



ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ویژگی های نانوالیاف ژلاتین حاوی اسانس اسطوخودوس

احسان صادقی حمزه خانی^۱، محمد علی نجفی^{۲*}، محمد امین میری^۳، سارا نجفی قاقلستانی^۴

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

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

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

۴- دانش آموخته دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل، زابل، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۷

کلمات کلیدی:

اسانس،

الیاف الکترورسی شده،

زیست بسیار،

فعالیت ضدباکتریایی

چکیده: اسانس گیاه اسطوخودوس کاربردهای گسترده ای در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی دارد. در این پژوهش برای نخستین بار، ریزپوشانی اسانس اسطوخودوس توسط زیست بسیار ژلاتین به روش الکترورسی انجام شد. در ابتدا ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس به کمک گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC-MS) شناسایی و سپس در غلظت های صفر، ۲/۵، ۵/۰ و ۱۰/۰ v/v به محلول الکترورسی اضافه گردید. نانوالیاف تهیه شده با استفاده از آزمون های تصویربرداری الکترونی روبشی (SEM)، تعیین ضخامت (Image J)، پراش اشعه ایکس، خواص مکانیکی و راندمان بارگذاری اسانس مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین خواص ضدباکتریایی نانوالیاف در برابر باکتری های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* به روش انتشار دیسک بررسی گردیدند. مهمترین ترکیبات اسانس اسطوخودوس اجزاء لینالول (۳۵/۲۱ درصد) و لینالیل استات (۲۶/۴۷ درصد) بودند. تمامی نانوالیاف دارای شکل یکنواخت و پیوسته بودند. با افزایش غلظت اسانس در محلول الکترورسی ضخامت (۴۳۱/۵ - ۷۰۵/۳ nm) و محتویات اسانس (۱۴/۶ - ۴/۷٪) نانوالیاف افزایش یافت. اسانس اسطوخودوس تاثیری بر ایجاد ساختار کریستالی در نانوالیاف نداشت، اما باعث کاهش شدید مقادیر مدول یانگ و سختی گردید. نمونه نانوالیاف حاوی ۱۰٪ اسانس اسطوخودوس بیشترین سختی، مدول یانگ و کشش پذیری ثبت نمود. ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نشان داد نمونه های نانوالیاف حاوی اسانس دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر تمامی باکتری های هدف بودند. بیشترین تاثیرگذاری توسط نانوالیاف ژلاتین + اسانس (۱۰٪) در برابر *S. aureus* و *B. cereus* بدست آمد. با توجه به نتایج پژوهش حاضر احتمالاً بتوان نانوالیاف ژلاتین حاوی اسانس اسطوخودوس را جهت بسته بندی فعال مواد غذایی بکاربرد. بیان نتیجه قطعی مستلزم انجام آزمایشات بالینی و در محیط واقعی است.

DOI: 10.22034/FSCT.21.146.82

* مسئول مکاتبات:

m.najafi413@uoz.ac.ir

۱- مقدمه

اثرگذاری آنها در محصولات آب دوست می‌شود. روش الکتروریسی به دلیل هزینه‌های پایین تولید، سهولت، انعطاف‌پذیری و قابلیت تولید الیاف با ضخامت ۱۰- nm ۱۰۰۰ مورد توجه است. این تکنیک برپایه کشش محلول پلیمری (ستیزی یا طبیعی) تحت نیروی الکتریکی استوار است که منجر به تولید الیاف بسیار نازک در مقیاس نانو می‌گردد [۷].

ژلاتین پلیمر زیست تخریب پذیر، زیست سازگار و خوراکی است که از هیدرولیز کلاژن بدست می‌آید. از مهمترین کاربردهای ژلاتین می‌توان در صنایع غذایی، مهندسی بافت و نیز به عنوان حامل ترکیبات فعال اشاره نمود [۵، ۹]. در سال- های اخیر، مطالعات متعددی بر تولید الیاف الکتروریسی ژلاتین حاوی اسانس و یا مشتقات آنها انجام شده است. تولید ریزپوشینه‌های اسانس گلپر [۵]، سینامالدید، لیمونن (LEO)، اوژنول [۹] و سزامول در الیاف ژلاتین [۱۰] از آن جمله هستند. نتایج نشان داده خواص مکانیکی و ضد میکروبی نانوالیاف به نوع و غلظت اسانس، نوع پلیمر و روش تهیه بستگی دارد.

هدف از مطالعه حاضر تولید نانوالیاف خوراکی جدید با خواص کنترل کنندگی رشد باکتری‌های مولد فساد غذایی است. بر همین اساس از زیست بسپار ژلاتین و اسانس اسطوخودوس استفاده گردید. در این پژوهش پس از شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس با استفاده از گاز کروماتوگرافی مجهز به طیف سنج جرمی (GC-MS)، برای نخستین بار نانوالیاف ژلاتین حاوی اسانس اسطوخودوس تولید و سپس خواص ضدباکتریایی و مهمترین ویژگی‌های آن مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

ژلاتین خوراکی (Type A, 200 Bloom) از شرکت Gel-Tec (ساخت کره جنوبی)، اسید استیک گلاسیال (۹۹ درصد خلوص)، دی متیل سولفوکسید (99 درصد) و n - هگزان از شرکت مرک (ساخت آلمان) تهیه شدند. باکتری‌های Bristol

میکروب‌های بیماری‌زا با منشا غذایی سهم مهمی در ابتلا افراد به انواع بیماری‌های عفونی و مسمومیت غذایی دارند. بر اساس آمار سازمان بهداشت جهانی، مرگ و میر ناشی از ابتلا افراد به میکروب‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی حدود ۴۲۰۰۰۰ نفر گزارش شده که علاوه بر آن خسارات اقتصادی هنگفتی را تحمیل می‌نماید [۱]. از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا با منشا غذایی می‌توان به *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژنز* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* اشاره نمود [۲]. افزودن نگهدارنده‌های شیمیایی ازجمله رایجترین راه‌های کنترل فساد مواد غذایی است که به دلیل اثرات نامطلوب آن بر سلامت انسان و پیدایش سویه‌های مقاوم نگرانی‌های فزاینده‌ای را ایجاد کرده‌است. به همین دلیل امروزه نگهدارنده‌های طبیعی به دلیل ماندگاری، خواص ضد میکروبی و عوارض جانبی اندک از سوی تولید کنندگان و مصرف‌کنندگان مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۳]. اسانس‌ها ترکیبات حاصل از متابولیت ثانویه گیاهان هستند و معمولاً به عنوان طعم‌دهنده در تهیه غذاهای مختلف استفاده می‌شوند. مطالعات متعدد اثرات ضد میکروبی، ضد انگلی، آنتی‌اکسیدانی و حشره‌کشی اسانس‌ها را تأیید نموده است [۴، ۵]. اسطوخودوس ازجمله گیاهان دارویی متعلق به خانواده لامیناسه است که به عنوان یک گیاه زینتی در بسیاری از کشورهای مناطق اروپایی، شمال آفریقا، جنوب غربی آسیا، همچنین هند، ایران، و چین کشت می‌شود [۴]. اسانس اسطوخودوس با عطر مطلوب آن شناخته شده و به طور گسترده در صنایع عطرسازی، لوازم آرایشی و نیز به عنوان طعم دهنده کاربرد دارد. گزارش شده اسانس اسطوخودوس دارای اثرات آرام بخشی، ضدافسردگی، ضد- التهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر بسیاری از گونه- های قارچی و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها است [۴، ۶].

با این حال، به دلیل اثر گذاری اسانس‌ها بر طعم مواد غذایی، افزودن مستقیم آنها با محدودیت روبرو است. از سوی دیگر اسانس‌ها دارای ماهیت آب‌گریزی هستند که منجر به کاهش

۲-۴- ساختار شناسی نانوالیاف

شکل ظاهری و ضخامت نانوالیاف تولید شده با استفاده از تصویر برداری الکترونی روبشی (SEM^2) انجام شد. ابتدا نانوالیاف توسط مخلوط طلا و پالادیوم به ضخامت 20 nm پوشش داده شده و سپس تحت ولتاژ 20 eV و فاصله کاری 10 mm به کمک SEM (مدل LEO 1450 VP، ساخت آلمان) تصویر برداری شد. قطر نانو الیاف به کمک نرم افزار Image J و با میانگین‌گیری ضخامت تعداد ۵۰ لایف صورت پذیرفت [۸].

۲-۵- پراش اشعه ایکس (XRD^3)

نمونه‌های نانوالیاف تهیه شده با استفاده از دستگاه اشعه ایکس (Panalytical، لهستان) با طول موج $1.54\text{ \AA}$ و تحت زاویه $5^\circ - 45^\circ$ بررسی شدند [۷].

۲-۶- ویژگی‌های مکانیکی

رفتار مکانیکی نانوالیاف با استفاده از دستگاه آنالیز بافت (مدل RS-232 LLOYD، آمتک، انگلستان) مورد مطالعه قرار گرفت. ضخامت نمونه‌ها ($10 \times 6\text{ mm}$) در 10 نقطه اندازه‌گیری و به منظور یکسان‌سازی رطوبت، قطعات نانو الیاف به مدت 24 h در داخل دسیکاتور با رطوبت نسبی 75% (حاوی محلول اشباع کلرید سدیم) قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در داخل فک‌های دستگاه با فاصله 50 mm ، سرعت سر 6 mm/min و لودسل 50 N قرار داده شدند. آزمون در 3 تکرار انجام شد [۸].

۲-۷- راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشینه و محتویات اسانس اسطوخودوس در نانوالیاف مطابق روش توسلی و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات ارزیابی شد [۱۲]. ابتدا اسانس آزاد روی سطح نانوالیاف، به کمک حلال اتانول حذف گردید. سپس مقدار 50 mg نانوالیاف در 5 mL اتانول حل و جذب به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (Gold Spectrumbab 54، آمریکا) در طول موج 275 nm تعیین گردید. غلظت اسانس با استفاده از منحنی کالیبراسیون ($R^2 = 0.99$) اندازه‌گیری و راندمان

Bacillus, *Staphylococcus aureus* A9596 (*S. aureus*) ATCC (*E. coli*), *cereus* ATCC 9634 (*B. cereus*) *Salmonella typhimurium* و *Escherichia coli* 25922 ATCC 14028 (*S. typhimurium*) از گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، تمامی محیط‌های کشت از برند سیگما آلدریج (ساخت ایالات متحده آمریکا) و اسانس اسطوخودوس از شرکت رایحه سلامت (ایران) تهیه شدند.

۲-۲- شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از $GC-MS^1$

ترکیبات اسانس اسطوخودوس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 7890A - آمریکا) متصل به ردیاب جرمی (Agilent 5975C)، مجهز به ستون (250 m μ HP-5MS $30\text{ m} \times$) تعیین گردید. گاز هلیوم $99/99\%$ درصد خلوص) به عنوان حامل با سرعت 1 ml/min - 0.9 به ستون با دمای متغیر 40°C تا 280°C تزریق شد. دمای انژکتور و آشکارساز به ترتیب 280°C و 250°C تنظیم گردیدند. انرژی یونیزاسیون طیف‌سنج جرمی 70 eV بود و ترکیبات اسانس با استفاده از کتابخانه طیف NIST⁰⁸ (موسسه ملی استاندارد و فناوری، MD، Gaithersburg، ایالات متحده آمریکا) شناسایی شدند [۱۱].

۲-۳- تهیه نانوالیاف به روش الکترورسی

جهت تولید نانوالیاف الکترورسی شده ژلاتین (GNF)، محلول ژلاتین به نسبت 15% w/v در اسید استیک گلاسیال (40%) تحت دمای 40°C به مدت 30 min تهیه شد. بر اساس آزمایشات اولیه، اسانس اسطوخودوس در غلظت‌های صفر، $2/5$ ، $5/0$ و $10/0\%$ جایگزین محلول اسید استیک گردید. هدایت الکتریکی محلول نانو الیاف با استفاده از هدایت‌سنج دیجیتال (مدل ۱۰۳، تایوان) اندازه‌گیری و تحت ولتاژ 15 Kv ، سرعت جریان 0.4 mL/h ، فاصله 170 mm نوک سوزن تا کلکتور، الکترورسی گردید. به منظور حذف حلال باقیمانده الیاف تولید شده به مدت 24 h در داخل دسیکاتور نگهداری شدند [۵].

2 - Scanning electron microscope

3 - X-ray diffraction

1-Gas chromatography-mass spectrometry

انکپسولاسیون و محتویات روغن با استفاده از فرمول‌های ذیل محاسبه شدند:

وزن اسانس اولیه / وزن اسانس در نانوالیاف = راندمان $\times 100$ (انکپسولاسیون (%))

وزن اسانس نانوالیاف قبل از شستشو با اتانول / وزن اسانس $\times 100$ (در نانوالیاف) = محتویات روغن (%)

۸-۲- فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف به روش انتشار

دیسک

فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف تهیه شده به روش انتشار دیسک مطابق روش قاسمی و همکاران (۲۰۲۲) در برابر دو سویه گرم مثبت (*S. aureus* و *B. cereus*) و دو سویه گرم منفی (*E. coli* و *S. typhimurium*) انجام شد [۸]. ابتدا جهت حذف آلودگی‌های میکروبی احتمالی، دیسک‌های نانو الیاف (قطر ۸mm) به مدت ۱ ساعت تحت تابش نور UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) قرار گرفتند. سپس بر سطح محیط کشت آگار مغذی تلقیح شده با $100 \mu\text{L}$ باکتری هدف حاوی CFU/mL

10^6 – 10^5 (۰/۵ مک فارلند) منتقل شدند. پلیت‌ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری و فعالیت ضدباکتریایی براساس قطر ناحیه بازدارنده (بر حسب mm) ارزیابی گردید.

۹-۲- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون توکی انجام شد. بدین منظور از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ (SAS Institute INC، آمریکا) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. تمام آزمایشات در سه تکرار اجرا و نتایج بصورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد بیان شدند.

۳- نتایج و بحث

۱-۳- آزمون GC-MS

نتایج حاصل از آنالیز GC-MS اسانس اسطوخودوس در جدول ۱ آورده شده است. در مجموع ۲۷ ترکیب شیمیایی مختلف با سهم ۹۸/۸۳٪ از کل اجزاء اسانس شناسایی گردید.

Table 1 Chemical composition of LEO using GC-MS chromatography

No	Compounds	RT (min)	Area (%)
1	α -Thujene	9.84	0.29
2	α -Pinene	9.98	0.50
3	β -Pinene	11.66	0.22
4	3-Octanone	11.93	0.51
5	β -Myrcene	11.93	0.68
6	n-Hexyl acetate	12.53	0.73
7	D-Limonene	13.09	0.62
8	Eucalyptol	13.17	0.85
9	α -trans-Ocimene	13.28	4.73
10	β -trans-Ocimene	13.41	0.72
11	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl	13.49	1.62
12	cis-Ocimene	13.57	2.02
13	Linalool	15.15	35.21
14	Norbonan	15.68	0.96
15	Camphor	15.82	0.72
16	β -Myrcene	16.63	0.85
17	Borneol	16.94	1.23
18	lavandulol	17.43	1.05

19	α -Terpineol	18.01	1.83
20	Linalyl acetate	19.30	26.47
21	Nerol	20.11	3.94
22	Geranyl acetate	22.64	0.86
23	Santalol	23.75	0.59
24	Trans- β - Caryophyllene	23.92	5.39
25	β - Farnesene	24.52	4.83
26	Germacrene-D	25.45	0.64
27	Caryophyllene oxide	28.04	0.77
Total		98.83	

۳-۲- ساختار و قطر و نانوالیاف ژلاتین

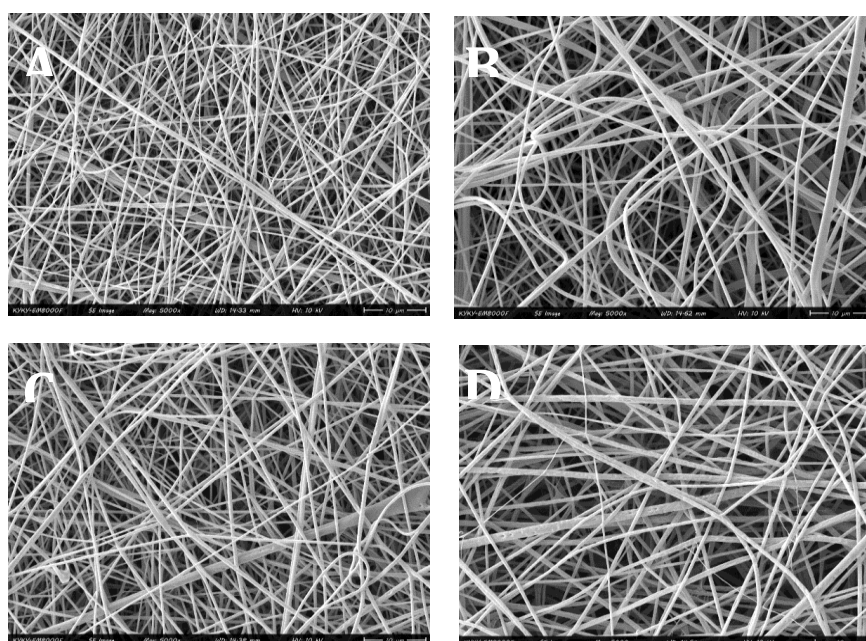


Fig 1 SEM images of the nanofiber with different LEO concentrations

(A: 0%; B: 2.5% ; C: 5% ; and D: 10%).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی نانوالیاف حاوی غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس در شکل (A-C) آورده شده است.

تصاویر نشان می‌دهند تمامی نانوالیاف بدون گویچه و دارای ساختار یکنواخت و پیوسته هستند، که نشان دهنده عدم تاثیرگذاری اسانس بر شکل نانو الیاف است.

دو ترکیب شیمیایی لینالول (۳۵/۲۱٪) و لینالیل استات (۲۶/۴۷٪) سهمی بیش از ۶۰٪ ترکیبات را بخود اختصاص دادند. تحقیقات مشابه نشان داده، لینالول و لینالیل استات ترکیبات اصلی اسانس اسطوخودوس هستند هر چند در نوع و مقدار برخی ترکیبات با یکدیگر تفاوت‌هایی نشان دادند [۱۳، ۱۴]. اختلاف در ترکیبات شیمیایی اسانس‌های یک گیاه را می‌توان به عوامل مختلفی مانند نژاد، بخش گیاه مورد استفاده، شرایط آب و هوایی، منطقه جغرافیایی، شرایط کشت و برداشت، نیز روش استخراج و نگهداری اسانس اشاره نمود [۹، ۱۱، ۱۵].

Table 2. Electrical conductivity (EC) of LEO loaded gelatin solutions and average diameter of nanofibers.

Nanofiber	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Average diameter (nm)
Gelatin+ LEO (0.0 %)	43.4 ± 0.3^A	431.5 ± 15.2^A
Gelatin+ LEO (2.5 %)	36.6 ± 0.1^B	477.4 ± 14.3^A
Gelatin+ LEO (5 %)	34.9 ± 0.6^C	528.6 ± 12.7^A
Gelatin+ LEO (10 %)	30.7 ± 0.2^D	705.3 ± 18.6^A

The values are the means $\pm$ SD, (n=3). Means followed by different uppercase indicate significant differences in column ($P < 0.05$).

ساختار بلوری اجزاء نانوالیاف ژلاتین (شکل ۲) به کمک آزمون XRD بررسی گردید. مقایسه نمودارهای بدست آمده، شباهت رفتاری یکسانی را نشان می‌دهد. تمامی نمودارها در ناحیه $2\theta = 13^\circ - 28^\circ$ برجستگی مهمی را نشان می‌دهند که مربوط به ساختار کریستالی مارپیچ سه‌گانه ماکرومولکول ژلاتین است [۷]. افزودن اسانس باعث افزایش اندک ناحیه مارپیچ سه‌گانه گردید، که احتمالاً به دلیل تغییر ساختار مارپیچ سه‌گانه تحت تأثیر اسانس اسطوخودوس بوده که می‌تواند بر خواص مکانیکی نانوالیاف نیز موثر باشد. گزارش مشابهی از افزودن اسانس نعنا بر نانوالیاف ژلاتین در دسترس است [۱۶]. در گزارشی دیگر بیان شده است که افزودن کورکومین به نانوالیاف ژلاتین/کیتوزان بر ساختار نانوالیاف بی‌تأثیر بود [۷]. این اختلاف در نتایج، احتمالاً ناشی از تفاوت در خواص شیمیایی زیست‌بسیار و عامل فعال بوده است [۸، ۱۷].

جدول ۲ نشان دهنده نتایج حاصل از ارزیابی ضخامت نانوالیاف و هدایت الکتریکی محلول الکترووریسی است. با افزایش غلظت اسانس از صفر به ۱۰٪، قطر نانوالیاف از $431.5/5$ به $705.3/3$ nm افزایش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش هدایت الکتریکی محلول الکترووریسی از $43/4$ به $30/7$ $\mu\text{S}/\text{cm}$ باشد. به طور کلی، کاهش هدایت الکتریکی محلول باعث کاهش توزیع بار الکتریکی در ناحیه جت دستگاه می‌گردد که در نتیجه، مقدار نیروهای کششی وارده بر نانوالیاف کاهش یافته و منجر به افزایش ضخامت می‌گردد [۵، ۸]. در گزارشاتی مشابه با افزایش غلظت اسانس گلیسر [۵] و پرتغال [۱۲] ضخامت نانوالیاف الکترووریسی شده ژلاتین افزایش یافت.

۳-۳- نتایج XRD

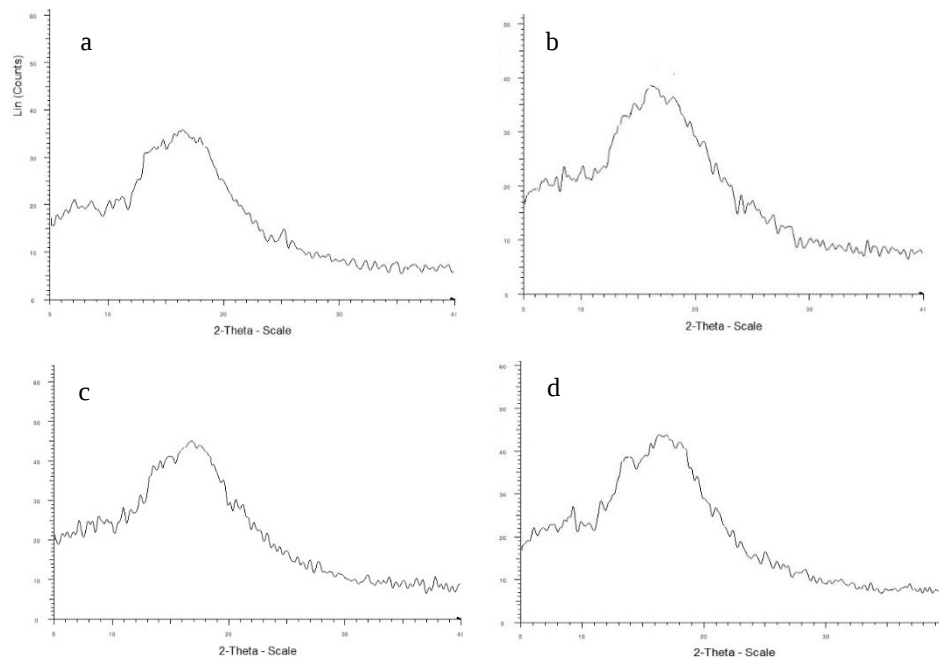


Fig 2: XRD diffractograms of different GNFs, **a:** Gelatin+ LEO (0 %), **b:** Gelatin+ LEO (2.5 %), **c:** Gelatin+ LEO (5 %), **d:** Gelatin+ LEO (10 %).

مقاومت کششی و مدول یانگ در مقایسه با نمونه فاقد اسانس گردید ($p < 0.05$). اسانس‌ها تا حدودی دارای خاصیت نرم کنندگی پلیمرهای زیستی هستند که این نقش را با قرارگیری درحد فاصل ماکروملکول‌های ساختمان پلیمر اعمال می‌کنند [۱۶]. با این وجود گزارش شده شدت تاثیرگذاری تابع نوع، غلظت اسانس و درجه برهمکنش اجزا افزوده شده به پلیمر زیستی است [۱۶، ۸، ۱۸].

۳-۴- ویژگی‌های مکانیکی نانوالیاف‌های ژلاتین

از فاکتورهای مهم انتخاب لفاف بسته‌بندی مواد غذایی، خواص مکانیکی آن است. ارزیابی شاخص‌های مکانیکی نانوالیاف‌های تهیه شده در جدول ۳ آورده شده است. بیشترین مقادیر سختی ($31230.4/12.7$ N/m) و مدول یانگ ($462.0/8.1$ Mpa) توسط نانوالیاف فاقد اسانس (Gelatin+ LEO (0%)) ثبت شد ($p < 0.05$). افزودن اسانس باعث کاهش معنادار مقادیر

Table 3. Mechanical characteristics of nanofibers containing different concentration of LEO

Nanofiber	Stiffness (N/m)	Tensile Strength (MPa)	Modulus (Mpa)
Gelatin+ LEO (0 %)	31230.4 ± 12.7^A	0.11 ± 0.04^C	462.0 ± 8.1^A
Gelatin+ LEO (2.5 %)	954.6 ± 18.3^D	0.17 ± 0.03^{BC}	14.8 ± 6.8^C
Gelatin+ LEO (5 %)	2694.3 ± 23.5^C	0.20 ± 0.05^{AB}	35.3 ± 9.5^B
Gelatin+ LEO (10 %)	3979.2 ± 29.6^B	0.25 ± 0.05^A	37.2 ± 5.3^B

The values are the means $\pm$ SD, (n=3). Means followed by different uppercase indicate significant differences in column ($P < 0.05$).

($p < 0.05$). نتایج مقادیر مقاومت کششی (جدول ۲) نشان می‌دهند افزایش غلظت اسانس از ۰ به ۱۰٪ روند افزایشی آرامی ($0.25/0.11$ MPa) را موجب گردید، بطوری‌که بیشترین مقادیر در نمونه‌های Gelatin+ LEO (5 %) و Gelatin+ LEO

با افزایش غلظت اسانس محلول الکتریسی از ۲/۵ تا ۱۰٪، روند افزایشی در مقادیر سختی ($3979.2/954.6$ N/m) و مدول یانگ ($37.2/14.8$ MPa) نانوالیاف مشاهده گردید

کنترل رشد میکروب‌های مولد فساد نقش کلیدی در کاربرد غذایی نانوالیاف دارد. نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی نانوالیاف ژلاتین حاوی اسانس اسطوخودوس در برابر برخی باکتری‌های مولد فساد غذایی (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* and *S. typhimurium*) در جدول ۵ آورده شده است. نمونه Gelatin+ LEO (0 %) اثر ضدباکتریایی نشان نداد در حالیکه با افزایش غلظت اسانس در نانوالیاف ژلاتین از ۲/۵ به ۱۰٪ خاصیت ضدباکتریایی تقویت گردید. در مجموع نانوالیاف حاوی اسانس اسطوخودوس اثر مهارکنندگی بهتری بر باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. cereus*) در مقایسه با گرم منفی (*E. coli* و *S. typhimurium*) نشان دادند. بیشترین اثر ضدباکتریایی (۲۱/۲۲-۴/۲ mm) توسط نمونه Gelatin+ LEO (10 %) در برابر باکتری‌های *S. aureus* و *B. cereus* ثبت گردید. گزارش شده فعالیت ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس به محتوای بالای لینالول و لینالیل استات نسبت داده می‌شود [۸، ۲۱].

Table 5- Encapsulation efficiency and Inhibition zone values (mm) of gelatin nanofibers against target bacteria

Nano fiber	Inhibition zone (mm)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Gelatin+ LEO (0 %)	-	-	-	-
Gelatin+ LEO (2.5 %)	1 2.9 ± 0.7 ^{C,c}	1 2.6 ± 0.4 ^{C,c}	1.8 ± 0.6 ^{C,c}	12.2 ± 0.3 ^{C,c}
Gelatin+ LEO (5 %)	1 7.6 ± 0.6 ^{B,b}	1 7.2 ± 0.8 ^{B,b}	6.7 ± 0.4 ^{B,b}	16.9 ± 0.5 ^{B,b}
Gelatin+ LEO (10 %)	2 2.2 ± 0.4 ^{A,a}	2 1.4 ± 0.6 ^{A,ab}	0.6 ± 0.5 ^{A,b}	20.9 ± 0.4 ^{A,ab}

The values are the means ± SD, (n=3). Means followed by different uppercase and lowercase letters indicate significant differences in column and row, respectively (P < 0.05).

(10 %) بدست آمد ($p < 0.05$). این پدیده احتمالاً از برهمکنش محدود اجزاء اسانس با ساختار پروتئینی بوده که باعث تغییر آرایش زنجیره‌های زیست بسیار و بهبود مقاومت کششی گردیده است [۱۶، ۱۹]. گزارشات مشابهی از روند تغییرات خواص مکانیکی لفاف ژلاتین در دسترس است [۱۶، ۲۰، ۱۸].

۳-۵- راندمان ریزپوشانی و محتوای اسانس نانوالیاف

راندمان ریزپوشانی و محتوای اسانس نانوالیاف، از پارامترهای مهم ارزیابی فعالیت ضد میکروبی هستند [۸]. جدول ۴ نتایج حاصل از اندازه‌گیری راندمان و محتوای اسانس نانوالیاف تهیه شده را نشان می‌دهد. بیشترین (۹۹/۱٪) و کمترین مقدار راندمان ریزپوشانی به ترتیب در نمونه‌های Gelatin+ LEO (2.5 %) و Gelatin+ LEO (10 %) مشاهده شد. با افزایش درصد اسانس محلول الکتروریسی، محتوای اسانس نانوالیاف نیز روند افزایشی معناداری را نشان داد ($p < 0.05$)، بطوری‌که بیشترین مقدار (۱۴/۶٪) در نمونه Gelatin+ LEO (10 %) ثبت شد ($p < 0.05$) و همکاران [۱۷] راندمان ریزپوشانی اسانس اسطوخودوس در مالتودکسترین را حدود ۹۱٪ گزارش نمودند. در گزارشی دیگر راندمان ریزپوشانی و محتوای اسانس پرتغال در زیست بسیار ژلاتین به ترتیب حدود ۶۹ و ۲۶٪ گزارش گردید [۱۲]. این نتایج نشان می‌دهند الکتروریسی پروتئین ژلاتین کارایی مناسبی جهت ریزپوشانی اسانس اسطوخودوس دارد.

Table 4. The encapsulation efficiencies (EE) and LEO contents (LC) of gelatin nanofibers.

Nanofiber	EE (%)	LC (%)
Gelatin+ LEO (2.5 %)	99.1±0.2 ^A	4.7 ± 0.1 ^C
Gelatin+ LEO (5 %)	96.9±0.2 ^B	8.9 ± 0.2 ^B
Gelatin+ LEO (10 %)	87.4±0.3 ^C	14.6 ± 0.2 ^A

The values are the means ± SD, (n=3). Means followed by different uppercase indicate significant differences in column (P < 0.05).

۳-۶- فعالیت ضدباکتریایی

ژلاتین بارگذاری شد. مهمترین اجزاء شیمیایی اسانس اسطوخودوس لینالول و لینالیل استات بود. به لحاظ ساختارشناسی تمامی نانوالیاف ساخته شده دارای بافت یکنواخت و فاقد گویچه بودند. همچنین افزودن اسانس تغییر مهمی در ساختار آمورف نانوالیاف ایجاد نکرد که با آزمون پراش اشعه ایکس تایید شد. با افزایش غلظت اسانس در محلول الکتروریسی مقادیر ضخامت و محتویات اسانس نانوالیاف افزایش یافت. نمونه‌های حاوی اسانس اسطوخودوس سختی کمتری در مقایسه با نمونه فاقد اسانس ثبت نمودند. نتایج آزمون ضدباکتریایی نشان داد که نانوالیاف حاوی اسانس اسطوخودوس دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند. با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان داشت احتمالاً نانوالیاف الکتروریسی حاوی اسانس اسطوخودوس را بتوان به عنوان یک بسته بندی فعال برای مواد غذایی چون پنیر، گوشت و برخی محصولات غذایی دیگر در نظر گرفت. بدیهی است نتیجه‌گیری نهایی نیازمند بررسی‌های دقیق بالینی و در محیط‌های واقعی است.

۵- سپاسگزاری

این پژوهش با بهره‌گیری از گرنت شماره UOZ-GR-9955 اجرا گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل اعلام می‌دارند.

ترکیبات ترپنی و فنلیک اسانس‌ها به دلیل خاصیت آب‌گریزی می‌توانند از دیواره سلولی باکتری‌ها عبور نموده و وارد سلول شوند. وجود ترکیبات لیپوپلی‌ساکاریدی در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی، تا حدودی مانع ورود این ترکیبات می‌شود که نتیجه آن افزایش مقاومت سلول در برابر عوامل ضدباکتریایی است. با این حال ترکیبات کوچک ملکول و آب دوست از کانال‌های پورین عبور نموده و با اختلال در فعالیت‌های درون سلولی باعث مرگ سلولی می‌شوند [۱۵]. همچنین ترکیبات موجود در اسانس‌ها با تخریب نظم ملکولی غشاء سیتوپلاسمی باعث افزایش نفوذپذیری می‌گردند که نتیجه آن تخلیه یونی و ATP، اختلال در فعالیت غشای سیتوپلاسمی و سنتز DNA است. هرچند می‌بایست به نوع، غلظت و برهمکنش ترکیبات اسانس با اجزاء محیطی نیز توجه داشت [۲۲]. تاکنون اثر ضدباکتریایی نانوالیاف ژلاتین حاوی اسانس اسطوخودوس گزارش نشده است. حاجیلی و همکاران (۲۰۱۶) اثر ضدباکتریایی نانوالیاف آلژینات حاوی اسانس اسطوخودوس را در برابر *S. aureus* گزارش نمودند [۲۳]. در تحقیقی دیگر اثرات ضدباکتریایی نانوامولسیون اسانس اسطوخودوس در برابر برخی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت منتشر شده است [۲۴]. این گزارشات با نتایج بدست آمده در این پژوهش هم راستا هستند.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش برای نخستین بار اسانس اسطوخودوس (در غلظت‌های صفر تا ۱۰٪) به روش الکتروریسی در نانوالیاف

۶- منابع

- [1]World Health Organization [WHO]. 2022. Estimating the burden of foodborne diseases. Available from: <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>.
- [2]Rapp, J. H. D., Dhawan, S., Gupta, S. K., Gupta, T. B, and Brightwell G. 2023. Molecular detection and characterization of foodborne bacteria: Recent progresses and remaining challenges. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 22, 1463-2487.
- [3] Serwecińska, L. 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health, Water, 12, 3313.
- [4] Batiha, G. E., Teibo, J. O., Wasef, L., Shaheen, H. M., Akomolafe, A. P., Teibo, T. K. A., and et al. 2023. A review of the bioactive components and

- pharmacological properties of Lavandula species, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 396, 877–900.
- [5]Zhou, Y., Miao, X., Lan, X., Luo, J., Luo, T., Zhong, Z., et al. 2020. Angelica essential oil loaded electrospun gelatin nanofibers for active food packaging application, Polymers (Basel), 12: 1-12.
- [6]Kwiatkowski, P., Lopusiewicz, L., Kostek, M., Drozłowska, E., Pruss, A., Wojciuk, B., et al. 2019. The Antibacterial Activity of Lavender Essential Oil Alone and In Combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA Strains, Molecules. 25, 1-15.
- [7]Mengxia, D., Sun, J., Huang, Y., Jiang, H., Hu, Y., Pang, J., and et al. 2023. Electrospun gelatin/chitosan nanofibers containing curcumin for multifunctional

- food packaging, Food Science and Human Wellness, 12, 614-621.
- [8] Ghasemi, M., Miri, M. A., Najafi, M. A., Tavakoli, M., and Hadadi, T. 2022. Encapsulation of Cumin essential oil in zein electrospun fibers: Characterization and antibacterial effect, Food Measure, 16, 1613–1624.
- [9] Mahmood, K., Kamilah, H., Karim, A. A., and Ariffin, F. 2023. Enhancing the functional properties of fish gelatin mats by dual encapsulation of essential oils in β -cyclodextrins/fish gelatin matrix via coaxial electrospinning, Food Hydrocolloids, 137, 108324.
- [10] Li, S., Shi, W., Wang, X., Li, S., Pei, X., and Yifan, He. 2023. Electrospinning of gelatin nanofibers containing sesamol nanoparticles, The Journal of the textile Institute. DOI: 10.1080/00405000.2023.2202113
- [11] Dong, G., Bai, X., Aimila, A., Aisa, H. A., and Maiwulanjiang, M. 2020. Study on lavender essential oil chemical compositions by GC-MS and improved pGC. Molecules, 25, 1-30.
- [12] Kafrani, T., E., Goli, S. A. H., and Fathi, M. 2018. Encapsulation of orange essential oil Using cross-linked electrospun gelatin nanofibers, Food Bioprocess Technol., 11, 427–434.
- [13] Todorova, D., Yavorov, N., Lasheva, V., Damyanova, S., and Kostova, I. 2023. Lavender essential oil as antibacterial Treatment for packaging paper, Coating, 13, 1-12.
- [14] Pokajewicz, K., Bialo, M., Svydenko, L., Fedin, R., and Hudz, N. 2021. Chemical composition of the essential oil of the new cultivars of *Lavandula angustifolia* Mill, Bred in Ukraine,. Molecules, 26: 1-20.
- [15] Fokou, B. H. J., Dongmo, M. J. P., and Boyom, F. F. 2022. Essential Oil's chemical composition and pharmacological properties, 10.5772/intechopen.86573.
- [16] Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Jawad, M., Shah, Y. A., Al-Azri, M. S., Ullah, S., and et al. 2023. A comparative study of the properties of gelatin (porcine and bovine)-based edible films loaded with spearmint essential oil, Biomimetics, 8, 1-16.
- [17] Pilicheva, B., Uzunova, Y., and Katsarov, P. 2021. Comparative study on microencapsulation of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) and peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oils via spray-drying technique, Molecules 26, 7467.
- [18] Rasul, N. H., Asdagh, A., Pirs, S., Ghazanfarirad, N., and Sani, I. K. 2022. Development of antimicrobial /antioxidant nanocomposite film based on fish skin gelatin and chickpea protein isolated containing Microencapsulated *Nigella sativa* essential oil and copper sulfide nanoparticles for extending minced meat shelf life. Mater. Res. Express, 9, 025306.
- [19] Kadam, D., Shah, N., Palamthodi, S., and Lele, S. S. 2018. An investigation on the effect of polyphenolic extracts of *Nigella sativa* seedcake on physicochemical properties of chitosan-based films, Carbohydrate Polym, 192, 347–55.
- [20] Scartazzini, L., Tosati, J. V., Cortez, D. H. C., Rossi, M. J., Flores, S. H., Hubinger, M. D., et al. 2019. Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties, J. Food. Sci. Technol., 56, 4045-4056.
- [21] Walasek-Janusz, M., Grzegorzczak, A., Zalewski, D., Malm, A., Gajcy, S., and Gruszeck, R. 2022. Variation in the Antimicrobial Activity of Essential Oils from Cultivars of *Lavandula angustifolia* and *L. × intermedia*, Agron. 12, 1-13.
- [22] Amor, G., Sabbah, M., Caputo, L., Idbella, M., De Feo, V., Raffaele, P., and et al. 2021. Basil essential oil: composition, antimicrobial properties, and microencapsulation to produce active chitosan films for food packaging, Foods. 10, 1- 16.
- [23] Hajiali, H., Summa, M., Russo, D., Armirotti, A., Brunetti, V., Bertorelli, R., et al. 2016. Alginate–lavender nanofibers with antibacterial and anti-inflammatory activity to effectively promote burn healing, J. Mater. Chem. B, 4: 1686-1695.
- [24] Badr, M. M., Badawy, M. E. I., and Taktak, N. E. M. 2021. Characterization, antimicrobial activity, and antioxidant activity of the nanoemulsions of *Lavandula spica* essential oil and its main monoterpenes, 65, 102732.



Scientific Research

Evaluation of antimicrobial activity and properties of gelatin nanofibers containing lavender essential oil

Ehsan Sadeghi Hamzekhani ¹, Mohammad Ali Najafi ², Mohammad Amin Miri³, Sara Najafi Ghaghelestani ⁴

1- MS Graduate Student, Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

2- Corresponding author: Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Zabol University, Zabol, Iran.

4- PhD Graduate Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2023/6/24

Accepted: 2023/10/19

Keywords:

essential oil,
electrospun fibers,
polymer,
antibacterial activity

DOI: 10.22034/FSCT.21.146.82

*Corresponding Author E-Mail:
m.najafi413@uoz.ac.ir

Lavender essential oil has herbal uses in cosmetic, food and pharmaceutical industries. In this research, for the first time, the encapsulation of lavender essential oil by gelatin biopolymer was done by electrospinning method. At first, the chemical compounds of lavender essential oil were identified with the help of gas chromatography associated with a mass spectrometer (GC-MS) and then 0, 2.5, 0.5 and 0.10% v/v were added to the electrospinning solution. The prepared nanofibers have been evaluated using scanning electron imaging (SEM), thickness determination (Image J), X-ray diffraction, mechanical properties, and essential oil loading efficiency. Also, the antibacterial activity of nanofibers against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* were investigated by disk diffusion method. The most important components of lavender essential oil were linalool (35.21%) and linalyl acetate (26.47%). All nanofibers had a uniform and continuous shape. By increasing the concentration of essential oil in the electrospinning solution, the values of thickness (431.5 - 705.3 nm) and essential oil content (4.7-14.6%) increased. Lavender essential oil had no effect on crystallinity of nanofibers, but caused a significant decrease in Young's modulus and stiffness. The nanofiber sample containing 10% lavender essential oil recorded the highest hardness, Young's modulus and elasticity. Evaluation of antibacterial activities showed that nanofiber samples containing essential oils had appropriate antibacterial activities against all target bacteria. The effectiveness of gelatin nanofiber + lavender essential oil (10%) against *S. aureus* and *B. cereus*. According to the results of the research, it is possible to use gelatin nanofibers containing lavender essential oil for active food packaging. Expressing the definitive result requires conducting clinical and a real environment tests.