

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

شراره لشکرزاده بمی¹، حمید سرحدی^{1*}، عبدالواحد صفرزائی¹

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 تجزیه پذیر در حال انجام است. در این پژوهش، فیلم بسته بندی فعال بر پایه نشاسته ساگو حاوی غلظت های مختلف (1، 1/5 و 2 برابر حداقل غلظت ممانعت کننده رشد) عصاره پنیرباد تهیه گردید. حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و حداکثر غلظت باکتری کشی عصاره ها ارزیابی شد. ویژگی های 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 الاستیسیته) و آنتی اکسیدانی فیلم مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین فعالیت ضد میکروبی فیلم بر روی دو باکتری پاتوژن *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس ارئوس* توسط آزمون دیسک بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت عصاره پنیرباد سبب افزایش معنی دار ($p < 0.05$) 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 سائزری سبب کاهش مقاومت کششی و مدول یانگ و در سوی مقابل سبب افزایش میزان ازدیاد طول تا نقطه شکست گردید. فیلم ساگو حاوی غلظت های 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 می تواند کاربردهای بسته بندی غذایی مختلفی داشته باشد.

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

* مسئول مکاتبات: sarhadi@iaubam.ac.ir

1- مقدمه

میکروارگانیزم‌ها و جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی بسیار مورد توجه صنعتگران امر غذا قرار گرفته است. از جمله ترکیبات نگهدارنده طبیعی با ویژگی ضد میکروبی می‌توان به اسانس‌ها 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، ضد سرطان، ضد استرس و آنتی‌اکسیدان می‌باشد [5]. همچنین مطالعات نشان داده است که این گیاه دارای فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری‌های سالمونلا تیغی‌موریوم⁶ [6]، استافیلوکوکوس ارئوس⁷ [7] و اشریشیاکلی⁸ [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 بلوچستان در استان پهنور سیستان و بلوچستان می‌باشد و عمدتاً 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 ضد میکروب و دارای خواص آنتی‌اکسیدان 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 سالارباشی و همکاران (2014) موفق به تولید فیلم فعال با منشا پلی‌ساکارید محلول سویا و دو اسانس آویشن شیرازی و نعناع شدند [2]. همچنین حیدری مجد و همکاران (2019) به بررسی اثر دو اسانس آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلیمر پلی لاکتیک اسید

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 تخریب پذیر مطرح شد و تحقیقات زیادی به منظور ساخت و توسعه آن صورت گرفت [1].

بیوپلیمر یک پلیمر طبیعی است و بیوپلیمر زیست تخریب پذیر به پلیمری طبیعی اطلاق می‌گردد که بتواند توسط میکروارگانیزم‌های موجود در طبیعت تجزیه شود و به محصولات طبیعی مثل آب، دی‌اکسیدکربن 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 تجزیه پذیر می‌باشد که به تازگی جایگاه ویژه‌ای را در ساخت فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی به خود اختصاص داده است.

نخل ساگو متعلق به جنس متروکسیلون¹ 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

3. *Withania Somnifera*
4. *Solanaceae*
5. *Ayurveda*
6. *Salmonella typhimurium*
7. *Staphylococcus aureus*
8. *Escherichia coli*

1. *Metroxylon*
2. *Palmae*

بودند. معرف فولین سیوکالچو، 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 برات⁴ از کمپانی مرک آلمان و 2و2-دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، پلاستی سایزرگلیسرول و توئین 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)، باسیلوسسرتوس (ATCC 11778)، استافیلوکوکوساورتوس (ATCC 25923) و سودوموناس آئروژینوز⁶ (ATCC 27853) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیده بودند.

2-2- روش‌ها

2-2-1- استخراج عصاره

برگ‌های گیاه پنیرباد از 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 تغلیظ عصاره توسط تبخیر کننده چرخشی تحت خلاء در دمای 40 درجه سلسیوس با هدف ممانعت از آسیب به ترکیبات فنلی و 200 دور در دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ 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 عصاره تا 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 کنترل میزان ورود و خروج رطوبت و گازها و همچنین از طریق رهایش کنترل شده ترکیبات فعال سبب افزایش ماندگاری مواد غذایی نظیر گوشت طیور و آبزیان می‌گردند لذا در این مطالعه به امکان‌سنجی 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 امگا-3 از جایگاه ویژه‌ای در جیره غذایی انسان برخوردار هستند. با این وجود، گوشت ماکیان و آبزیان یک محیط ایده‌آل برای رشد میکروارگانیسم‌هایی از قبیل استافیلوکوکوساورتوس، اشرشیاکلی و غیره می‌باشند زیرا گوشت ماکیان دارای رطوبت زیاد و غنی از مواد نیتروژنی، معدنی، فاکتورهای کمکی رشد و همچنین کربوهیدرات‌های قابل تخمیر (گلیکوژن) می‌باشند. 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 ضد میکروبی 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 غلظت مختلف عصاره گیاه پنیرباد بر روی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و نوری فیلم فعال تولید شده بر پایه نشاسته ساگو می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

کلیه محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده گرید آنالیتیکال¹

1. Analytical Grade

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

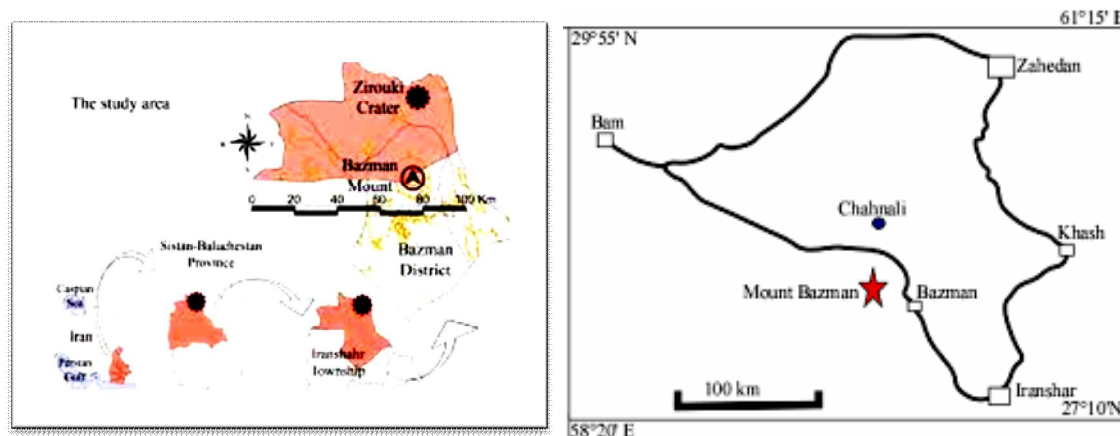


Fig 1 Map of Bazman area of Iranshahr City

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 0/5 میلی‌لیتر 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 تلقیح و سپس لوله‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس جهت رشد باکتریایی انکوبه گردیدند. به میزانی از باکتری‌های رشد یافته به لوله‌های حاوی رینگر استریل اضافه شد تا کدورتی معادل محلول استاندارد نیم مک فارلند حاوی $1/5 \times 10^8$ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر حاصل گردد. به منظور تهیه محلول رینگر به یک قرص رینگر، 500 میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه دوبار تقطیر اضافه شد پس از انحلال کامل قرص در آب مقطر، محلول در لوله‌های در پیچ‌دار تقسیم و درون اتوکلاو استریل گردید.

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد از روش میکرودیولوشن³ استفاده شد. در این روش در میکروپلیت‌های 96 خانه، نخست درون چاهک‌های 12 عددی هر ردیف، میزان 95 میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون براث استریل با غلظت مضاعف اضافه شد. سپس 100 میکرولیتر از غلظت مادر 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره به چاهک اول منتقل و غلظت

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

غلظت مادر 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره پنیرباد با استفاده از دی متیل سولفوکساید 10 درصد آماده گردید و با عبور از فیلتر میکروبی با قطر منافذ 0/45 میکرون استریل شد. استاندارد نیم مک فارلند با اضافه نمودن 9/95 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 1 درصد به 0/05 میلی‌لیتر کلرید باریم 1/175 درصد برای دستیابی به یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری ویژه تهیه گردید. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 625 نانومتر با میزان جذب 0/13 تعیین شد. استاندارد نیم مک فارلند حاوی کدورتی معادل یک سوسپانسیون باکتریایی با $1/5 \times 10^8$ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر می‌باشد [10].

آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و مطابق دستورالعمل ارسالی به شرح ذیل عمل احیاء سوبیه‌های خالص انجام گردید:

جهت بازکردن هر آمپول لیوفیلیزه، قسمت فوقانی آمپول حرارت داده شد و بلافاصله روی قسمت حرارت‌دیده، چند قطره آب مقطر (ترجیحا استریل) ریخته شد تا قسمت حرارت‌دیده در اثر سرد شدن ترک بردارد. سپس با ضربه پنس به بخش ترک خورده،

1. Minimum Inhibitory Concentration
2. Minimum Bactericidal Concentration

3. Microdilution

حرارت داده شد تا فرآیند ژلاتینه شدن کامل شود. در ادامه، 45 درصد وزنی/وزنی پلاستی سائزر گلیسرول به محلول جهت جلوگیری از شکنندگی فیلم‌ها اضافه شد. عصاره پنیرباد در سه سطح غلظت 1، 1/5 و 2 برابر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) به محلول نشاسته ساگو اضافه شد. حجم مناسبی از محلول سازنده فیلم بر روی پلیت شیشه‌ای با ابعاد 20×20 سانتی‌متر مربع و ضخامت 2 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].

2-2-4- اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیلم‌ها

ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر آلتون¹ (ساخت کشور چین) با دقت 0/01 میلی‌متر بررسی شد. اندازه‌گیری در 5 نقطه تصادفی فیلم محاسبه و میانگین آنها گزارش گردید [2].

حلالیت 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 حلالیت در نظر گرفته شد.

به منظور تعیین میزان جذب آب فیلم‌ها، نخست نمونه‌ها (با ابعاد 20×20 میلی‌متر مربع) جهت ایجاد رطوبت نسبی 0 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 55 درصد قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها به طور متوالی وزن شدند تا تعادل حاصل گردد. میزان جذب رطوبت از رابطه زیر به دست آمد [12]:

معادله 1

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

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 مربع) قرار گرفت و بلافاصله 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 میکروپلیت به مدت 7 ثانیه در شیکر الایزا تکان داده شد و میزان کدورت اولیه چاهک‌ها در طول موج 625 نانومتر قرائت گردید. در ادامه میکروپلیت 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 (فاقد رشد باکتری) بودند به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی در نظر گرفته شد [11].

2-2-3- 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

1. Altone

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

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

میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به بخار آب طبق روش اصلاح شده ASTM E96-95 اندازه‌گیری شد [13]. در ابتدا در فنجان‌های شیشه‌ای مقدار 8 میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و سپس سطح فنجان‌ها 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 $gr/s.m^2$) طبق معادله 2، معادل با شیب منحنی تغییرات وزن فنجان به زمان، تقسیم بر سطح فنجان می‌باشد. سطح هر فنجان 0/00280 میلی متر مربع در نظر گرفته شده بود. معادله 2

سطح فنجان / شیب خط = 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 $10^{10} (g/m^2.s.Pa)$) تعیین گردید.

میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به اکسیژن به وسیله دستگاه Mocon Oxtran (Minneapolis, USA 2/21) مجهز به نرم‌افزار Win permTM و با استفاده از روش استاندارد ASTM D3985-05 اندازه‌گیری شد [14]. در ابتدا، نمونه‌های فویل پیچی شده با سطح باز 5 سانتی‌متر مکعب در سل‌های دیفوزیون 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. اندازه‌گیری‌ها در مدت 60 دقیقه و به صورت پیوسته تا حصول تعادل انجام گردید.

2-2-6- 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) ساخت کشور آمریکا) تعیین

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 مربع 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].

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

به منظور انجام این آزمون، فیلم ساگو در ابعاد 5×2 سانتی‌متر مربع بریده شد و سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری فیلم‌های ساگو در طول موج بین 200 تا 1100 نانومتر قرائت شد. کالیبراسیون اسپکتروفوتومتر با هوا انجام گردید.

2-2-8- 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) اندازه‌گیری شد. فیلم‌ها (با ابعاد 5×1 سانتی‌متر مربع) 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 حداکثر نیرو در نقطه پاره شدن²، افزایش طول تا نقطه شکست³ و مدول یانگ⁴ بر اساس دستورالعمل روش استاندارد ASTM-D882-02 محاسبه گردیدند [15].

2-2-9- تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها در برابر باکتری‌های پاتوژن اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس به کمک روش انتشار از دیسک به آگار بررسی شد [1]. در ابتدا از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی (حاوی 10^8 cfu/ml) از باکتری‌های مذکور (مقدار 100 میکرولیتر به محیط کشت مولر هیتون آگار انتقال و کشت سطحی داده شد. سپس فیلم‌های بریده شده به

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

معادله 4

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

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 کاملا تصادفی انجام پذیرفت. میانگین‌ها در سطح احتمال خطای 5 درصد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

3- نتایج و بحث

3-1- تعیین MIC و MBC عصاره پنبه‌باد

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره اتانولی برگ پنبه‌باد 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 پنبه‌باد از روی غلظت‌های سریالی یک دوم تهیه شده از غلظت مادر 200 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در چاهک‌های ده‌گانه هر ردیف از میکروپلیت به ترتیب 100، 50، 25، 12/5، 6/25، 3/125، 1/56، 0/78، 0/39 و 0/19 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 ضدباکتریایی عصاره بودند. به عبارتی، باکتری‌های گرم منفی حساسیت کمتری نسبت به عصاره گیاه پنبه‌باد از خود نشان دادند. این امر به دلیل وجود دیواره اضافی در باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که در برابر ترکیبات ضد میکروبی ایجاد مقاومت بیشتری می‌نماید. به عبارتی وجود این غشای اضافی سبب می‌شود که ترکیبات آبرگیز دارای خاصیت ضد میکروبی 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 دیجیتالی بر حسب میلی‌متر مربع اندازه‌گیری شد.

2-2-10- ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فیلم

محتوای فنولی کل نمونه‌ها به روش فولین سیوکالچو مطابق با روش حیدری مجد و همکاران (2019) اندازه‌گیری 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 قرارگرفتن 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 اسپکتروفتومتر 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، 0/25 گرم نمونه در 4 میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت 5 دقیقه هم‌زده شد. محلول حاصل با 1 میلی‌لیتر از محلول 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:

حلالیت از مهمترین پارمترهای کلیدی یک فیلم می باشد که کاربرد آن را تعیین می نماید. جدول 2، نتایج حلالیت در آب فیلم های نشاسته ساگو را نشان می دهد. 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 تشنه داری مشاهده شد [20]. همچنین افزودن غلظت های 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 رشته ای پلیمر نشاسته سبب کاهش اتصالات عرضی می شود و در پی آن، حلالیت در آب فیلم نشاسته ساگو افزایش می یابد. 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 می توان از طریق تعیین میزان زاویه تماس بررسی نمود. جدول 2، میزان آبگریزی فیلم نشاسته ساگو حاوی غلظت های مختلف عصاره پنیرباد را نشان می دهد. نشاسته ساگو خالص، زاویه تماس 45 درجه را نشان می دهد که این مقدار حاکی از آبدوستی سطح نشاسته ساگو می باشد (جدول 2). این مقدار قابل مقایسه با زاویه تماس (41/9) نشاسته ساگو بدست آمده در پژوهش سونداری¹ و همکاران (2018) می باشد [21]. ظرفیت جذب آب زیاد گلیسرول (پلاستی سایزر) بکاربرده شده در ساخت فیلم و همچنین وجود گروه های عملکردی آبدوست موجود در ساختار پلیمر نشاسته ساگو می تواند دلیلی بر میزان بالای آبدوستی این فیلم باشد. افزودن غلظت های مختلف عصاره پنیرباد سبب افزایش میزان زاویه تماس فیلم گردید. علت افزایش آبگریزی سطح با افزایش غلظت عصاره پنیرباد می تواند به علت وجود ترکیبات آبگریز در ساختار عصاره باشد. همچنین به علت پیوند میان گروه های OH آزاد موجود در نشاسته ساگو با گروه های عملکردی موجود در عصاره پنیرباد سبب می شود که این گروه های آبدوست از دسترس خارج گردند و بنابراین میزان آبدوستی سطح کاهش یابد.

در عصاره ها و اسانس های 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>

3-2- ویژگی های فیزیوشیمیایی فیلم های فعال نشاسته ساگو

فیلم نشاسته ساگو تولید شده توسط روش قالب گیری (کاستینگ) دارای سطوح صاف و شفاف بود و از انعطاف پذیری خوبی برخوردار بود. این فیلم ها به راحتی از پلیت جدا شدند. مقادیر ضخامت نمونه ها در جدول 2 گزارش شده است. نمونه شاهد (فیلم فاقد عصاره پنیرباد) دارای قطر 0/090 میلی متر بود. افزایش غلظت های 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 غلظت های مختلف عصاره آویشن مشاهده شد [18]. افزایش نسبی ماده خشک فیلم می تواند دلیلی بر افزایش ضخامت فیلم با افزودن عصاره باشد. نتایج میزان جذب آب فیلم های نشاسته ساگو حاوی عصاره پنیرباد در جدول 2 گزارش شده است. افزودن غلظت های مختلف عصاره پنیر باد هیچ روند قابل ملاحظه معنی داری ($p < 0/05$) را بر میزان جذب رطوبت فیلم نشان نداد. افزودن 1، 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 اوکالیپتوس به فیلم نشاسته تاپیوکا گزارش نمودند [19]. عصاره پنیرباد از یک سو قادر است که با کاهش اتصالات عرضی در بین زنجیره های نشاسته سبب افزایش گروه های 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 خوراکی 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 مانگین 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 باندهای 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 نظیر اکسیداسیون آنزیمی و اکسیداسیون چربی‌ها می‌باشد و همچنین رشد میکروارگانیسم‌ها را تسریع 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 تاپوکا در اثر افزودن عصاره اوکالیپتوس مشاهده گردید [24].

نتایج مشابه توسط جارامیلو¹ و همکاران (2015) بر روی مطالعه فیلم نشاسته کاساوا 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 ($10^{10} [0/92(g m/m^2.s.Pa)]$) مشاهده گردید. نتایج مشابه در افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم فعال سلولز باکتریایی در اثر افزودن عصاره گیاه‌تشنه‌داری مشاهده شد [20]. گسیختگی ساختار و کاهش فشردگی ساختار فیلم در اثر افزودن عصاره می‌تواند دلیلی بر افزایش نفوذپذیری به بخار آب فیلم فعال 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 پلاستی‌سایزر 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 آبر با اثر

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

Oxygen Permeability (g m/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).

3-5- 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 مگا پاسکال) در فیلم نشاسته ساگو حاوی 2MIC عصاره پنیرباد مشاهده شد. این نتایج با نتایج بونیللا¹ 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 تخریب شبکه فیلم در نتیجه افزودن عصاره پنیرباد باشد. مقاومت کششی، وابسته به هم‌پیوستگی زنجیره‌های پلیمر در ماتریکس ورقه‌ای می‌باشد. از این رو، 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 (12/2 درصد)، مربوط به نمونه فیلم حاوی 2 MIC عصاره پنیرباد و کمترین مقدار (3/8 درصد) مربوط به فیلم شاهد 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 برهمکنش-های مناسب بین رشته‌های بیوپلیمر سبب افزایش ازدیاد طول تا

3-4- رنگ‌سنجی

یکی از شاخص‌های مهم در بازار پسندهای 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 L* (شفافیت)، a* (قرمزی) و b* (زردی) در جدول 4 نمایش داده شده است. نتایج آنالیز رنگ نشان داد که با افزایش درصد عصاره از 1 MIC به 2 MIC شاخص L* که مبین 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 شاهد مشاهده شد اما با افزودن عصاره پنیرباد، پارامترهای a* و b* افزایش یافتند. در مطالعات قبلی نیز کاهش شاخص L* در اثر افزودن عصاره‌های مختلف به فیلم خوراکی گزارش شده‌اند [20]. اضافه‌کردن 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 فعال 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 سالارباشی 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 1 MIC به 2 MIC به طور معنی داری ($p < 0.05$) باعث کاهش مدول یانگ گردید. نتایج مشابه در کاهش مدول یانگ بر اثر افزودن عصاره تشنه‌داری به فیلم سلولز باکتریایی مشاهده شد [19].

نقطه شکست گردیده است. نتایج مشابه در افزایش میزان ازدیاد طول تا نقطه شکست در اثر افزودن عصاره برگ فوفل (نخل هندی) به فیلم بر پایه نشاسته ساگو مشاهده شد [24]. مدول یانگ یا مدول الاستیسیته، نسبت تنش کششی به کرنش کششی است در حالتیکه رابطه بین این دو خطی باشد و از شیب منحنی تنش-کرنش حاصل می‌گردد و معمولاً برحسب 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±25.1b ^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 ($p < 0.05$).

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

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

3-6- تاثیر عصاره پنیرباد بر میزان جذب و عبور

ماوراءبنفش فیلم نشاسته ساگو

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

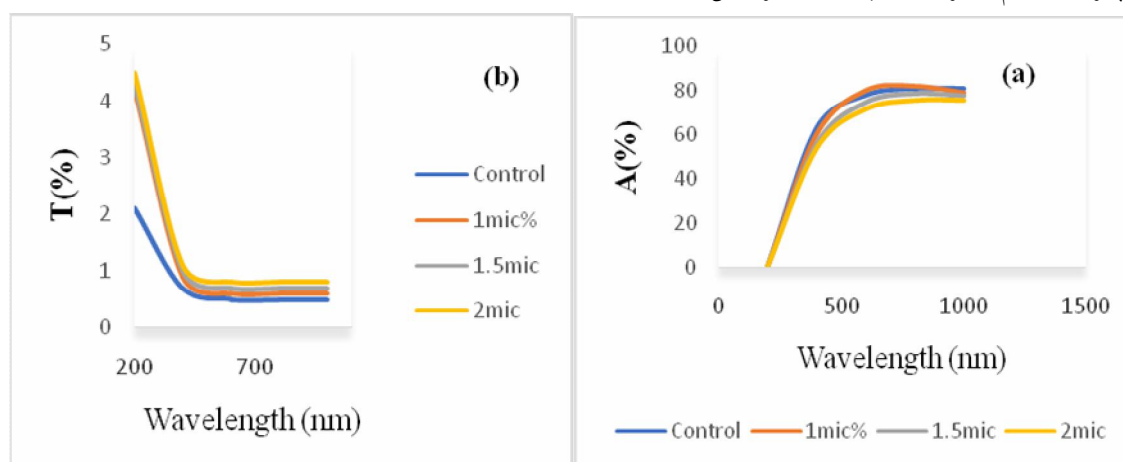


Fig 2 Amount of absorption (a) and transmission (b) ultraviolet of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

3-7- فعالیت ضد میکروبی فیلم

نتایج آزمون ضد میکروبی فیلم فعال نشاسته ساگو حاوی غلظت‌های مختلف عصاره پنیرباد در برابر باکتری‌های بیماری‌زا /شریشیاکلی و استافیلوکوکوساورئوس در جدول 5 گزارش شده است. فیلم خالص نشاسته ساگو هیچگونه فعالیت ضد میکروبی از خود نشان نداده است. افزودن ترکیبات ضد میکروبی 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 /شریشیاکلی هیچ اثر ضد باکتریایی نشان نداد (عدم ایجاد هاله). با این وجود با افزایش غلظت عصاره پنیرباد تا 1/5 MIC فعالیت ضد میکروبی معنی‌داری ($P < 0.05$) بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و /شریشیاکلی مشاهده شد. افزایش غلظت تا 2MIC عصاره نیز سبب افزایش میزان فعالیت ضد میکروبی گردید. البته میزان مهار باکتری /شریشیاکلی (گرم منفی) بسیار کمتر از استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) بود. به عبارتی، باکتری گرم منفی مقاومت بیشتری را نسبت به عصاره

پنیرباد نشان داد. باکتری‌های گرم منفی مانند /شریشیاکلی به علت داشتن غشای اضافی خارجی در اطراف دیواره سلولی خود می‌توانند رهایش ترکیبات آبریز 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 اسانس‌های آویشن و نعناع رشد باکتری‌های گرم مثبت را به مقدار بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی مهار نمود [1]. فعالیت ضد میکروبی 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 ضد میکروبی ترکیبات فنولیک موجود در عصاره پنیرباد متعدد می‌باشد. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به‌خاطر در نفوذپذیری غشای سلولی باکتری و خروج یون‌ها و محتوای داخل سلولی آن، غیر فعال‌سازی در مسیر سنتز آنزیم‌های تنفسی در میتوکندری و اختلال در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی و آزادسازی لیپو پلی‌ساکاریدها اشاره نمود [29].

Table 5 Antimicrobial activity of sago starch active films

Film	Inhibition area (mm ²)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Starch	ND ^c	ND ^d
Starch/1-MIC	ND ^c	92.4±91.80 ^c
Starch/1.5-MICc	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 ($p < 0.05$).

3-8- 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 غیر فنولیک کاهنده موجود در فیلم نشاسته ساگو و برهمکنش آنها با معرف فولین سیوکالچو می‌باشد که توانایی ایجاد ترکیبات رنگی را دارا می‌باشد [29, 30]. 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 بیشترین میزان محتوای فنولی (mg Galic acid/g sample)

2/3 در فیلم فعال حاوی 2 MIC عصاره پنیرباد مشاهده شد. نتایج مشابهی در اثر افزودن اسانس رزماری و آویشن شیرازی به فیلم فعال کیتوزان مشاهده شد [29, 31]. این امر مرتبط با ترکیبات فنولی موجود در عصاره پنیرباد (ویتافین A، ویتانولید و ویتاسترامونولید) 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]. ارزیابی مهار رادیکال‌های DPPH که در واقع اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده نظیر فنول‌ها جهت انتقال اتم هیدروژن به رادیکال می‌باشد معمولترین روش محاسبه قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

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 مرزه، خاصیت مهار رادیکال آزاد را نشان داد [20]. در مطالعه حیدری مجد و همکاران (2019) افزودن اسانس باریجه به نانوالیاف ژئین سبب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی نانوالیاف گردید [33]. همچنین نتایج مطالعه سوخته زارعی و همکاران (2017) نشان داد که افزودن عصاره تشنه‌داری 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 به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) با افزایش غلظت عصاره پنیرباد افزایش یافت. بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد (68 درصد) در فیلم حاوی 2 MIC عصاره پنیر باد مشاهده شد. در

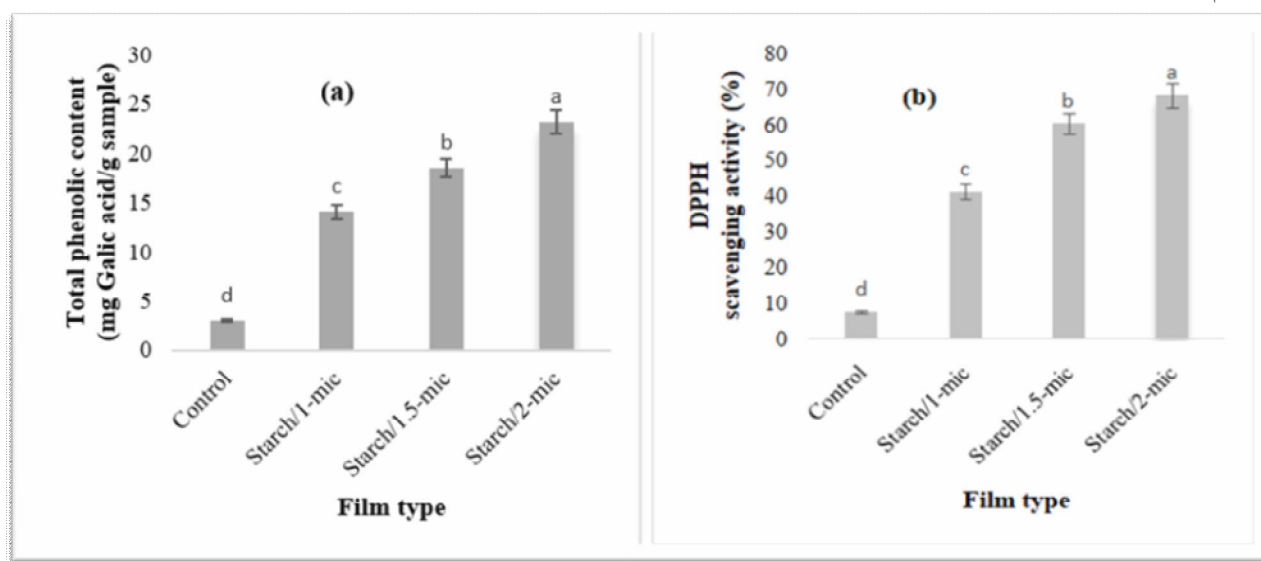


Fig 3 Total phenol content (a) and DPPH radical-scavenging activity (b) of sago starch films containing various concentrations of *Withania Somnifera* extract

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

4- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، خصوصیات فیزیکوشیمیایی، رنگی، نفوذپذیری، ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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

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.,

- 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] Hemmatkhan, 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., Pirsai, 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] Bhattarai, J. P., Park, S., and Han, S. (2010). The methanolic extract of *Withania somnifera* ACTS on GABAA 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., Shehbaz, 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 (*Phlomidioschema 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 Barije (*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