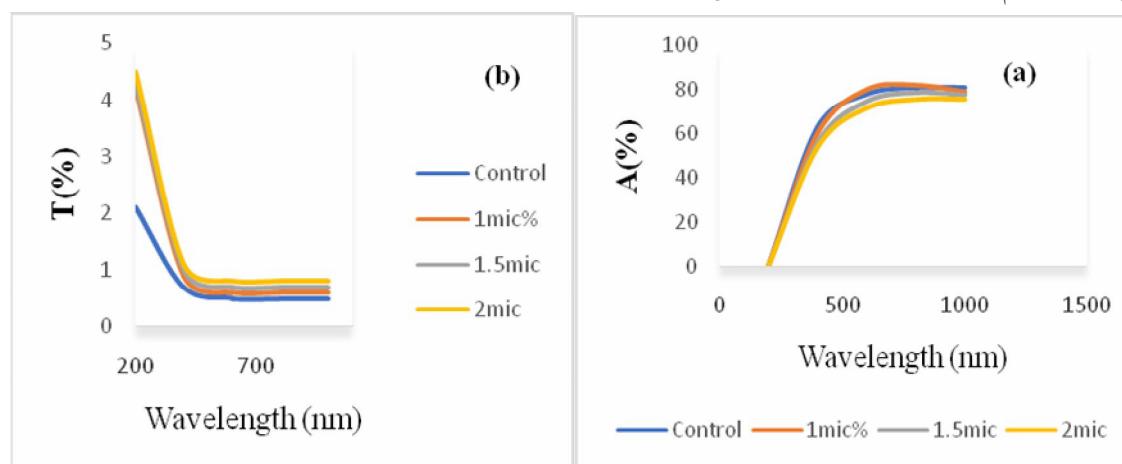


Fig 2 Amount of absorption (a) and transmission (b) ultraviolet of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

پنیرباد نشان داد. باکتری‌های گرم منفی مانند اشربیاکلی به علت داشتن غشای اضافی خارجی در اطراف دیواره سلولی خود می‌توانند رهایش ترکیبات آبکریز را از عرض غشای لیپوساکاریدی باکتری‌ها محدود نمایند [16, 17, 29]. نتایج مشابه توسط حیدری مجدو همکاران (2019) گزارش شد که در آن فیلم بر پایه پلی لاکتیک اسید فعال شده با هر یک از انسان‌های آویشن و نعناع رشد باکتری‌های گرم مثبت را به مقدار بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مهار نمود [1]. فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های فعال حاوی عصاره پنیرباد موجود در این پژوهش می‌تواند به علت حضور ترکیبات فنولیک (با خاصیت ضد میکروبی) موجود در عصاره پنیرباد باشد. مکانیسم ضدمیکروبی ترکیبات فنولیک موجود در عصاره پنیرباد متعدد می‌باشد. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به خالدن در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری و خروج یون‌ها و محتوای داخل سلولی آن، غیر فعال‌سازی در مسیر ستتر آنزیم‌های تنفسی در میتوکندری و اخلال در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی و آزادسازی لیپو پلی‌ساقاریدها اشاره نمود [29].

Table 5 Antimicrobial activity of sago starch active films

Film	Inhibition area (mm ²)	
	E. coli	S. aureus
Starch	ND ^c	ND ^d
Starch/1-MIC	ND ^c	92.4±91.80 ^c
Starch/1.5-MIC ^c	56.11±22.46 ^d	280.3±29.85 ^b
Starch/2-MIC	190.5±66.30 ^a	380.3±65.66 ^a

ND: Not detected. Values are presented as means ± standard deviation. Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

(23/2) در فیلم فعال حاوی 2 MIC عصاره پنیرباد مشاهده شد. نتایج مشابهی در اثر افزودن انسان‌رزماری و آویشن شیرازی به فیلم فعال کیتوزان مشاهده شد [29, 31]. این امر مرتبط با ترکیبات فنولی موجود در عصاره پنیرباد (ویتابرین A، ویتانولید و ویاستر امونولید) باشد.

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر حسب رادیکال‌های DPPH به عنوان درصدی از عصاره تعریف می‌گردد که بتواند میزان جذب رادیکال آزاد DPPH را به نصف کاهش دهد [32]. ارزیابی‌مهرار رادیکال‌های DPPH که در واقع اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده نظری فنولها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد معمولترین روش محاسبه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

7-3- فعالیت ضدمیکروبی فیلم

نتایج آزمون ضدمیکروبی فیلم فعال نشاسته ساگو حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد در برابر باکتری‌های بیماری‌زا اشربیاکلی و استافیلکوکوساورئوس در جدول 5 گزارش شده است. فیلم خالص نشاسته ساگو هیچگونه فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان نداده است. افزودن ترکیبات ضدمیکروبی مانند عصاره پنیرباد سبب می‌شود که عصاره از طریق ژل آگار نفوذ نماید و هاله مشخصی را در اطراف دیسک‌های تولیدی ایجاد نماید. فیلم نشاسته ساگو حاوی 1 MIC عصاره پنیرباد بر روی باکتری اشربیاکلی هیچ اثر ضدبacterیابی نشان نداد (عدم ایجاد هاله). با این وجود با افزایش غلظت عصاره پنیرباد تا 1/5 MIC 1/5 فعالیت ضدمیکروبی معنی‌داری ($P < 0.05$) بر روی باکتری استافیلکوکوس ارئوس و اشربیاکلی مشاهده شد. افزایش غلظت تا 2MIC عصاره نیز سبب افزایش میزان فعالیت ضدمیکروبی گردید. البته میزان مهار باکتری اشربیاکلی (گرم منفی) بسیار کمتر از استافیلکوکوس ارئوس (گرم مثبت) بود. به عبارتی، باکتری گرم منفی مقاومت بیشتری را نسبت به عصاره

8-3- ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

نتایج (شکل 3 (a)) نشان داد که فیلم خالص نشاسته ساگو به مقدار جزئی از خود محتوای ترکیبات فنولیک نشان داد. این مقدار جزئی مربوط به ترکیبات غیرفنولیک کاهنده موجود در فیلم نشاسته ساگو و برهمنکش آنها با معرف فولین سیوکالچو می‌باشد که توانایی ایجاد ترکیبات رنگی را دارا می‌باشد [29]. نتایج مشابه توسط مرادی و همکاران برای محتوای فنول فیلم خالص کیتوزان مشاهده گردید [26]. میزان ترکیبات فنولیک فیلم نشاسته ساگو با افزایش غلظت عصاره پنیرباد افزایش یافت به صورتی که mg Galic acid/g sample) بیشترین میزان محتوای فنولی

پژوهش‌های قبلی اشاره شده است که افزودن اسانس به فیلم زیست تجزیه‌پذیر سبب افزایش مهار رادیکال‌های آزاد می‌شود. به عنوان مثال فیلم استات سلولز در اثر افزودن اسانس مرзе، خاصیت مهار رادیکال آزاد را نشان داد [20]. در مطالعه حیدری مجد و همکاران (2019) افزودن اسانس باریجه به نانوالیاف رئین سبب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی نانوالیاف گردید [33]. همچنین نتایج مطالعه سوخته زارعی و همکاران (2017) نشان داد که افزودن عصاره تشنگداری سبب بهبود خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم استات سلولز گردید [20].

بوده و بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DPPH توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره استوار است. بنابراین هر چه عصاره دارای ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی بیشتری باشد قادر به انتقال اتم‌های هیدروژن بیشتر به رادیکال‌های آزاد DPPH و مهار فعالیت اکسیدانی آنها خواهد بود. شکل 3 (b) میزان مهار رادیکال‌های آزاد توسط فیلم‌های فعال نشاسته ساگو را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش غلظت عصاره پنیرباد افزایش یافت. بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد (68 درصد) در فیلم حاوی MIC 2 عصاره پنیر باد مشاهده شد. در

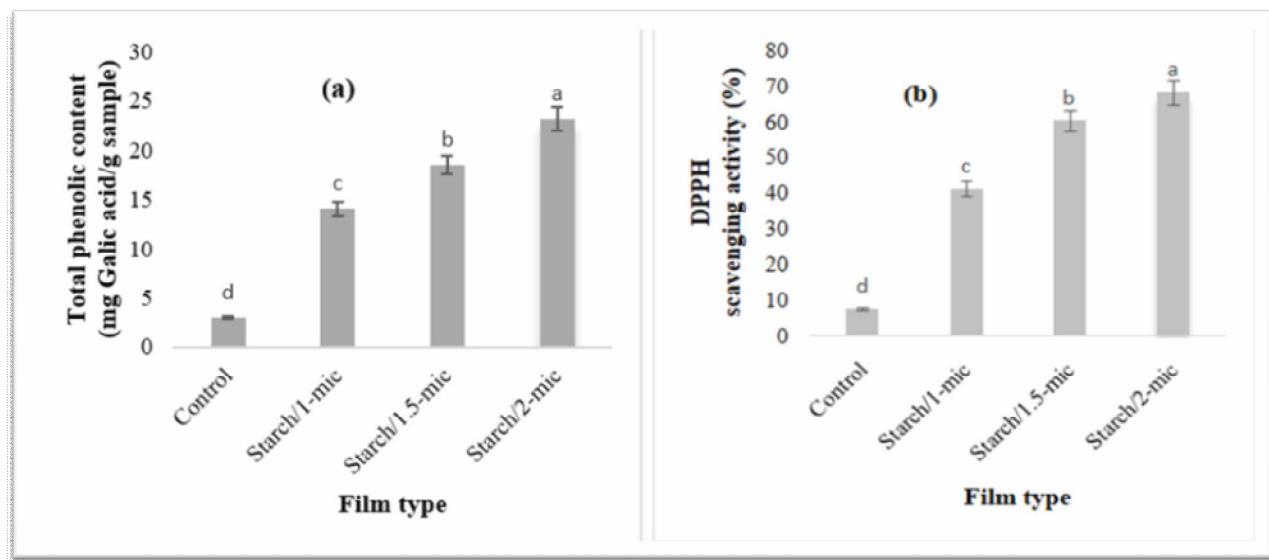


Fig 3 Total phenol content (a) and DPPH radical-scavenging activity (b) of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

مواد غذایی و محصولات کشاورزی به منظور افزایش زمان ماندگاری آنها مناسب باشد.

5- منابع

- [1] 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 Packaging and Shelf Life*.19: 94-103.
- [2] Salarbashi, D., Tajik, S., Shojaee-Aliabadi, S., Ghasemlou, M., Moayyed, H., Khaksar, R.,

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رنگی، نفوذپذیری، ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی فیلم نشاسته ساگو حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد مورد بررسی قرار گرفت. افزودن عصاره پنیرباد سبب بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیلم نشاسته ساگو گردید. غلظت‌های پایین عصاره بر باکتری‌های پاتوژن موثر نبودند و افزایش غلظت عصاره سبب بهبود ویژگی‌های ضدمیکروبی فیلم تولید شده گردید. محتوای ترکیبات فنولی فیلم نشاسته ساگو با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. به طور کلی، نتایج نشان داد که این فیلم می‌تواند به عنوان یک بسته‌بندی فعال در پوشش‌دهی

- growth of refrigerated *rainbow trout*. *LWT - Food Science and Technology*. 72: 251-260.
- [12] Safari, M. H., and Mohammadi, N. A. (2013). Investigation of the effects of rosemary extract on barrier and colorimetric properties of Mungbean starch films. *J of Chemical Health Risks*. 3(2):47-52.
- [13] ASTM, Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual Book of ASTM Standards, 08.01 (E96-95), American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA., 1994: p. 65-70.
- [14] ASTM. (2005). Standard test methods for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coulometric sensor D 3985-05. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia, PA.
- [15] ASTM, 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, 2002.
- [16] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253.
- [17] Hemmatkhah, F., Zeynali, F., and Almasi, H. (2020). Encapsulated cumin seed essential oil-loaded active papers: characterization and evaluation of the effect on quality attributes of beef Hamburger. *food and bioprocess technology*. 13: 533-547.
- [18] Campos, C. A., Gerschenson, L., and Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*. 4(6): 849-875.
- [19] Rojhan, M., and Nouri, L. (2018). Antimicrobial, Physicochemical, Mechanical, and Barrier Properties of Tapioca Starch Films Incorporated with Eucalyptus Extract. *Journal of Chemical Health Risks*. 3(3).
- [20] Sukhtezari, S. h., Almasi, H., Pirsa, S., Zandi, M., and Pirouzifard, M. kh. (2018). Investigation of the physical and antioxidant properties of bacterial cellulose active film containing *Scrophularia striata* extract. *Journal of Food Reaserch*. 27(2): 51-62.
- [21] Sondari, D., Triwulandari, E., Ghozali, M., Sampora, Y., Iltizam, I., and Masruchin, N. (2018). The effect of oxidation on sago starch 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.
- [3] Akhilesh, V., and Singh, K. (2012). Synthesis and evaluation of physicochemical properties of cross-linked sago starch. *International Journal of Biological Macromolecules*. 50:14-18.
- [4] Bhattacharai, J. P., Park, S., and Han, S. (2010). The methanolic extract of *Withania somnifera* ACTS on GABA receptors in gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons in mice. *Phytotherapy research*. 24(8): 1147-1150.
- [5] Kulkarni, S. K., and Dhir, A. (2008). *Withania somnifera*: an Indian ginseng. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 32: 1093-105.
- [6] Arora, A., and Padua, G. (2010). Nanocomposites in food packaging. *Journal of Food science*. 75(1): 43-49.
- [7] Owais, M., Sharad, K. S., Shehzad, A., and Saleemuddin, M. (2005). Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine*. 12(3): 229-235.
- [8] Hakim, H., Fazlara, A., and Tadayoni, M. (2018). Effect of chitosan coating containing oregano essential oil on shelf life of chicken fillets during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*. 57(15).
- [9] Majd, M. H., Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavi, S. A., and Bolourian, Shadi. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomidoschema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crups and Products*. 57: 195-202.
- [10] Karimkhani, M., Shaddel, R., Khodaparast, M., Vazirian, M., and Piri-Gheshlaghi, S. (2016). Antioxidant and antibacterial activity of safflower (*Carthamus tinctorius L.*) extract from four different cultivars. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 8(4): 565-574.
- [11] 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

- [28] Bonilla, J., Vargas, M., Atarés, L., and Chiralt, A. (2011). Physical properties of chitosan-basil essential oil edible films as affected by oil content and homogenization conditions. *Procedia Food Science*. 1: 50-56.
- [29] 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.
- [30] 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 Agriculture Food Chemistry*. 57(13):5933-5838.
- [31] 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.
- [32] Liu, Y., Liang, X., Wang, S., Qin, W., and Zhang, Q. (2018). Electrospun Antimicrobial Polylactic Acid/Tea Polyphenol Nanofibers for Food-Packaging Applications. *Polymers*. 10(5): 561.
- [33] Heydari-Majd, M., Rezaeinia, H., Shadan, M. R., Ghorani, B., and Tucker, N. (2019). Enrichment of zein nanofibre assemblies for therapeutic delivery of Barje (*Ferula gummosa Boiss*) essential oil. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 45:101290.
- and its application as edible film. *Journal Sains Materi Indonesia*. 20(1): 1-7.
- [22] Jaramillo, M. C., González Seligra, P., Goyanes, S., Bernal, C., and Famá, L. (2015). Biofilms based on cassava starch containing extract of yerba mate as antioxidant and plasticizer. *Starch - Stärke*. 67(9-10): 780-789.
- [23] Hosseini, M., Razavi, S. H., and Mousavi, M. A. (2009). Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan - based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of food processing and preservation*. 33(6): 727-743.
- [24] Nouri, L., and Nafchi, A. M. (2014). Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. 66: 254-259.
- [25] 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.
- [26] Balti, R., Mansour, M. B., Sayari, S., Yacoubi, L., Rabaoui, L., Brodu, N., Massé, A. (2017). Development and characterization of bioactive edible films from spider crab (*Maja crispata*) chitosan incorporated with Spirulina extract. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105(2): 1464-1472.
- [27] Shahbazi, Y. (2017). The properties of chitosan and gelatin films incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil as biodegradable materials for active food packaging. *Int J Biol Macromol*. 99: 746-753.

Preparation and investigation of *Withania Somnifera* extracts on physicochemical, antimicrobial, and mechanical properties of edible films based on sago starch

Lashkarizadeh Bami, Sh.¹, Sarhadi, H. ^{1*}, Safarzaei, A. ¹

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

(Received: 2020/03/12 Accepted: 2020/05/02)

Nowadays, extensive investigations have been conducted on developing novel biopolymers from biodegradable sources. In the current study, the active packaging film based on sago starch-containing varying concentrations (1, 1.5 and 2 MIC) of *Withania Somnifera*L. extract were produced. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC) of extract were measured. Physicochemical (such as thickness, water absorption capacity (WAC), water solubility (WS), water vapor permeability, Oxygen Permeability (OP) and contact angle (CA)), mechanical (tensile strength, elongation to break and modulus of elasticity) and antioxidant properties of the films were evaluated. The antibacterial activity of the films also was tested against two common food-borne pathogens (*Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*) by the disc diffusion method. The results showed that increasing concentrations of *Withania Somnifera*L. extract have a significant effect ($p < 0.05$) to increase the amount of thickness, WS, water vapor permeability, OP, and CA, but was not effective on WAC. *Withania Somnifera*L. extract increased the absorption of color in the visible region, which in turn led to an increasing of the parameters a^* (index color tends toward green) and b^* (index color tends towards yellow) but reduced L^* . An increase in *Withania Somnifera*L. extract content resulted in a plasticizing effect, reducing the tensile strength and Young's modulus but a concurrent increase in elongation at break. Sago films containing higher percentages of *Withania Somnifera*L. extract were effective against all two tested bacterial strains, and these effects were more significant in the case of the gram-positive bacteria. Sago film containing extract showed a good DPPH radical scavenging activity. These results suggest that the developed sago films containing *Withania Somnifera*L. extract could be used in various food packaging applications.

Keyword: Edible film, Physicochemical properties Sago starch, *Withania Somnifera* extracts

* Corresponding Author E-Mail Address: sarhadi@iaubam.ac.ir