



بررسی اثر اسانس صمغ بنه بر خواص ضد میکروبی و ضد اکسایشی فیلم خوراکی نشاسته‌ای

مرضیه پناهی^۱، حسن برزگر^{۲*}، محمد حجتی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

(تاریخ دریافت: 95/10/2، تاریخ بازنگری: 95/11/24، تاریخ پذیرش: 95/12/2)

چکیده

بنه (*Pistacia atlantica*) از گونه‌های غالب پسته وحشی موجود در ایران می‌باشد. صمغ بنه یک صمغ الیورزینی است که از لایه خارجی پوست داخلی این گیاه ترشح می‌شود که در ایران، سقز نامیده می‌شود. از آن‌جا که فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسایشی اسانس اجزاء مختلف این گیاه در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است، بنابراین برای تولید فیلم فعال نشاسته‌ای، اسانس حاصل از صمغ بنه انتخاب شد. در این تحقیق ابتدا اسانس از صمغ بنه به روش تقطیر آبی استخراج و ترکیبات فرار آن با دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شد. فیلم نشاسته‌ای حاوی اسانس بنه در چهار سطح مختلف (0، 0/5، 1 و 2 درصد) تولید و فعالیت ضد میکروبی آن روی چهار باکتری گرم مثبت، چهار باکتری گرم منفی و سه نوع قارچ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین فعالیت ضد اکسایشی فیلم‌های تولید شده با آزمون مهار رادیکال آزاد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون GC/MS نشان داد که آلفاپینن (77/1 درصد) عمده‌ترین ترکیب اسانس بنه می‌باشد. نتایج نشان داد که فیلم‌های حاوی اسانس بنه فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسایشی مطلوبی دارند که با افزایش میزان اسانس، این خصوصیات در فیلم‌ها افزایش یافت و طیف حاصل از ATR-FTIR تاییدکننده محتوای اسانس در فیلم بود. با توجه به یافته‌های این تحقیق می‌توان اسانس بنه را به‌عنوان یک ماده نگه‌دارنده طبیعی به فیلم‌های زیست تخریب پذیر اضافه نمود.

واژه‌های کلیدی: فیلم فعال، نشاسته، اسانس بنه، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت ضد اکسایشی.

1- مقدمه

تجمع روبه افزایش پسماندهای مواد بسته‌بندی به‌ویژه بسپارهای سنتزی و چرخه عمر طولانی آن‌ها، صنایع تولید مواد غذایی و بسته‌بندی را در جهت کشف مواد بسته‌بندی زیست تخریب‌پذیر تشویق کرده است [1]. تاکنون تحقیقات قابل توجهی برای به‌دست آوردن مواد بسته‌بندی مواد غذایی سازگار با محیط‌زیست یا زیست تخریب‌پذیر انجام شده است [2]. طیف وسیعی از مواد طبیعی از جمله پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و یا ترکیبی از آن‌ها را می‌توان فراوری کرد و به منظور تهیه فیلم و پوشش‌های بسته‌بندی زیست‌تخریب‌پذیر و خوراکی به‌کار برد [3]. نشاسته به دلیل قیمت به‌نسبت پایین، در دسترس بودن گسترده و سهولت کاربرد، رایج‌ترین ماده خام مورد استفاده می‌باشد. از این گذشته، این ماده به‌طور کامل در آب و خاک زیست‌تخریب‌پذیر است [4].

از طرفی آسیب‌های ناشی از حضور رادیکال‌های آزاد حاصل از اکسیداسیون، نقش مهمی در پیری، سرطان، بیماری‌های قلبی، فشار خون، بیماری‌های عصبی و جهش دارند [5]. علاوه بر آن با وجود افزایش آگاهی اهمیت بهداشت در سطح بالا در زنجیره عرضه مواد غذایی، هم‌چنان بیماری‌های ناشی از مواد غذایی توسط میکروارگانیسم‌ها بزرگ‌ترین مشکل سلامت عمومی می‌باشد [6]. امروزه بسته‌بندی فعال مواد غذایی یک راه حل ابتکاری برای پاسخگویی به تغییرات مداوم در تقاضاهای مصرف‌کنندگان و تمایلات بازار می‌باشد. بسته‌بندی فعال مواد غذایی ماندگاری محصول را گسترش می‌دهد و ایمنی مواد غذایی را با در برداشتن عوامل ضد میکروبی و ضد اکسایشی بهبود می‌دهد. فیلم‌های تولید شده با زیست‌بسپارهای حاصل از منابع تجدیدپذیر، توانایی حمل ترکیبات فعال مانند مواد ضد اکسایشی و ضد میکروبی را دارند [7]. در بسته‌بندی‌های فعال، با توجه به این‌که واکنش‌های اکسایشی و فعالیت‌های میکروبی در سطح ماده غذایی اتفاق می‌افتد، می‌توان ترکیبات فعال را به‌جای این‌که به‌طور مستقیم به ترکیبات ماده غذایی افزود، به بستر فیلم‌ها افزود تا این‌که اثرات عملکردی بهتری در سطح ماده غذایی ارائه دهند [8].

اسانس‌ها، به‌عنوان نوعی از مواد طبیعی با فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر انواع عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی توسط

سازمان غذا و دارو (FDA) در لیست GRAS طبقه‌بندی شده است و این حاکی از آن است که می‌توان آن‌ها را در صنایع غذایی استفاده کرد [9]. افزودن اسانس‌ها درون بستر فیلم، به‌جای کاربرد آن‌ها به‌طور مستقیم بر روی محصولات غذایی می‌تواند به کاهش میزان مورد نیاز از اسانس‌ها کمک کند، در حالی‌که فعالیت ضد میکروبی آن‌ها حفظ می‌شود [10]. از یافته‌های علمی در حوزه کاربرد اسانس در تولید فیلم‌های فعال زیست تخریب‌پذیر می‌توان به تأثیر اسانس آویشن در فیلم ترکیبی نشاسته-کیتوزان [11]، اسانس‌های دارچین و پونه کوهی در فیلم‌های نشاسته‌ای و کیتوزانی [12]، اسانس آویشن و ریحان در فیلم ترکیبی نشاسته گندم-کیتوزان [13]، اسانس پونه و آویشن شیرازی در فیلم نشاسته ذرت [14]، اسانس آویشن شیرازی و پونه در فیلم پلی‌ساکارید محلول سویا [15] و اسانس مرزنجوش در فیلم بیوکامپوزیتی ژلاتین ماهی و کیتوزان [16]، اشاره کرد.

بانه (*Pistacia atlantica*) از خانواده آناکاردیاسه، یکی از گونه‌های پسته وحشی در ایران است که دارای ارقام موتیکا¹، کردیکا² و کابولیکا³ می‌باشد و انتشار آن از جزایر قناری و کشورهای ساحل دریای مدیترانه شروع می‌شود و تا آسیای صغیر، سوریه، قفقاز، ایران، افغانستان و پاکستان امتداد می‌یابد [17]. درختان بانه زیرگونه موتیکا و کردیکا در بیش از 1200000 هکتار از بخش‌های غربی، مرکزی و شرقی ایران در منطقه زاگرس در حدفاصل استان‌های فارس و کردستان، به‌طور وحشی می‌روید [18]. صمغ بانه یک منبع داروئی سنتی برای تسکین درد شکم، درد معده، سوء هاضمه و زخم معده، آسم، اگرما، عفونت گلو، سنگ کلیه، ضد اسهال و قابض، ضد تب، ضدباکتری و ویروس به‌شمار می‌آید [19]. از مهم‌ترین ترکیبات اسانس صمغ بانه، آلفاپینن، بتاپینن و ترانس‌وربنول [20] می‌باشد و مطالعاتی در جهت تعیین فعالیت ضد اکسایشی [21، 22] و فعالیت ضد میکروبی برخی از گونه‌های بانه [23] صورت گرفته است. با توجه به نگرانی‌های اخیر در رابطه با آلودگی زیست محیطی ناشی از پسماندهای مواد بسته‌بندی بسپارهای سنتزی و مصرف مواد غذایی حاوی ترکیبات طبیعی، اهمیت تولید و کاربرد فیلم‌های تولید شده از زیست بسپارهای

1. Mutica
2. Kurdica
3. Cabulica

5 درجه در دقیقه تا رسیدن به دمای 200 درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این دما یک دقیقه باقی ماند و سپس دما با سرعت 10 سانتی‌گراد در دقیقه تا رسیدن به دمای 250 سانتی‌گراد افزایش یافت و پس از 5 دقیقه توقف در این دما در نهایت با سرعت 25 درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای 300 درجه سانتی‌گراد رسانده شد. گاز هلیوم با سرعت جریان 1 میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل به کار گرفته شد و دمای محفظه تزریق 240 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. طیف سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون 70 الکترون ولت به کار گرفته شد. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها (C_8-C_{24}) و به‌دست آوردن شاخص بازداری (RI) گزارش شده در نرم افزار NIST2013 و مقایسه طیف جرمی هر یک از اجزای ترکیبات اسانس با طیف جرمی موجود در کتابخانه wiley7n.1 موجود در دستگاه GC/MS صورت پذیرفت و میزان ترکیبات (/) با استفاده از سطح زیر منحنی پیک‌ها محاسبه گردید.

2-2-3- تهیه فیلم‌ها

برای آماده‌سازی فیلم شاهد ابتدا 4 گرم نشاسته سیب زمینی به 100 میلی‌لیتر آب مقطر حاوی گلیسرول (30%) نسبت به وزن خشک نشاسته) اضافه و مخلوط حاصل در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه هم زده شد. سپس به‌منظور ژلاتینه شدن کامل و شفاف شدن، به‌مدت 10 دقیقه سوسپانسیون در دمای 90 درجه سانتی‌گراد هم زده شد. برای یکسان‌سازی شرایط آزمایشگاهی و تهیه فیلم شاهد با سایر فیلم‌های حاوی اسانس، سوسپانسیون توسط دستگاه هموژنایزر (اولترا تورا کس مدل T-25، آلمان) در سرعت 6500 دور در دقیقه برای مدت 2 دقیقه و در 9500 دور در دقیقه برای مدت 1 دقیقه هموژن شد. سپس محلول حاضر به‌منظور خروج حباب‌های هوا، به حمام اولتراسونیک (یوروندا مدل 4D، ایتالیا) با دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه منتقل شد. در نهایت محلول تشکیل‌دهنده فیلم، روی ظروف پلکسی لبه دار با مساحت حدود 400 سانتی‌متر مربع پخش شد. سپس فیلم‌ها به منظور خشک شدن به درون آن برای مدت 18 ساعت در دمای 30 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. فیلم‌های حاوی اسانس با افزودن اسانس بنه برای رسیدن به غلظت نهایی

تجدیدپذیر حاوی ترکیبات فعال مطرح شده است. بنابراین هدف از این پژوهش، تولید فیلم نشاسته‌ای حاوی اسانس صمغ بنه و در پی آن، بررسی فعالیت ضداکسایشی و ضد میکروبی فیلم حاصل می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

1-2- مواد

مواد مورد نیاز در این مطالعه شامل نشاسته از شرکت الوند همدان، صمغ درخت بنه از جنگل‌های اقلید فارس، اسید گالیک، پودر رادیکال 2و2 دی‌فنیل‌هیدرازین (DPPH) و معرف فولین سیوکالتو از شرکت سیگما، گلیسرول، توئین 80 و محیط کشت‌های MHA، PDA، BHI از شرکت مرک آلمان و سویه‌های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

2-2- روش‌ها

1-2-2- جمع‌آوری مواد گیاهی و استخراج اسانس

صمغ اولئورزینی درخت بنه آتلانتیکی زیرگونه‌ی موتیکا از درختان جنگل بنه واقع در شهرستان اقلید فارس در ماه آبان جمع‌آوری شد و سپس نوع و گونه گیاهی نمونه توسط کارشناسان گروه داروسازی سنتی در دانشکده داروسازی شیراز مورد تأیید قرار گرفت. به‌منظور اسانس‌گیری، مقدار 25 گرم از صمغ اولئورزینی بنه به دستگاه کلونجر منتقل شد و اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب به مدت 4 ساعت صورت گرفت و اسانس پس از جمع‌آوری و آب‌گیری با سولفات سدیم بی‌آب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [24].

2-2-2- شناسایی ترکیبات اسانس

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج شده با تزریق 0/5 میکرولیتر اسانس رقیق شده با سیکلوهگزان به دستگاه گاز کروماتوگرافی آجیلنت مدل 6890A حاوی ستون HP-5MS (طول 30 متر، قطر داخلی 250 میکرومتر و ضخامت فاز ثابت 0/25 میکرومتر) متصل به طیف سنج جرمی آجیلنت مدل 5975 انجام پذیرفت. برنامه دمایی ستون به این طریق تنظیم گردید: دمای ابتدایی آن 40 درجه سانتی‌گراد بود و دما با سرعت

ضداکسایشی در اثر گرفتن الکترون از بنفش به زرد تغییر می‌کند. به‌طور خلاصه، 25 میلی‌گرم از نمونه‌های فیلم در 5 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد، 0/1 میلی‌لیتر از محلول عصاره فیلم با 3/9 میلی‌لیتر محلول DPPH متانولی (محلول DPPH متانولی 0/1 میلی‌مولار) مخلوط شد سپس نمونه‌ها به مدت 60 دقیقه در مکان تاریک با دمای اتاق، قرار داده شدند. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر (اسپکول مدل 2000، شرکت آنالیتیک جنا، آلمان) در مقابل متانول خالص در طول موج 517 نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است برای صفر کردن دستگاه از متانول خالص استفاده شد. این آزمون در سه تکرار برای هر فیلم انجام شد. فعالیت مهار رادیکال نمونه‌ها به‌عنوان درصد مهارکنندگی (RSA) با استفاده از معادله (2) محاسبه گردید؛

$$RSA(\%) = (A_b - A_s) / A_b \times 100 \quad (2)$$

در این رابطه، A_b ، میزان جذب در نمونه کنترل (حاوی تمامی اجزا بجز ترکیب مورد آزمون) و A_s میزان جذب در ترکیبات نمونه مورد آزمون می‌باشد.

2-2-7- تهیه سوسپانسیون میکروبی از میکروارگانیسم‌های مورد آزمون و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

کلیه میکروارگانیسم‌ها به‌صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. آمپول‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها ابتدا در شرایط آسپتیک باز و در محیط کشت مایع BHI به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و چند بار از کشت اولیه به کشت دیگر منتقل شدند تا به‌طور کامل فعال شوند. باکتری‌ها روی محیط کشت تازه BHI و کپک‌ها و مخمر روی محیط کشت PDA به اضافه کلرامفنیکل کشت داده شدند. سپس پلیت‌های حاوی باکتری به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و مخمر نیز به مدت 24 ساعت در دمای 29 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی و مخمری، توسط لوپ استریل 6-5 کلونی برداشته و در 5 میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی به مدت 15 ثانیه هم‌زده شد و به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج 625 نانومتر کدورت

0/5، 1 و 2٪ (حجمی-حجمی) همراه با توئین 80 (با نسبت ثابت 0/1٪ امولسیفایر به اسانس) به‌عنوان امولسیفایر برای کمک به پراکندگی اسانس درون سوسپانسیون نشاسته پس از ژلاتینه شدن کامل افزوده شد و بقیه مراحل تولید مانند فیلم شاهد صورت گرفت. فیلم‌های خشک از سطح قالب جدا شد و فیلم‌های سالم و بدون ترک‌خوردگی در مکان تاریک با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد تا زمان ارزیابی نگهداری شد [14، 25].

2-2-5- سنجش محتوای ترکیبات فنولی کل

میزان ترکیبات فنولی کل با توجه به روش سیرپاتراون و هارت به کمک رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو انجام شد [26]. بدین منظور، ابتدا 25 میلی‌گرم نمونه فیلم درون 5 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. به‌طور خلاصه، 0/1 میلی‌لیتر عصاره فیلم با 7 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو مخلوط شد و پس از 8 دقیقه، 1/5 میلی‌لیتر کربنات سدیم (2٪) و آب افزوده شد تا حجم پایانی محلول به 10 میلی‌لیتر برسد. پس از مدت زمان 2 ساعت نگهداری نمونه‌ها در تاریکی، جذب نمونه‌ها در طول موج 765 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (اسپکول مدل 2000، شرکت آنالیتیک جنا، آلمان) اندازه‌گیری گردید. میزان ترکیبات فنول کل (T) براساس منحنی کالیبراسیون اسیدگالیک (0-1000 میلی‌گرم بر لیتر)، با توجه به معادله (1) محاسبه و برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک موجود در هر گرم از فیلم خشک بیان شد؛

$$T = C \cdot V / M \quad (1)$$

که در این رابطه، C، غلظت معادل اسیدگالیک حاصل از معادله منحنی استاندارد (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، V، حجم عصاره فیلم (میلی‌لیتر) و M وزن فیلم (گرم) می‌باشد.

2-2-6- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با توجه به روش براند-ویلیام و همکاران انجام شد [27]. این روش برای ارزیابی فعالیت ضداکسایشی استفاده می‌شود و اساس آن توانایی اهداء هیدروژن می‌باشد. رنگ معرف DPPH در حضور ترکیب

واریانس ANOVA استفاده شد و مقایسه میانگین آن‌ها با آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد و با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذیرفت.

3- نتایج و بحث

3-1- شناسایی و تعیین میزان ترکیبات شیمیایی اسانس
اسانس حاصل از صمغ بنه آتلانتیکی زیرگونه موتیکا با راندمان اسانس‌گیری 17/2٪، دارای رنگ زرد متمایل به سبز روشن همراه با بوی سقر بود. 24 ترکیب تشکیل دهنده اسانس استخراج شده توسط دستگاه GC/MS شناسایی شد که در مجموع 97/26٪ از کل اجزای اسانس را شامل می‌شدند (جدول 1). در این میان، عمده‌ترین گروه موجود در اسانس حاصل از صمغ بنه مونو ترپن‌های هیدروکربنه (85/61٪) مشاهده شد که بیش‌ترین مقدار آن‌ها مربوط به آلفا پینن (77/10٪) می‌باشد و سایر گروه‌ها شامل مونوترپن‌های اکسیژنه (7/05٪)، سسکوئی‌ترپن‌های هیدروکربنه (1/07٪) و سسکوئی‌ترپن‌های اکسیژنه (2/16٪) می‌باشند (شکل 1).

در اسانس حاصل از صمغ بنه آتلانتیکی زیرگونه موتیکا عمده‌ترین ترکیب آلفاپینن (77/10٪) می‌باشد که با سایر ترکیبات عمده اختلاف بسیار زیادی دارد، چنین نتیجه‌ای در مطالعه محقق زاده و همکاران که ترکیبات اسانس صمغ بنه آتلانتیکی واریته موتیکا را بررسی کرده بودند نیز مشاهده شد [20]. در مطالعه حاضر، سایر ترکیبات عمده این اسانس شامل گاماترپینن (3/98٪)، بورنیل استات (2/79٪)، ترانس‌پینوکاروئول (1/70٪)، اسپاچولنول (1/65٪)، وربنول (1/21٪)، بتاپینن (1/19٪)، آلفاترپینولن (1/06٪) و وربنول (1/01٪) می‌باشند. مطالعات مختلفی روی اسانس صمغ انواع گونه‌های بنه صورت گرفته است که ترکیبات عمده در گونه آتلانتیکی آلفاپینن (78/7٪)، ترانس وربنول (5/3٪)، بتاپینن (2/4٪) و ترانس‌پینوکاروئول (1/9٪) [20]، بتاپینن (70٪)، آلفاکوپائن (76٪) و آلفاترپینولن (86٪) [23] و در گونه تربنتوس آلفاپینن، بتاپینن و سابینن [31] و در گونه لنتیکوس آلفاپینن، بتامیرسن، بتاپینن، لیمونن و بتاکاریوفیلن [32] گزارش شده‌اند. نتایج پژوهش‌های مختلف نیز نیز گویای این واقعیت است که گونه، محل رویش و آب و هوای منطقه‌ای

سوسپانسیون مورد بررسی قرار گرفت و سوسپانسیون میکروبی با میزان جذب بین 1-0/08 معادل با کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) برای باکتری و ($1/5 \times 10^6$ cfu/ml) برای مخمر تهیه شد. برای تهیه سوسپانسیون اسپوری نیز از کپک‌های روی PDA که به مدت 7 روز در دمای 25 سانتی‌گراد رشد کرده بودند، استفاده شد. اسپورها در محیط مایع پخش و بعد از 24 ساعت، سوسپانسیون اسپورها مطابق با کدورت نیم مک‌فارلند ($0/4-5 \times 10^4$ spores/ml) تهیه شد [28].

به‌منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها از روش نفوذ آگار استفاده شد. در شرایط استریل دیسک‌های فیلم (با قطر یک سانتی‌متر) بریده شد و بر روی محیط کشت‌های تلقیح شده با 100 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (MHA) برای کشت سوش‌های باکتریایی و PDA برای مخمر و کپک‌ها قرار داده شد. سپس پلیت‌های حاوی سوش باکتریایی به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و پلیت حاوی مخمر و کپک به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس قطر ناحیه ممانعت با یک کولیس اندازه‌گیری شد. این آزمون برای هر میکروارگانیسم در سه تکرار انجام شد [29].

2-2-8- آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مجهز

به منشور بازتابش کلی باریک ATR-FTIR

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه برای مطالعه حضور بر همکنش‌های بین ترکیبات در فیلم‌ها استفاده می‌شود. روش بازتابش کلی باریک یا ATR در حقیقت بر مبنای تغییراتی است که در پرتوهای بازتابشی از سطح نمونه می‌باشد. به‌منظور تایید اختلاط اسانس در نمونه فیلم، طیف سنجی FTIR با استفاده از دستگاه اسپکترومتر ATR-FTIR مدل گلدن گیت ساخت کشور انگلستان، با تفکیک‌پذیری 4 cm^{-1} در گستره 650 تا 4000 cm^{-1} انجام شد [30].

2-2-9- آنالیز آماری

طرح آماری مورد استفاده در این پژوهش، طرح کاملاً تصادفی با یک عامل متغیر بود. برای تعیین اختلاف معنی‌داری، تجزیه

جدول (۱) اجزای تشکیل دهنده اسانس حاصل از صمغ اولئورزینی بنه آتلانتیکی زیرگونه موتیکا

ردیف	نام ترکیب	شاخص باز داری (RI)*	مقدار ترکیب (%)
1	آلفا پینین (α -Pinene)	10/212	77/10
2	کامفن (Camphene)	10/828	0/20
3	سایپینین (Sabinene)	12/059	0/64
4	بتا پینین (β -Pinene)	12/161	1/19
5	بتا میرسن (β -Myrcene)	12/982	0/37
6	دلتا-3-کارن (Δ -3-Carene)	13/823	0/23
7	پاراسیمین (p-cymene)	14/571	0/1
8	لیمونن (Limonene)	14/756	0/46
9	1 و 8- سینئول (1,8 cineole)	15/023	0/22
10	سیس-اوسیمین (Cis-ocimene)	15/228	0/13
11	ترانس-اوسیمین (trans-ocimene)	15/289	0/15
12	آلفا ترپینولن (α -Terpinolene)	17/751	1/06
13	وربنول (Verbenol)	17/987	1/01
14	ترانس پینوکاروئول (trans-Pinocarveol)	29/038	1/70
15	میرتنول (Myrtenol)	31/717	0/12
16	وربنون (Verbenone)	33/505	1/21
17	بورنیل استات (Bornyl acetate)	37/279	2/79
18	بوربونن (Bourbonene)	43/608	0/52
19	گاما ترپینن (γ -Terpinene)	43/658	3/98
20	اسپاچولنول (Spathulenol)	43/925	1/65
21	دلتا کادینن (Δ -Cadinene)	45/812	0/55
22	کاریوفیلین اکساید (Caryophyllene oxide)	46/469	0/51
23	هگزادکانوئیک اسید (hexadecanoic acid)	52/920	0/75
24	اکتادکانوئیک اسید (octadecanoic acid)	58/274	0/62
	مجموع	97/26	

RI*: شاخص باز داری متناسب با ستون آلکان‌های نرمال C₈-C₂₄ روی ستون HP-5 MS

خاصیت ضد میکروبی اجزاء مختلف اسانس صمغ بنه‌ی لنتیکوس، گزارش کردند که ترکیباتی چون وربنون، آلفا ترپینول و لینالول به دلیل عملکرد هم افزایی به فعالیت ضد میکروبی اسانس کمک می‌کنند [32]. آلفا پینین موجود در اسانس حاصل از صمغ بنه آتلانتیکی اثر ضد باکتریایی خوبی را از خود نشان داده است [35] و از طرفی بنه دارای ترکیبات فنولی و ترپنوئیدها هستند و ترپنوئیدها در مقابل باکتری‌ها فعال هستند [36].

که گیاه در آن رشد می‌کند، بر روی نوع و میزان ترکیبات شیمیایی آن تأثیر می‌گذارد [22، 33]. به هر حال، آلفا پینن، بتا پینن و گاماترپینن از ترکیبات عمده این اسانس و نیز اسانس حاصل از بنه لنتیکوس و پسته ورا هستند. مقادیر بتامیرسن در این اسانس (0/37٪) مشاهده شد که بسیار کم‌تر از اسانس بنه لنتیکوس (8-5٪) می‌باشد که این ترکیب باعث کاهش کیفیت روغن می‌شود [34]. کادسوداکی و همکاران پس از بررسی

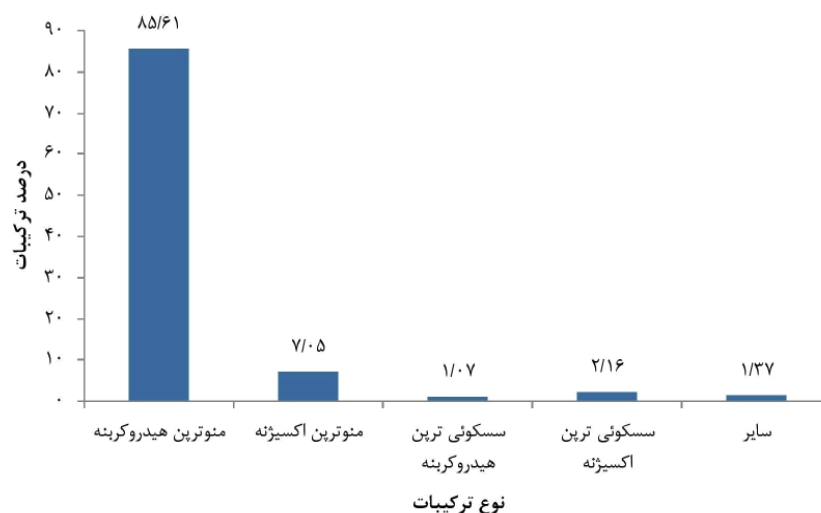
3-3- محتوای ترکیبات فنولی کل

قرار گیرند و این امر باعث کاهش محتوای ترکیبات فنولی فیلم حاوی اسانس نسبت به ترکیبات خالص همان اسانس می‌شود [13].

محتوای ترکیبات فنولی کل فیلم‌های حاوی اسانس با استفاده از معرف فولین سیوکالتو و به کمک منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد و برحسب مقدار معادل اسید گالیک در جدول (2) خلاصه شد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزایش میزان اسانس، محتوای ترکیبات فنولی فیلم‌ها به‌طور معناداری افزایش یافت که روند نتایج حاصل از این مطالعه در مطالعات پیشین صورت گرفته روی فیلم‌های ترکیبی نشاسته حاوی اسانس‌های مختلف نیز مشاهده شده است [11، 13 و 37]. هم‌چنین در پژوهش‌هایی که روی سایر فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر حاوی اسانس صورت گرفته بود نیز به افزایش محتوای ترکیبات فنولی فیلم در اثر افزایش غلظت اسانس، اشاره شده است [38-40]. فیلم حاوی اسانس، محتوای ترکیبات فنولی کم‌تری نسبت به ترکیب خالص همان اسانس، با بخش وزنی یکسان دارد. چون ممکن است این ترکیبات تحت تأثیر برهمکنش‌هایی با ماتریکس و یا فرایند تولید فیلم مثل تبخیر اسانس در حین تولید و خشک شدن

3-4- تعیین فعالیت ضداکسایشی با سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH

با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، مقدار جذب رادیکال آزاد DPPH سنجیده می‌شود که میزان جذب به‌طور معکوس با فعالیت ضداکسایشی در ارتباط است [41]. در تمامی نمونه‌ها با افزایش غلظت اسانس، ظرفیت مهار DPPH فیلم‌ها افزایش یافت به‌طوری‌که در فیلم حاوی 2 درصد اسانس بیش‌ترین فعالیت ضداکسایشی مشاهده شد (جدول 2). به‌طور کلی درجه قدرت ضداکسایشی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر متناسب با مقدار ترکیبات ضداکسایشی افزوده شده می‌باشد [40]. یافته حاصل از مطالعه حاضر مشابه یافته‌های سایر مطالعات است چنان‌چه تاثیر افزایش غلظت اسانس روی فعالیت ضداکسایشی فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر در تحقیقات سابق نیز بیان شده



شکل (1) گروه‌های تشکیل دهنده اسانس صمغ بنه

جدول (2) تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر محتوای ترکیبات فنولی کل و مهار رادیکال آزاد DPPH در فیلم

اسانس (%)	محتوای ترکیبات فنولی کل (میلی گرم بر گرم فیلم خشک)	مهار رادیکال آزاد DPPH (%)
0/5	$2/313 \pm 0/018^c$	$37/000 \pm 1/790^c$
1	$3/170 \pm 0/088^b$	$51/453 \pm 0/948^b$
2	$4/156 \pm 0/290^a$	$68/425 \pm 1/641^a$

داده‌ها، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار. حروف غیر یکسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار در سطح $p \leq 0/05$ می‌باشد.

است (قطر هاله بازدارندگی در پتری‌دیش‌هایی که فعالیت ضد میکروبی در آن‌ها مشاهده نشد، صفر و در صورت مشاهده فعالیت ضد میکروبی، مقادیر با در نظر گرفتن قطر دیسک گزارش شد). همان‌طور که مشخص است فیلم نشاسته‌ای بدون اسانس هیچ فعالیت ضد میکروبی بر روی میکروارگانیزم‌های مورد آزمون نداشت، ولی با افزودن اسانس به فیلم، فیلم‌ها فعالیت ضد میکروبی از خود نشان دادند به طوری که با افزایش غلظت اسانس، فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها به طور معناداری افزایش یافت و در سطح 2٪ بیش‌ترین تأثیر ضد میکروبی فیلم‌ها مشاهده شد. واضح است که هرچه مقدار بیش‌تری از اسانس با جمعیت ثابتی از میکروب‌ها در تماس باشد، مقاومت کم‌تری از میکروب‌ها را شاهد خواهیم بود. چنین نتیجه‌ای در سایر تحقیقات صورت گرفته بر فیلم‌های حاوی اسانس نیز مشاهده شده است [14، 16 و 43].

با توجه به نتایج حاصل، باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین میکروارگانیزم و کپک آسپرژیلوس فلاووس مقاوم‌ترین میکروارگانیزم در بین تمامی سویه‌های مورد آزمون در تمامی سطوح اسانس به کار رفته در فیلم‌ها بود. به طور کلی فیلم‌های حاوی اسانس بنه روی باکتری‌های گرم مثبت اثر

است [11، 13، 38 و 39]. این نکته لازم به ذکر است که در فیلم‌های حاوی اسانس، مقادیر مهار DPPH نسبت به اسانس خالص در غلظت‌های یکسان کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند به برهم‌کنش‌های بین ماتریکس فیلم و اجزای اسانس مرتبط باشد [38]. هم‌چنین ممکن است اسانس در جریان شکل‌گیری فیلم اکسید شود و یا تحت تأثیر برهم‌کنش با ماتریکس فیلم قرار گیرد و ظرفیت ضد اکسایشی مورد انتظار کاهش یابد. از طرفی در مورد ترکیبات فرار مثل اسانس، کاهش فعالیت ضد اکسایشی می‌تواند با تبخیر شدن آن‌ها در جریان تولید و هم‌چنین خشک شدن فیلم مرتبط باشد [13، 38 و 39].

3-5- بررسی خاصیت ضد میکروبی فیلم

آزمون ضد میکروبی علیه سویه‌های میکروبی انتخاب شده به روش انتشار دیسک در آگار صورت گرفت. این روش بر اساس اندازه‌گیری ناحیه شفاف ایجاد شده اطراف دیسک فیلم‌های حاوی مواد ضد میکروبی به دلیل ممانعت از رشد میکروارگانیزم‌ها می‌باشد در حالی که دیسک به صورت مستقیم در تماس با کشت باکتریایی است [42]. نتایج آزمون ضد میکروبی فیلم‌ها در جدول (3) آورده شده

جدول (3) قطر هاله ایجاد شده توسط فیلم‌های حاوی اسانس بر میکروارگانیزم‌ها و حساسیت آن‌ها (میلی‌متر)

نام میکروارگانیزم	اسانس (%)			
	2	1	0/5	0
استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت)	18/00±1/00 ^{Aa}	15/33±0/38 ^{Ab}	13/33±0/38 ^{Ac}	0/00 ^{Ad}
استرپتوکوکوس فاسیوم (گرم مثبت)	17/50±0/50 ^{ABa}	15/00±0/25 ^{ABb}	13/00±0/50 ^{Ac}	0/00 ^{Ad}
باسیلوس سرئوس (گرم مثبت)	15/67±0/52 ^{CDEa}	13/67±0/52 ^{CDB}	0/00 ^{Dc}	0/00 ^{Ac}
باسیلوس سوبتیلیس (گرم مثبت)	15/00±0/50 ^{DEa}	13/00±0/80 ^{DEb}	0/00 ^{Dc}	0/00 ^{Ac}
اشرشیاکلی (گرم منفی)	16/50±0/90 ^{BCa}	14/00±0/50 ^{BCDb}	0/00 ^{Dc}	0/00 ^{Ac}
شیگلا دیسنتری (گرم منفی)	17/00±0/98 ^{ABCa}	15/00±0/60 ^{ABb}	13/00±0/20 ^{Ac}	0/00 ^{Ad}
سالمونلاتیفی (گرم منفی)	14/70±0/75 ^{DEa}	14/00±0/80 ^{DEb}	0/00 ^{Dc}	0/00 ^{Ac}
سودوموناس آئروجینوس (گرم منفی)	16/00±0/50 ^{CDa}	14/50±0/61 ^{ABCb}	11/67±0/62 ^{Cc}	0/00 ^{Ad}
کاندیدا آلبیکانس	17/00±0/73 ^{ABCa}	15/00±0/51 ^{ABb}	12/33±0/42 ^{Bc}	0/00 ^{Ad}
آسپرژیلوس نایچر	14/50±0/66 ^{Ea}	12/33±0/34 ^{Eb}	0/00 ^{Dc}	0/00 ^{Ac}
آسپرژیلوس فلاووس	13/00±0/52 ^{Fa}	0/00 ^{Fb}	0/00 ^{Db}	0/00 ^{Ab}

داده‌ها، میانگین سه تکرار ± انحراف معیار. حروف غیر یکسان در هر سطر (حروف کوچک) و ستون (حروف بزرگ) نشان‌دهنده اختلاف آماری معنادار در سطح $p \leq 0/05$ می‌باشد.

رشد میسلایوم‌های کپک‌ها جلوگیری می‌کند [۳۴، ۵۰]. در مطالعه حاضر، عمده‌ترین ترکیب اسانس صمغ بنه منوترپن هیدروکربنه آلفاپینن (77/10٪) بود که محدود بودن باندهای هیدروژنی در ساختار منوترپن‌های هیدروکربنه باعث کاهش حلالیت آن‌ها در آب و به دنبال آن کاهش قدرت نفوذپذیری در محیط و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها می‌شود [51]. در بحث مکانیسم عمل اسانس‌ها باید در نظر داشت که تیمار میکروارگانیسم‌ها توسط اسانس‌ها منجر به تخریب یکپارچگی و عملکرد غشا می‌شود. این امر به مرور زمان می‌تواند منجر به افت خودپایداری سلول، نشت ترکیبات درون سلولی و در نتیجه مرگ سلول شود. هم‌چنین این تأثیرات به صورت وابسته به زمان و مقدار مواد ضد میکروب می‌باشند که غلظت‌های بالاتر، سریع‌تر منجر به تأثیرات شدید می‌شود [52].

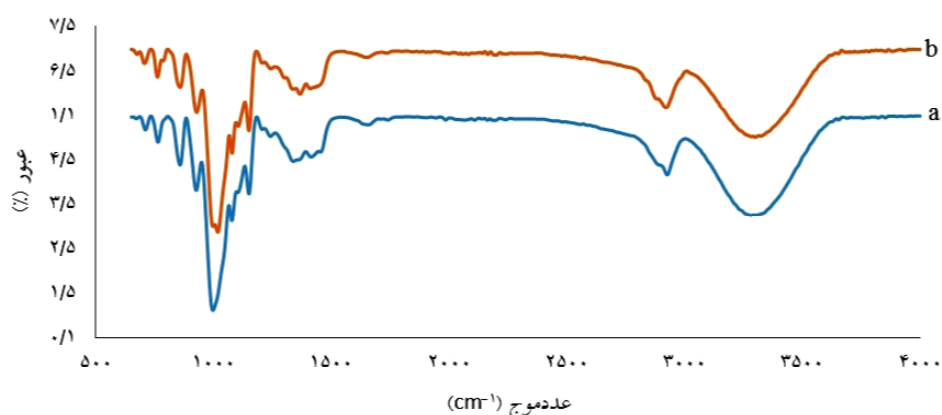
3-6 - آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

مجهز به سل بازتابش کلی باریک ATR-FTIR

طیف ATR-FTIR مربوط به فیلم نشاسته‌ای شاهد (الف) و فیلم حاوی 2٪ اسانس بنه (ب) در شکل (2) نشان داده است. هنگامی که چند ترکیب باهم مخلوط می‌شوند باندهای فیزیکی و برهم‌کنش‌های شیمیایی توسط تغییراتی در پیک‌های طیف منعکس می‌شوند [53]. در طیف فیلم نشاسته باند پهنی در 3317 cm^{-1} دیده می‌شود که مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌هایی مانند هیدروکسیل است که به دنبال جذب آب به درون پلیمر فیلم ظاهر می‌شوند [54] چنانچه در نتیجه آن، ویژگی آبدوستی نسبتاً بالایی را دارد [55]. پیک در 2928 cm^{-1} مسئول ارتعاش کششی C-H می‌باشد در حالی که باندهایی در 1643 و 1426 cm^{-1} به ترتیب به باندهای (OH) در آب و CH_2 اختصاص دارند [56]. باندهای محدوده‌ی 763 تا 1158 cm^{-1} نیز به ارتعاشات کششی C-O مربوط می‌شود [53]. همان‌طور که در شکل (2) دیده می‌شود، طیف فیلم نشاسته‌ای حاوی اسانس (ب) و شاهد (الف) دارای اختلافات کوچکی در محدوده $(1000-1500 \text{ cm}^{-1})$ می‌باشند به طوری که در مقایسه با فیلم شاهد، در فیلم حاوی اسانس در نقطه 1020 cm^{-1} یک پیک کوچک دیده می‌شود و هم‌چنین در محدوده $(950-1050 \text{ cm}^{-1})$ نیز پیک در نقطه 995 cm^{-1} به نقطه 1018 cm^{-1} جابه‌جا شده

مهارگندگی بالاتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی داشتند که مقاومت بالای باکتری گرم منفی، به وجود غشاء خارجی فسفولیپیدی آن نسبت داده می‌شود که به طور تقریبی به ترکیبات چربی دوست نفوذناپذیر می‌شوند. عدم وجود این سد در باکتری‌های گرم مثبت به اجزاء آب‌گریز اجازه می‌دهد تا با لایه فسفولیپیدی غشاء سلولی تماس مستقیم داشته باشند و بدین صورت اسانس‌ها کارایی خود را داشته و باعث افزایش نفوذپذیری به یون‌ها و در پی آن نشت ترکیبات حیاتی داخل سلول شوند [36]. با توجه به نتایج آزمون در بین باکتری‌های گرم مثبت، استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین و باسیلوس سوبتیلیس مقاوم‌ترین باکتری بودند که دلیل مقاومت بالای این باکتری می‌تواند اسپورزا بودن آن باشد [44]. هم‌چنین در بین باکتری‌های گرم منفی شیگلا دیسنتری حساس‌ترین و سالمونلا تیفی مقاوم‌ترین باکتری بود که مقاومت آن را می‌توان به وجود سیستم چندگانه ترکیبی که مسئول ایجاد تغییر در محیط خارجی است، نسبت داد [45]. از بین قارچ‌های مورد آزمون نیز کاندیدا آلبیکانس حساس‌ترین و آسپرژیلوس فلاووس مقاوم‌ترین قارچ می‌باشد که چنین نتیجه‌ای در پژوهش بن‌هامو و همکاران نیز گزارش شده است [46].

از آنجا که اطلاعاتی در مورد تأثیر ضد میکروبی فیلم فعال حاوی اسانس بنه در دسترس نبود، بنابراین نتایج مطالعه حاضر با یافته‌هایی از اسانس بنه به تنهایی مقایسه می‌شود. در برخی مطالعات حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به ترکیبات صمغ بنه نسبت به باکتری‌های گرم منفی گزارش شده است که در توافق با نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌باشد [47، 48] و در برخی از مطالعات مبنی بر بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف حاصل از صمغ و سایر اجزاء انواع گونه‌های گیاه بنه علاوه بر حساسیت بالای باکتری‌های گرم منفی به ارتباط مستقیم افزایش فعالیت ضد میکروبی با افزایش غلظت اسانس یا عصاره اشاره شده است [20، 34 و 48]. فعالیت ضد میکروبی در این اسانس را می‌توان به ترکیباتی نظیر لینالول و آلفاترپینئول [32، 47]، کارواکرول، کامفن و لیمونن [34]، آلفاپینن [35]، 1 و 8 سینئول، بورنتول، کارواکرول و تیمول و سایر پیش‌سازهای آن‌ها (پاراسیمن و ترپینن) [48]، ترپینولن [49]، ترپینئول [50] نسبت داد که ترپینئول از



شکل (2) طیف ATR-FTIR برای الف) فیلم نشاسته‌ای شاهد و ب) فیلم نشاسته‌ای حاوی 2% اسانس بنه

برهمکنش‌های شیمیایی بین ترکیبات اسانس و گروه‌های عاملی شبکه بسیاری نشاسته بود. در نهایت چنین پیشنهاد می‌شود که می‌توان از فیلم‌های فعال نشاسته‌ای حاوی اسانس بنه، به‌عنوان یک بسته‌بندی ضد اکسایش و ضد میکروب در نگهداری محصولات با رطوبت پایین و چربی زیاد مثل کیک‌های چرب استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان بابت حمایت مالی انجام این پایان‌نامه کارشناسی ارشد، که مقاله حاضر بخشی از نتایج آن بود، تقدیر و قدردانی می‌گردد.

است. و این اختلافات نشان می‌دهد که ترکیبات اسانس بنه با گروه‌های عاملی نشاسته برهم‌کنش‌های شیمیایی هرچند اندک ایجاد کرده است.

4- نتیجه‌گیری

در این مطالعه امکان تولید فیلم نشاسته‌ای حاوی اسانس صمغ بنه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون تعیین فعالیت ضد اکسایشی نشان داد که این فیلم‌ها دارای فعالیت ضد اکسایشی بسیار خوبی بوده و به‌خصوص در غلظت‌های زیاد اسانس اثر قابل توجهی بر مهار رشد طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زا داشتند. طیف ATR-FTIR حاصل از فیلم حاوی اسانس بنه نیز نشان‌دهنده

منابع

- Food Sci. Technol.*, 22, 292-303.
- [4] Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food Bioproc. Technol.*, 5(6), 2058-2076.
- [5] Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C.S. Lampasona, M.P., Catalan, C.A.N. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food Chem. Toxicol.*, 46, 3295-3302.
- [1] Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends Food Sci. Technol.*, 14(3), 71-78.
- [2] Janjarasskul, T., Krochta, J. M. (2010). Edible Packaging Materials. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 1, 415- 448.
- [3] Falguera, V., Quintero, J. P., Jimenez, A., Munoz, J. A., Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends*

- jae-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M.J., Khaksar, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carb. Pol.*, 98, 1117-1126.
- [15] Salarbashi, D., Tajik, S., Ghasemlou, M., Shojae-Aliabadi, S., Noghabi, M. S., Khaksar, R. (2013). Characterization of soluble soybean polysaccharide film incorporated essential oil intended for food packaging. *Carb. Pol.*, 98(1), 1127-1136.
- [16] Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare L.* essential oil. *Ind. Crops Prod.*, 67, 403-413.
- [17] Padulosi, S., Hadj-Hassan, A. (1998). Towards a comprehensive documentation of distribution and use of Pistacia: genetic diversity in central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. Report of the IPGRI Workshop. 16-26.
- [18] Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani, M.H., Sharif, A. (2013). Assaying Antioxidant Characteristics of Sesame Seed, Rice Bran, and Bene Hull Oils and their Un-saponifiable Matters by Using DPPH Radical-Scavenging Model System. *J. Agri. Sci. Technol.*, 15, 241-253.
- [19] Tohidi, M., Khayami, M., Nejati, V., Meftahizade, H. (2011). Evaluation of antibacterial activity and wound healing of Pistacia atlantica and Pistacia khinjuk. *J. Med. Plant Res.*, 5, 4310-4314.
- [20] Mohagheghzadeh, A., Faridi, P., Ghasemi, Y. (2010). Analysis of mount Atlas mastic smoke: A potential food preservative. *Fitoterapia*, 81, 57-580.
- [21] Hatamnia, A. A., Abbaspour, N., Darvishzadeh, R. (2014). Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *kurdica*) fruits. *Food chem.*, 145, 306-311.
- [22] Gourine, N., Yousfi, M., Bombarda, I., Nadjemi, B., Stocker, P., Gaydon, E.M. (2010). Antioxidant ac-
- [6] De Moura, M. R., Mattoso, L. H., Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *J. Food Eng.*, 109(3), 520-524.
- [7] Muñoz-Bonilla, A., Fernández-García, M. 2012. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.*, 37(2), 281-339.
- [8] Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.*, 78, 90-103.
- [9] Manso, S., Pezo, D., Gómez-Lus, R., Nerín, C. (2014). Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil. *Food Control*, 45, 101-108
- [10] Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J.I. Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydroc.*, 33, 92-98.
- [11] Mehdizadeh, T., Tajik, H., Rohani, S. M. R., Oromiehie, A. R. (2012). Antibacterial, antioxidant and optical properties of edible starch-chitosan composite film containing *Thymus kotschyanus* essential oil. In: Veterinary Research Forum p, 167. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- [12] Avila-Sosa, R., Palou, E., Mungua, M. T. M., Nevarez-Moorillon, G. V., Cruz, A. R. N., Lopez-Malo, A. (2012). Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *Int. J. Food Mic.*, 153, 66-72.
- [13] Bonilla, J., Talón, E., Atarés, L., Vargas, M., Chiralt, A. (2013). Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch-chitosan films. *J. Food Eng.*, 118(3), 271-278.
- [14] Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Sho-

- Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. *J. Agric. Food Chem.*, 53(20), 7681-7685.
- [33]. Hussain, A.I., Anwar, F., Hussain Sherazi, S.T., Przybylski, R., (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem.*, 108, 986-995.
- [34] Alma, M. H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Dirgrak, M., Efe, F. T., Yilmaz, N. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 52(12), 3911-3914.
- [35] Delazar, A., Reid, R. G., Sarker, S. D. (2004). GC-MS analysis of the essential oil from the oleoresin of *Pistacia atlantica* var. mutica. *Chem. Natural Comp.*, 40, 24-27.
- [36] Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiology Rev.*, 12, 564-582.
- [37] Shaaban, H. A., Mahmoud, K. F. (2014). In-vitro antibacterial and antioxidant properties of starch/chitosan edible composite film incorporated with thyme essential oil. *J. Arab Soci. Med. Res.*, 9(2), 54.
- [38] Martucci, J.F. Gende, L.B. Neira, L.M., Ruseckaitė, R.A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Ind. Crops Prod.*, 71, 205-213.
- [39] Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind. Crops Prod.*, 36, 81-87.
- [40]. Gomez-Estaca, J., Gimnez, B., Montero, P., Gomez-Guillén, M. C. (2009). Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole activities and chemical composition of essential oil of *Pistacia atlantica* from Algeria. *Ind. Crops Prod.*, 31, 203-208.
- [23] Hosseini, F., Adlgostar, A., Sharifnia, F. (2013). Antibacterial activity of *Pistacia* extracts on *Streptococcus mutans* biofilm. *Int. Res. J. Biol. Sci.*, 2(2), 1-7.
- [24]. British Pharmacopoeia. (1988), London, HMSO, (2), pp, 137-8.
- [25] Barzegar, H., Azizi, M. H., Barzegar, M., Hamidi-Esfahani, Z. (2014). Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch-clay nanocomposite films. *Carb. Pol.*, 110, 26-31.
- [26]. Siripatrawan, U., 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.
- [27] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28(1): 25-30.
- [28]. Bellik, Y. (2014). Total antioxidant activity and antimicrobial potency of the essential oil and oleoresin of *Zingiber officinale* Roscoe. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, 1, 40-44.
- [29] Shen, X. L., Wu, J. M., Chen, Y., Zhao, G. (2010). Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 285-290.
- [30] Souza, A. C., Dias, A. M., Sousa, H. C., Tadini, C. C. (2014). Impregnation of cinnamaldehyde into cassava starch biocomposite films using supercritical fluid technology for the development of food active packaging. *Carb. Pol.*, 102, 830-837.
- [31] Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Yannovits-Argiriadis, N. (1999). Chemical composition of the essential oil of Chios turpentine. *J. Essen. Oil Res.*, 11(3), 367-368.
- [32]. Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A. (2005).

- M., Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, 22, 1046-1053.
- [49] Raman, A., Weir, U., Bloomfield, S. F. (1995). Antimicrobial effects of teatree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *J. Appl. Microbiol.*, 21, 242-245.
- [50] Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A. (2007). Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 55(17), 7093-7098.
- [51] Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies and interaction with food matrix components. 3(12), 1-24.
- [52] Thormar, H. (2011). *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. John Wiley & Sons. P, 220.
- [53]. Zhang, L., Li, R., Dong, F., Tian, A., Li, Z., Dai, Y.(2015). Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ϵ -poly-L-lysine. *Food Chem*, 166, 107-114.
- [54] Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A., Tehrani, E. A. (2014). Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35, 159-169.
- [55] Zhang, Y., Han, J. H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *J. Food Sci.*, 71(6):E253-E261.
- [56]. Mano, J. F., Koniarova, D., Reis, R. L.(2003). Thermal properties of thermoplastic of Materials. *Sci. Mater. Med.*, 14, 127-135.
- skin gelatin or a commercial fish gelatin. *J. Food Eng.*, 92, 78-85.
- [41] Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Food Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- [42] Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S. Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21, 1408-1414.
- [43] Shojaee-Aliabadi, S., Mohammadifar, M. A., Hosseini, H., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Hosseini, S., M. and Khaksar, R. (2014). Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. *Int. J. Biol. Macro.*, 69, 282-289.
- [44] Chaibi, A., Ababouch, L. H., Belasri, K., Boucetta, S., Busta, F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* 62A spores by essential oils. *Food Microbiology*, 14(2), 161-174.
- [45] Chi, P.T.L. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from citrus varieties in Vietnam. Thesis of master degree. Hochiminh city international university. Vietnam, 1-75.
- [46] Benhammou N., Bekkara F.A., Panovska T.K. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 2(2), 022-028.
- [47] Paraschos, S., Magiatis, P., Gousia, P., Economou, V., Sakkas, H., Papadopoulou, C., Skaltsounis, A. L. (2011). Chemical investigation and antimicrobial properties of mastic water and its major constituents. *Food Chem.*, 129(3), 907-911.
- [48]. Djenane, D., Yangüela, J., Yangüela, L., Djerbal,