

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر عصاره اتانولی بره موم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ریزساختاری، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم مرکب نشاسته - ژلاتین - پلی‌وینیل‌الکل

محمد جواد عابدی^۱، محسن اسمعیلی^{۲*}، هادی الماسی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۷، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۷/۱۰/۱۲، تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱)

چکیده

در این مطالعه، فیلم زیست تخریب پذیر مرکب بر پایه نشاسته گندم، ژلاتین و پلی‌وینیل‌الکل تهیه شد و از عصاره اتانولی بره موم ۵، ۱۰ و ۲۰٪ به منظور ایجاد خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در آن استفاده شد. فیلم‌ها به روش قالب ریزی حلال تهیه شدند و خواص ریزساختاری، مکانیکی، بازدارندگی، ظاهری، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمونه شاهد به دلیل عدم سازگاری بیوپلیمرها با یکدیگر، فیلم یکنواختی تشکیل نشد، اما با افزودن عصاره، یکنواختی فیلم افزایش یافت و مطابق تصاویر SEM، میزان ترک‌ها و شکاف‌ها در فیلم کمتر شد. آزمون FT-IR تشکیل اتصالات جدید بین بیوپلیمرها و ترکیبات عصاره بره موم را تأیید نمود. افزودن عصاره باعث کاهش استحکام کششی، نفوذ پذیری بخار آب و کدورت فیلم مرکب گردید اما ازدیاد طول تا نقطه شکست و اندیس زردی را افزایش داد. محتوای فنل کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم مرکب با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. غلظت‌های مختلف عصاره بر روی تمام ویژگی‌های فیلم مرکب به جز میزان جذب رطوبت اثر معنی‌دار داشت. فیلم‌های حاوی عصاره اثرات ضد میکروبی قوی‌تری بر روی باکتری *S. aureus* در مقایسه با باکتری *E. coli* از خود نشان دادند. به‌طور کلی فیلم حاوی ۱۰٪ عصاره بهترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی را نشان داد. نتایج این پژوهش نشان داد که فیلم مرکب حاوی عصاره بره موم می‌تواند به‌عنوان بسته‌بندی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: فیلم مرکب، بره موم، خواص فیزیکی، ریزساختار، خاصیت ضد میکروبی.

۱. مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل گسترش آلودگی‌های زیست محیطی در اثر استفاده از پلاستیک‌های حاصل از مشتقات نفتی، توجه به استفاده از بیوپلیمرهای زیست تخریب پذیر در بسته‌بندی مواد غذایی افزایش یافته است. پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها، برخی از لیپیدها و یا ترکیب آن‌ها برای تولید فیلم‌های زیست تخریب پذیر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲،۱]. بررسی‌ها نشان داد که ترکیب بیوپلیمرهای مختلف نسبت به استفاده از یک بیوپلیمر خالص، فیلمی با ویژگی‌های مطلوب‌تر تولید می‌کند زیرا در این حالت همزمان می‌توان از کلیه خصوصیات مطلوب بیوپلیمرها بهره جست و همچنین آن‌ها اثرات نامطلوب و معایب یکدیگر را پوشش خواهند داد [۴،۳].

نشاسته یکی از رایج‌ترین موادی است که در تولید فیلم‌های خوراکی استفاده می‌شود، زیرا یک منبع تجدیدپذیر و ارزان قیمت بوده و به‌طور گسترده در دسترس می‌باشد و استفاده از آن به آسانی امکان پذیر است. نشاسته یک کربوهیدرات پلیمری است که از واحدهای گلوکز تشکیل شده و پس از سلولز فراوان‌ترین پلی ساکارید موجود در طبیعت است. نشاسته دارای دو نوع پلیمر گلوکز است: یک مولکول زنجیره‌ای خطی که آمیلوز نامیده می‌شود و یک پلیمر انشعابی از گلوکز که آمیلوپکتین نام دارد [۵]. از نشاسته به‌طور گسترده به‌عنوان ترکیب تولید کننده فیلم های خوراکی استفاده شده است [۷،۶].

یکی از بیوپلیمرهای پروتئینی دیگر، پروتئین ژلاتین است. ژلاتین یک پلی پپتید با وزن مولکولی بالا است که از هیدرولیز کنترل شده کلاژن حاصل از بافت‌های پیوندی، پوست، استخوان و تاندون‌ها مشتق می‌شود. مشخصه خاص ژلاتین، میزان بالای آمینواسیدهای گلیسین، پرولین و هیدروکسی پرولین و همچنین ویژگی آبدوستی آن است [۹،۸]. ژلاتین زیست سازگاری، شکل پذیری و قابلیت چسبندگی عالی از خود نشان می‌دهد و با تشکیل فیلم‌ها و پوشش‌هایی با ویژگی‌های مکانیکی و ممانعت‌کنندگی مناسب در برابر گازها در رطوبت نسبی پایین، می‌تواند به‌عنوان مواد بسته‌بندی زیستی به خوبی عمل کند. فیلم‌های ژلاتین شفاف، انعطاف پذیر و در عین حال محکم هستند [۱۰-۱۲].

یک بیوپلیمر دیگر، بیوپلیمر سنتزی پلی وینیل الکل (PVA) است که محصول هیدرولیز پلیمر پلی وینیل استات بوده و محلول در آب است. PVA خاصیت تشکیل فیلم عالی و ویژگی

امولسیون‌کنندگی دارد و آماده سازی آسان، مقاومت در برابر مواد شیمیایی، خواص مکانیکی خوب و قابلیت زیست تخریب پذیری، PVA را به گزینه مناسبی جهت اختلاط با پلیمرهای طبیعی در تولید فیلم‌های مرکب تبدیل کرده است [۱۳]. به این ترتیب، PVA به‌عنوان یک جزء در تولید فیلم‌های مرکب با پلیمرهای زیستی دیگر مانند کیتوزان، نشاسته، کربوکسی متیل سلولز، صمغ بادام هندی و پالپ چغندر قند مورد استفاده قرار گرفته است [۱۴-۱۸]. وجود گروه‌های هیدروکسیل در نشاسته و پلی وینیل الکل و در نتیجه برقراری پیوندهای هیدروژنی بین آن‌ها به‌طور بالقوه می‌تواند باعث افزایش قابلیت امتزاج پذیری و بهبود ویژگی‌های فیزیکی ترکیبات حاصل از آن‌ها شود [۱۹]. پلی وینیل الکل نسبت به نفوذ حلال‌ها و روغن مقاوم است و مانند یک بازدارنده قوی در برابر اکسیژن و آروما عمل می‌کند [۲۰].

فیلم‌های تولید شده با بیوپلیمرهای زیست تخریب پذیر توانایی حمل ترکیبات فعال را دارند و این امر به توسعه فناوری جدید در بسته‌بندی مواد غذایی به نام بسته‌بندی فعال منجر شده است. بسته‌بندی فعال نوعی بسته‌بندی است که در آن از انواع مختلف مواد نگه‌دارنده مانند ترکیبات ضد میکروبی، آنتی اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی و ترکیبات مختلف دیگر در فرمولاسیون فیلم بسته‌بندی استفاده می‌شود و این ترکیبات در طول زمان و با تماس فیلم بسته‌بندی با سطح ماده غذایی، به کاهش تأثیر عوامل ناپایدار کننده و کنترل گسترش عوامل فساد کمک می‌کنند. از آنجایی که بسیاری از عوامل فساد میکروبی یا اکسیداتیو از سطح ماده غذایی شروع به فعالیت می‌کنند، استفاده از بسته‌بندی فعال، در کنترل فساد مواد غذایی موثرتر از افزودن مستقیم ترکیب فعال به داخل ماده غذایی خواهد بود [۲۱].

بره موم یک ماده طبیعی رزینی است که توسط زنبور عسل از گیاهان جمع آوری می‌شود و به‌عنوان ترکیبی پیچیده از مواد شیمیایی شناخته می‌شود که ترکیب آن بستگی به مواد تشکیل دهنده با منشأ گیاهی و زمان جمع آوری دارد. بره موم به‌طور معمول شامل رزین (۵۰٪)، روغن‌های ضروری (۱۰٪)، گرده (۵٪) و ترکیبات مختلف دیگر (۵٪) از قبیل روی و آهن، ویتامین‌ها (B₁, B₂, B₃, B₆)، بنزوئیک اسید، اسیدهای چرب، لاکتون‌ها، کینون‌ها، استروئیدها و قندها و رنگدانه‌های طبیعی از قبیل کلروفیل و کاروتنوئیدها می‌باشد. رنگ بره موم از رنگ زرد-سبز

۲.۲. آماده سازی عصاره الکلی بره موم

از روش بودینی و همکاران [۴] با کمی تغییرات برای تهیه عصاره اتانولی بره موم استفاده شد. برای این منظور ۱۰ g از نمونه بره موم به دقت توزین و سپس به آن ۱۰۰ mL اتانول ۹۶٪ اضافه شد و بر روی همزن مغناطیسی با دمای 40°C و سرعت 500 rpm به مدت 30 min مخلوط شد تا بره موم در الکل حل شود. سپس مخلوط حاصله از کاغذ صافی عبور داده شد تا ذرات جامد موجود در مخلوط جدا شود و پس از عبور از کاغذ صافی، محلولی یکنواخت و شفاف به دست آمد. سپس کاغذ صافی‌ها در آن در دمای 110°C خشک گردیدند و وزن خالص بره موم موجود در محلول عصاره با تفاضل وزن مواد جامد خشک شده بر روی کاغذ صافی از وزن اولیه بره موم به دست آمد. پس از آن عصاره الکلی بره موم با اتانول ۹۶٪ به حجم ۱۰۰ mL رسانده و محلول تا زمان استفاده در جای خنک و تاریک نگهداری شد.

۲.۳. روش تهیه فیلم

برای تهیه محلول فیلم‌ها از روش اصلاح شده باسیاک و همکاران [۳۰] استفاده شد. ۲g نشاسته گندم در ۱۵۰ mL آب مقطر پخش و بر روی همزن مغناطیسی به مدت 30 min همزده شد. سپس در حمام آب گرم با دمای 95°C با همزدن مداوم به مدت 40 min ژلاتینه شد. ۱/۲g ژلاتین در ۵۰ mL آب در دمای 40°C به مدت 10 min بر روی همزن مغناطیسی با سرعت 500 rpm حل و سپس ۰/۸g PVA به محلول ژلاتین اضافه شد و دما تا 90°C افزایش یافت تا PVA نیز حل شود. پس از حل شدن PVA و ژلاتین، این محلول با محلول نشاسته ژلاتینه شده با سرعت 500 rpm بر روی همزن مغناطیسی مخلوط و سپس محلول حاصله تا رسیدن به دمای محیط خنک گردید. پس از خنک شدن محلول، گلیسرول به میزان ۳۰٪ مجموع وزن بیوپلیمرها اضافه و دوباره به مدت 10 min توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس برای فیلم‌های حاوی بره موم، عصاره الکلی بره موم (EPE) به نسبت‌های ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰٪ وزن ماده خشک، به محلول فیلم‌ساز اضافه گردید. در ادامه، محلول درون پلیت‌های پلی استایرنی ۹/۵cm ریخته شد و پس از گذشت ۴۸ h در دمای 35°C فیلم‌ها خشک شده و سپس جدا و در کیسه‌های زیپ دار نگهداری شد.

تا قهوه‌ای تیره بسته به نوع منبع و زمان تولید آن متفاوت است [۲۳، ۲۲]. بره موم به‌خاطر خواص بیولوژیک آن شناخته شده و فعالیت ضدباکتریایی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد ویروسی آن اثبات شده است. فعالیت ضدباکتریایی بره موم به‌طور عمده به فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولی نسبت داده می‌شود و مکانیسم عمل آن را می‌توان با چندین مکانیسم مانند تغییر نفوذپذیری غشاء و مهار سنتز پروتئین توسط فعالیت سینرژیستی بین ترکیبات فنلی و سایر ترکیبات توضیح داد [۲۷-۲۴]. مطالعات اخیر نشان داده که بره موم توانایی استفاده در سیستم‌های بسته‌بندی ضد میکروبی مواد غذایی بر پایه بیوپلیمرها را به‌عنوان عامل ضد میکروبی و آنتی اکسیدان طبیعی دارد. بیوپلیمرهای که تاکنون به‌عنوان حامل بره موم مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند عبارتند از هیدروکسی پروپیل متیل سلولز، نشاسته کاساوا و پلی لاکتیک اسید [۲۱، ۲۸، ۲۹]. در این پژوهش برای اولین بار فیلم مرکب نشاسته گندم- ژلاتین- PVA تولید شده است. با وجود امتزاج ناپذیری برخی از این ترکیبات با یکدیگر، تأثیر حضور عصاره الکلی بره موم بر روی اختلاط یکنواخت این بیوپلیمرها در فرمولاسیون فیلم مرکب بررسی شده است. همچنین اثر این ماده بر روی ویژگی‌های فیزیکی و مورفولوژیکی و همچنین خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی فیلم مرکب مورد ارزیابی قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل نشاسته گندم، پلی وینیل الکل، ژلاتین، گلیسرول، کلسیم نیترات، سدیم کربنات، و محیط کشت نوترینت آگار از شرکت Merck آلمان تهیه شد. همچنین معرف DPPH، کلسیم سولفات، پتاسیم سولفات، توئین ۸۰، اسید گالیک و معرف فولین سیو کالتیو از شرکت سیگما آلد ریج آلمان خریداری شد. بره موم از مزارع پرورش زنبور عسل استان آذربایجان شرقی تهیه شد. همچنین سوش‌های استاندارد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و اشریشیا کلای H_7O_{157} (700728ATCC) از سازمان پژوهش‌های صنعتی و علمی ایران تهیه شد.

A مساحت سطح مقطع فیلم (m^2)، F_{max} حداکثر نیرو در نقطه شکست (N)، L_{max} کشیدگی فیلم در نقطه پارگی (m)، L_0 طول اولیه نمونه فیلم (m)، F نیرو (N) و ΔL تغییرات طول نمونه تا نقطه پارگی (m) می‌باشد.

۷.۲. نفوذپذیری نسبت به بخار آب

برای اندازه‌گیری انتقال بخار آب از روش ASTM E96 استفاده شد [۳۳]. برای این کار از ویال‌های مخصوصی با قطر $2/8$ cm و ارتفاع $8/5$ cm استفاده شد. در درپوش این ویال‌ها منفذی به قطر 5 mm وجود دارد که قطعه‌ای از فیلم مورد آزمون در این قسمت قرار می‌گیرد. 3 g سولفات کلسیم در داخل ویال‌ها قرار داده شد. قطعه‌ای از فیلم بریده شده و در درپوش ویال قرار گرفته و بر روی ویال بسته شد. ویال‌ها با تمام محتویات توزین و درون دسیکاتوری حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار گرفتند. جهت اطمینان از حفظ حالت اشباع، اجازه داده می‌شود که مقداری رسوب سولفات پتاسیم در کف دسیکاتور ایجاد شود. سولفات پتاسیم اشباع در دمای $25^\circ C$ ، رطوبت نسبی 97% ایجاد می‌کند. سپس به مدت 4 روز و هر چند ساعت یکبار وزن ویال‌ها اندازه‌گیری شد.

مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها، از روی افزایش وزن ویال‌ها تعیین شد. منحنی افزایش وزن ویال‌ها با گذشت زمان رسم و پس از محاسبه رگرسیون خطی، شیب خط حاصل محاسبه گردید. از تقسیم کردن شیب خط مربوط به هر ویال، به سطح کل فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشت، آهنگ انتقال بخار (WVTR) به دست آمد. سپس با استفاده از رابطه زیر، نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP) محاسبه شد:

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \cdot X \quad (4)$$

X: ضخامت فیلم (m)

P: فشار بخار آب خالص در $25^\circ C$ (3169 Pa)

R_1 : رطوبت نسبی در دسیکاتور (97%)

R_2 : رطوبت نسبی در داخل ویال (0%)

این آزمون در مورد هر کدام از نمونه‌ها سه بار تکرار شد.

۸.۲. جذب رطوبت

برای اندازه‌گیری میزان جذب رطوبت فیلم‌ها از روش آنجلس

۴.۲. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)

برای بررسی برهمکنش‌ها در ماتریس فیلم‌ها از طیف سنجی FT-IR مدل PERKIN ELMER ساخت شرکت Perkin Elmer کشور آمریکا، در محدوده تا $4000-400$ cm^{-1} و در تفکیک پذیری $0/5$ cm^{-1} استفاده گردید. ابتدا دستگاه را با قرص KBr به عنوان نمونه کنترل صفر کرده و سپس آماده سازی نمونه‌ها برای آنالیز FT-IR با مخلوط کردن 1 mg از نمونه‌های کاملاً خشک شده با 150 mg پودر KBr خشک انجام شد. قرص نازکی از هر نمونه از طریق فشردن مخلوط با فشار 60 kPa به مدت 10 min در یک دستگاه پرس تهیه شد.

۵.۲. آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی سطحی فیلم‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Leo 1430 VP, Oberkochen کشور آلمان، استفاده گردید. به منظور بررسی تاثیر عصاره الکلی بره موم روی زیرساختار فیلم‌ها، نمونه شاهد و فیلم حاوی 10% عصاره بره موم توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی مورد تصویربرداری قرار گرفتند. ابتدا فیلم‌ها توسط چسب دوطرفه روی پایه آلومینیومی چسبانده شدند. سپس پایه‌ها در یک دستگاه پوشش دهنده (SC 7620 mini sputter coater) به مدت 5 min با طلا و پلاتین پوشش‌دهی شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها با بزرگنمایی‌های مختلف صورت گرفت [۳۱].

۶.۲. خواص مکانیکی

مقاومت کششی، ازدیاد طول تا نقطه شکست و مدول یانگ فیلم‌ها توسط دستگاه بافت سنج TA-XTplus Analyser مطابق روش ASTM D882-95 اندازه‌گیری شدند [۳۲]. قبل از انجام آزمایشات کشش، تمامی نمونه‌ها از نظر رطوبتی در داخل دسیکاتور حاوی محلول اشباع کلسیم نیترات با رطوبت نسبی 95% و دمای محیط واجد شرایط گردیدند. سپس از هر کدام از فیلم‌ها سه نمونه به صورت دمبلی شکل با ابعاد 5 cm \times 5 cm بریده شد. فاصله بین دو فک 2 cm و سرعت حرکت فک بالایی 5 mm/min انتخاب گردید.

$$F_{max}/A = \text{مقاومت کششی} \quad (1)$$

$$(L_{max}/L_0) \times 100 = \text{ازدیاد طول تا نقطه شکست} \quad (2)$$

$$(F.L)/(A.\Delta L) = \text{مدول یانگ} \quad (3)$$

۱۰.۲. اندازه‌گیری خواص ضد میکروبی

برای تعیین خاصیت ضد میکروبی فیلم‌های مرکب از روش نفوذ ترکیبات ضد میکروبی فیلم در محیط آگار استفاده شد. در این روش فیلم‌ها به صورت صفحه‌های دایره‌ای به قطر ۶ mm بریده و به محیط کشت آگار مغذی که از قبل با 10^6 cfu/mL -۱ از میکروارگانیسم‌های E.coli و S.aureus تلقیح شده بود منتقل شدند. پس از آن پتری دیش‌های حاوی محیط کشت آلوده همراه با فیلم‌های ضد میکروبی به مدت ۲۴ h در انکوباتور با دمای 37°C نگهداری شدند. برای آگاهی از میزان ممانعت‌کنندگی فیلم از رشد میکروارگانیسم‌ها قطر هاله عدم رشد تشکیل شده در اطراف فیلم‌ها با استفاده از کولیس با دقت $0.1/0.1$ mm اندازه‌گیری شد [۳۶].

۱۱.۲. تعیین محتوای فنولی تام

برای اندازه‌گیری ترکیبات فنولی فیلم‌ها، از روش رنگ سنجی فولین سیو کالتیو استفاده شد. مقدار ۲۵ mg از فیلم در ۳mL آب مقطر قرار داده و به مدت ۵ min به آرامی هم‌زده شد. سپس ۰/۱ mL از عصاره فیلم، با ۷ mL آب مقطر در داخل لوله آزمایشگاهی ریخته و در مرحله بعد، ۰/۵ mL از معرف فولین اضافه و محتویات با هم مخلوط شد. پس از ۸ min، ۱/۵ mL کربنات سدیم اشباع به لوله اضافه شده و حجم مخلوط با آب مقطر به ۱۰ mL رسانده شد. لوله‌ها به مدت ۲ h در دمای اتاق نگهداری و سپس مقدار جذب در طول موج ۷۶۵ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. اسید گالیک به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت [۳۵] و از روی منحنی استاندارد رسم شده برای اسید گالیک ($y=0.0022x+0.0139$); $R^2=0.9909$) به غلظت تبدیل شد و برحسب mg معادل گالیک اسید بر حسب g بیان گردید.

۱۲.۲. اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد فیلم‌های تولیدی با روش اسپکتروفتومتری و براساس بی رنگ کردن محلول بنفش رنگ DPPH به‌عنوان معرف اندازه‌گیری شد [۳۷، ۳۸]. ابتدا ۲۵ mg از هر نمونه فیلم با ۴ mL مقطر مخلوط و به مدت ۲ min هم‌زده شد. سپس مخلوط سانتریفیوژ شده و ۲ mL از عصاره استخراج شده از فیلم با ۰/۲ mL محلول متانولی ۱ mM

و دوفرسنه استفاده شد [۳۴]. نمونه‌هایی از فیلم‌ها با ابعاد 20×20 mm² تهیه گردید و در دسیکاتوری حاوی سولفات کلسیم (RH=۰/۰) به مدت ۲۴ h قرار گرفت. پس از توزین اولیه، نمونه‌ها به دسیکاتوری حاوی محلول اشباع کلسیم نیترات (RH=۰/۵۵) در دمای $25-20^\circ\text{C}$ منتقل شدند. سپس وزن نمونه‌ها در زمان‌های مختلف تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری و میزان جذب رطوبت از رابطه (۵) محاسبه گردید:

$$\text{درصد جذب رطوبت} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

W_t : وزن نمونه پس از زمان t در (RH=۰/۵۵)
 W_0 : وزن اولیه نمونه

این آزمون در مورد هر کدام از نمونه‌ها سه بار تکرار گردید.

۹.۲. اندازه‌گیری خواص رنگی و کدورت

جهت تعیین رنگ سطحی نمونه‌ها از دستگاه رنگ سنج (Colorimeter Minolta model CR-410, Tokyo, Japan) استفاده گردید. میزان رنگ با استفاده از پارامترهای دستگاه بر حسب روشنایی (L^*)، قرمزی - سبزی (a^*) و زردی - آبی (b^*) و با استفاده از یک صفحه سفید استاندارد ($a^* = -$, $b^* = 7/16$, $L^* = 94/7$) بیان گردید. اختلاف رنگ کلی، اندیس زردی و اندیس سفیدی نمونه‌ها به صورت زیر محاسبه گردید:

$$\Delta E = [(L_{\text{standard}} - L_{\text{sample}})^2 + (a_{\text{standard}} - a_{\text{sample}})^2 + (b_{\text{standard}} - b_{\text{sample}})^2]^{0.5} \quad (6)$$

$$YI = \frac{142/86b}{L} \quad (7)$$

$$WI = 100 - [(100 - L)^2 + a^2 + b^2]^{0.5} \quad (8)$$

کدورت فیلم‌ها نیز از طریق جذب فیلم‌ها در طول موج ۶۰۰ nm در دستگاه اسپکتروفتومتر انجام و میزان آن نیز از رابطه زیر محاسبه گردید [۳۵]:

$$\text{Opacity} = \frac{\text{Abs}_{600}}{x} \quad (9)$$

در این رابطه Abs_{600} میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ nm و x ضخامت فیلم بر حسب mm می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

۳.۱. بررسی خواص ظاهری فیلم‌های تهیه شده

پس از تهیه محلول یکنواخت فیلم مرکب نشاسته-ژلاتین-PVA مشاهده گردید که فیلم حاصل از این محلول، پس از خشک شدن و جدا شدن، از نظر تشکیل شبکه پلیمری یکنواخت، دارای معیایی بود و همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود در فیلم حاصله دو قسمت مجزا به وجود می‌آید که احتمالاً بخاطر عدم شرکت یک پلیمر در ساختار ماتریس فیلم مرکب است و با توجه به رنگ آن احتمال می‌رود که پلیمر مورد نظر نشاسته باشد. احتمالاً رفتار رتروگراداسیون نشاسته در حین سردسازی و خشک کردن محلول آن می‌تواند به جدا شدن آن از دو بیوپلیمر دیگر منجر شد. اما این مشکل در فیلم‌های حاوی عصاره الکی بره موم به دلیل وجود اثر سازگارکنندگی احتمالی این عصاره مشاهده نشد و با افزودن این عصاره همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود این مشکل برطرف گردید. علاوه بر این در فیلم‌های حاوی عصاره با درصدهای بالاتر از ۱۰٪ مشاهده گردید که این نمونه‌ها نسبت به نمونه‌های با درصد عصاره کمتر، میزان چسبندگی و انعطاف پذیری بیشتری از خود نشان دادند. این تصاویر و همچنین تصاویر میکروسکوپ SEM (شکل ۳) نشان می‌دهند، که عصاره

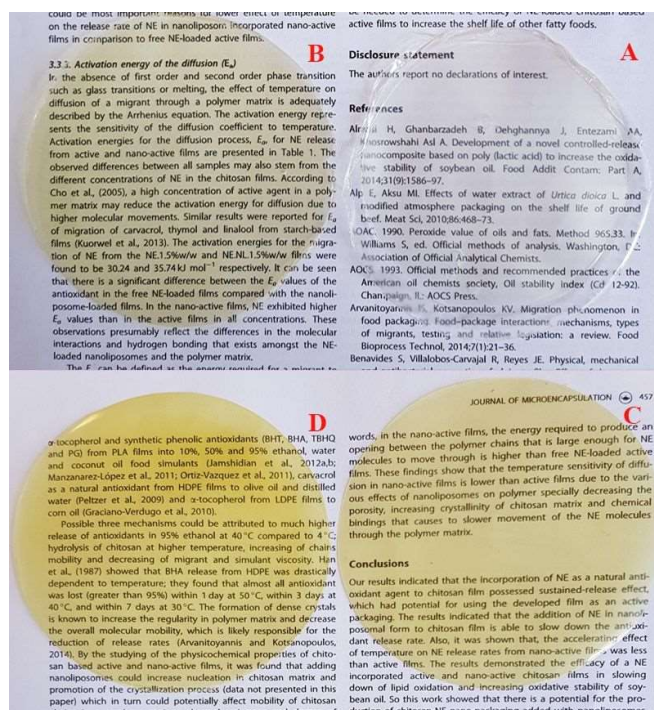
DPPH مخلوط و به مدت ۱ min توسط ورتکس با سرعت ۳۰۰۰ rpm مخلوط گردید. پس از یک ساعت قرار دادن نمونه در دمای محیط و مکان تاریک، جذب آن در طول موج ۵۱۷ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط فیلم‌های فعال تولید شده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$I(\%) = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (10)$$

در این رابطه Ab_{Control} میزان جذب محلول متانولی DPPH در طول موج ۵۱۷ nm و Ab_{Sample} میزان جذب عصاره‌های نمونه‌های فیلم می‌باشد. آزمون روی هر نمونه در سه تکرار انجام شد.

۳.۲. تحلیل آماری

همه آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS23 در سطح احتمال ۵٪ ($p < 0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تایید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.



شکل (۱) تصاویر فیلم‌های مرکب: (a) شاهد و نمونه‌های حاوی (b) ۵٪، (c) ۱۰٪ و (d) ۲۰٪ عصاره اتانولی بره موم

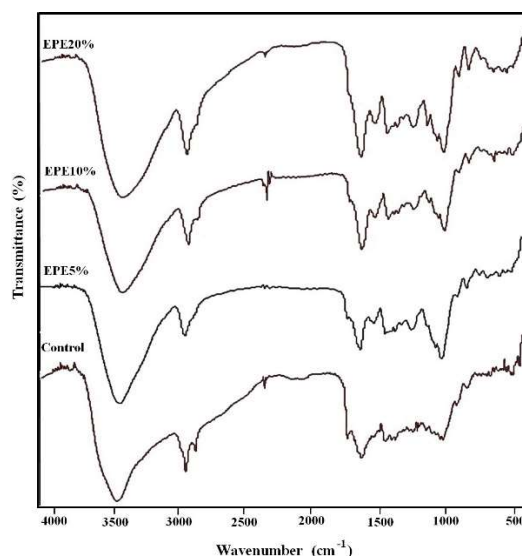
Fig. 1. Images of composite films: a) Control and samples containing b) 5%, c) 10% and d) 20% of ethanolic extract of propolis

C-O (استرها و اترها) و C-O (پلی‌اولها) در ترکیبات فنولی عصاره در محدوده $1800-1000\text{cm}^{-1}$ مشاهده شد. یکی دیگر از تغییرات مهم در فیلم‌های مرکب حاوی عصاره ایجاد پیک جدیدی در جذب 1262cm^{-1} بود که در نمونه حاوی بیشترین درصد عصاره مشاهده شد و مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های O-H ترکیبات فنولی موجود در عصاره می‌باشد. این افزایش و انتقال پیک‌ها، با افزایش غلظت عصاره می‌تواند به تعاملات شدیدتر بین عصاره و بیوپلیمرهای مورد استفاده نسبت داده شود. افزایش شدت پیک در محدوده جذبی $1045-1033\text{cm}^{-1}$ به گروه‌های فنلی نسبت داده شده و پیک 854cm^{-1} مربوط به پیوند C-H حلقه آروماتیک فیلم‌های مرکب حاوی عصاره نسبت داده شده است. لازم به ذکر است، شدت پیک‌های C-H در محدوده $3000-2840\text{cm}^{-1}$ و O-H در بازه $3435-3400\text{cm}^{-1}$ در فیلم‌های فعال نسبت به نمونه شاهد افزایش قابل توجهی داشته که به گروه‌های فنولی موجود در عصاره و تعامل آن با ماتریس فیلم مرکب نسبت داده می‌شود و همچنین پیوندهای C=C حلقه آروماتیک در جذب 1645cm^{-1} و C-H حلقه آروماتیک در محدوده $1650-1450\text{cm}^{-1}$ و $870-675\text{cm}^{-1}$ مشاهده شد که در طیف فیلم شاهد وجود نداشته و نشان دهنده افزوده شدن ترکیبات فنولی موجود در عصاره به ماتریس فیلم مرکب نشاسته-ژلاتین-PVA و ایجاد تعاملات جدید می‌باشد [۴۰-۴۱]. این نتایج مطابق نتایج تحقیق ویچایاکیتی و سیرپتراواران [۴۲] در مطالعه بر روی افزودن عصاره بره موم به فیلم‌های کیتوزانی می‌باشد.

بره موم به اختلاط مطلوب‌تر نشاسته، ژلاتین و PVA کمک می‌کند و در حضور این عصاره، فیلم یکنواخت‌تری از ترکیب این سه بیوپلیمر حاصل می‌شود. بایستی به این نکته نیز توجه داشت که حضور اتانول در عصاره بره موم نیز می‌تواند به اختلاط و امتزاج پذیری بیشتر بیوپلیمرها کمک کند.

۲.۳. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR)

از طیف سنجی FT-IR برای تشخیص ایجاد برهمکنش بین نشاسته، ژلاتین، PVA و ترکیبات پلی فنولیک عصاره بره موم استفاده گردید. شکل (۲) طیف نگاره‌های FT-IR نمونه‌های حاوی درصدهای مختلف عصاره را در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد. باند جذبی در محدوده $3500-3250\text{cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی گروه‌های O-H و $\text{CH}_2\text{-OH}$ است که با ناحیه جذبی گروه $\text{NH}_2(3500-3400)$ و $\text{NH}(3300-3275)$ ژلاتین همپوشانی دارد. باند جذبی در ناحیه $2960-2870\text{cm}^{-1}$ به گروه‌های C-H متقارن و نامتقارن نسبت داده شده است [۳۹]. باند جذبی 1645cm^{-1} مربوط به کشش پیوند C=C حلقه آروماتیک می‌باشد که نشان دهنده گروه‌های عاملی ترکیبات فنولی موجود در عصاره الکی بره موم می‌باشد و با افزایش غلظت عصاره شدت پیک افزایش می‌یابد. باند 2930cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی پیوند C-H در گروه‌های -CH_2 بوده و با افزایش درصد عصاره شدت آن افزایش می‌یابد. کشش پیوندهای C=C، C=C-C=C- (در حلقه آروماتیک)، C-C (در حلقه آروماتیک)،



شکل (۲) طیف نگاره های FT-IR فیلم مرکب نشاسته - ژلاتین-PVA (Control) و نمونه های حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم (EPE)

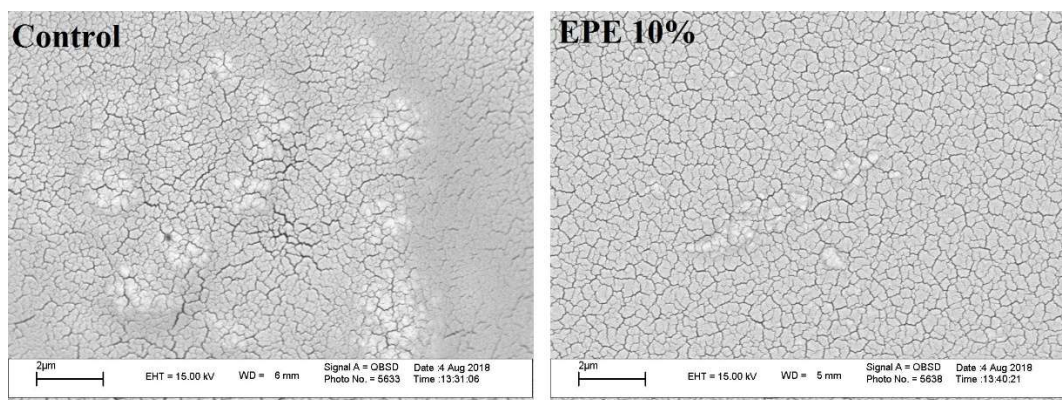
Fig. 2. Spectrograms of composite sample of Starch-Gelatin-PVA (Control) and Samples containing various percentages of propolis extract (EPE)

۳.۳. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل (۳) تصاویر SEM از سطح فیلم شاهد و فیلم حاوی ۱۰٪ عصاره را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصاویر مشخص است، فیلم کامپوزیت نشاسته-ژلاتین-PVA (نمونه شاهد) از نظر ریزساختاری، شبکه یکنواختی تشکیل نداد و ناهم‌واری‌های ایجاد شده در سطح فیلم ناشی از توده شدن احتمالی یک جزء در ماتریس فیلم می‌باشد که احتمالاً بیوپلیمر نشاسته است که باعث زبری سطح نمونه شده ولی در فیلم حاوی عصاره این عیب مشاهده نشد و فیلم دارای یک شبکه یکنواخت بود که احتمالاً به دلیل وجود خاصیت امولسیفایری عصاره می‌باشد. در زمان خشک شدن فیلم، ترک‌هایی در سطح فیلم ناشی از تبخیر مولکول‌های آب ایجاد می‌شود. در فیلم شاهد، ترک‌هایی با عمق و عرض بیشتر نسبت به نمونه حاوی عصاره مشاهده شد که نشان دهنده تاثیر مثبت افزودن عصاره به فیلم بر کاهش عمق و عرض ترک‌ها می‌باشد و در نتیجه آن، کاهش عمق و عرض ترک‌ها می‌تواند به کاهش نفوذپذیری بخار آب کمک کند. به‌طور کلی نتایج میکروسکوپی SEM نشان داد که افزودن عصاره امتزاج‌پذیری سه بیوپلیمر را افزایش داده و به اختلاط یکنواخت آن‌ها کمک می‌کند. یکی از دلایل این امر، اتصال ترکیبات عصاره به زنجیره‌های نشاسته و جلوگیری از رتروگراداسیون آن در حین سردسازی و خشک کردن فیلم می‌باشد. از طرف دیگر، حضور اتانول در عصاره الکلی بره موم نیز دلیل دیگری برای بهبود اختلاط بیوپلیمرها محسوب می‌شود که بایستی در نظر گرفته شده و بررسی‌های بیشتری در این زمینه صورت گیرد.

۴.۳. خواص مکانیکی

جدول (۱)، میزان استحکام کششی (TS)، درصد ازدیاد طول در نقطه پارگی (%E) و مدول یانگ (YM)، فیلم‌های مرکب در اثر افزودن درصد‌های مختلف عصاره در مقایسه با نمونه شاهد را نشان می‌دهد. مدول یانگ بیانگر سختی و استحکام فیلم می‌باشد و هر چه این پارامتر بالاتر باشد فیلم‌هایی سخت و با استحکام بالاتر و انعطاف پذیری کمتر حاصل می‌شود. همان‌طور که از نتایج مشخص است افزودن عصاره باعث کاهش معنی‌داری در مدول یانگ و استحکام کششی نمونه‌ها شده است. کاهش مدول یانگ در اثر افزودن عصاره را می‌توان به دلیل جلوگیری از ایجاد اتصالات بین رشته‌ای در شبکه پلیمرها در اثر قرار گرفتن مولکول‌های عصاره در بین زنجیره‌های پلیمر دانست که در نتیجه سبب کاهش استحکام کششی نمونه‌های فیلم فعال در مقایسه با نمونه شاهد شده است [۲۸،۴۳] علاوه بر آن، وجود موم یا واکس و روغن‌های ضروری موجود در این عصاره به دلیل داشتن خاصیت پلاستیسایزری، احتمالاً باعث افزایش تحرک زنجیره‌های پلیمرها شده و در نتیجه باعث کاهش استحکام نمونه‌های عصاره دار در مقایسه با نمونه شاهد شده است. در ضمن، وجود این خاصیت می‌تواند توجه کننده افزایش پارامتر ازدیاد طول در اثر افزودن عصاره الکلی بره موم در مقایسه با نمونه شاهد باشد که این نتایج با مطالعات پاستور و همکاران [۲۸] و آرچو و همکاران [۲۹] در اثر افزودن عصاره بره موم به ماتریس فیلم و پوشش خوراکی مطابقت دارد. استحکام کششی نیز مانند مدول یانگ، با افزایش میزان عصاره بره موم به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است.



شکل (۳) ریزنگاره‌های SEM فیلم‌های مرکب: شاهد و نمونه حاوی ۱۰٪ عصاره بره موم

Fig. 3. SEM microscopes of composite films: The control and sample containing 10% ethanolic extract of propolis

جدول (۱) مقادیر استحکام کششی (TS)، مدول یانگ (YM) و درصد ازدیاد طول (%E) نمونه های فیلم مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم. **Table 1** shows the tensile strength (TS), young modulus (YM) and elongation to break (%E) of composite films containing different percentages of propolis extract.

ازدیاد طول Elongation to break (%E)	مدول یانگ (MPa) Young Modulus	استحکام کششی (MPa) Tensile strength	عصاره بره موم (%) Ethanolic extract of propolis (%)
1/44 ^a ±61/37	0/88 ^d ±24/69	0/19 ^d ±15/13	شاهد (صفر) Control (0)
2/39 ^b ±65/10	0/83 ^b ±15/83	0/20 ^a ±10/26	5 %
3/02 ^c ±69/37	0/89 ^c ±17/83	0/13 ^c ±12/32	10 %
1/03 ^d ±95/89	0/11 ^a ±11/76	0/15 ^b ±11/28	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.05$ می باشد.

۴.۲. نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP)

جدول (۲) مقادیر نفوذپذیری به بخار آب در فیلم های شاهد و درصدهای مختلف عصاره الکی بره موم نشان را می دهد. مقدار WVP برای فیلم مرکب نشاسته-ژلاتین-PVA برابر $23/73 \times 10^{-4} \text{g/mh.Pa}$ بود. کاهش محسوسی در ویژگی ممانعت در برابر نفوذ بخار آب در فیلم های حاوی عصاره مشاهده شد ($p < 0.05$). به صورتی که در تمام نمونه های حاوی عصاره نسبت به فیلم شاهد، WVP کاهش یافت. همان طور که در بررسی خواص ظاهری و تصاویر میکروسکوپ SEM مشاهده شد، فیلم های حاوی عصاره نسبت به نمونه شاهد یکنواخت تر بوده و سطح صاف تری داشتند و همچنین از ترک هایی با تعداد و عمق کمتر از نمونه شاهد برخوردار بودند که احتمال می رود پیوندهای هیدروژنی بین گروه های عاملی پلیمرها و گروه های هیدروکسیل عصاره و گلیسرول ایجاد شده، سبب کاهش خاصیت هیدروفیلی سطح فیلم ها و در نتیجه آن، کاهش WVP نمونه های عصاره دار نسبت به نمونه شاهد شده است. از طرف دیگر، حضور اتانول در ترکیب عصاره نیز ممکن است به تغییر در نوع و شدت اتصالات بین رشته ای منجر شود و بر ویژگی های بازدارندگی تأثیرگذار باشد. همچنین به دلیل ماهیت غیر قطبی و هیدروفوبی عصاره، افزودن آن به ماتریس فیلم می تواند سبب کاهش WVP گردد. شکرایی و همکاران گزارش کردند که غنی سازی فیلم های مرکب نشاسته-CMC با عصاره بره موم ایرانی توانایی کاهش WVP را دارد [۴۴]. همچنین ویچایاکیتی و سیریتراروان نتایجی مشابه با نتایج این تحقیق در افزودن عصاره الکی بره موم به فیلم های کیتوزانی به دست آوردند [۴۲].

۵.۳. جذب رطوبت

نتایج درصد جذب رطوبت نمونه های شاهد و حاوی درصدهای مختلف عصاره در جدول (۲) نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده، جذب رطوبت فیلم ها با افزودن عصاره کاهش یافت اما بین غلظت های مختلف عصاره تفاوت معنی داری مشاهده نشد و فقط از نظر عددی کمترین مقدار متعلق به نمونه حاوی ۱۰٪ عصاره بود. دلیل این پدیده احتمالاً مربوط به تشکیل پیوند هیدروژنی بین مولکول های بیوپلیمرها با گروه های عاملی ترکیبات عصاره است که این ساختار جدید با اتصالات بیشتر، جذب مولکول های آب را کاهش داده است. نتایج FT-IR ایجاد برهمکنش های جدید بین ترکیبات عصاره با بیوپلیمرها را به اثبات رساند.

۶.۳. اندازه گیری خواص رنگی و کدورت

در جداول ۳ و ۴ میانگین پارامترهای رنگ سنجی برای فیلم های مرکب بر پایه نشاسته-ژلاتین-PVA و پس از افزودن عصاره الکی بره موم به عنوان ترکیب فعال نشان داده شده است. به طور کلی نتایج نشان داد که نمونه شاهد دارای بالاترین میزان مولفه روشنایی ظاهری (L^*) و اندیس سفیدی (WI) به ترتیب برابر ۸۹/۰۵ و ۸۸/۰۵ می باشد. ولی با افزودن عصاره الکی بره موم، روشنایی و اندیس سفیدی نمونه ها کاهش یافت و نتایج نشان داد که بین افزایش عصاره و روشنایی و اندیس سفیدی رابطه عکس وجود دارد. کمترین میزان این مولفه ها مربوط به نمونه حاوی ۲۰٪ عصاره به دست آمد (به ترتیب برابر ۸۶/۸۵ و ۶۷/۲۳) که به دلیل رنگ عصاره افزوده شده می باشد. افزودن عصاره سبب

جدول (۲) مقادیر نفوذپذیری نسبت به بخار آب و جذب رطوبت فیلم‌های مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم.

Table 2 Permeability values relative to water vapor permeability and water uptake of composite films containing various percentages of propolis extract.

جذب رطوبت (%) Water uptake	نفوذپذیری به بخار آب Water vapor permeability ($\times 10^{-4} \text{g m}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$)	درصد عصاره اتانولی بره موم (%) Ethanolic extract of propolis (%)
7/07 \pm 0/41 ^b	23/72 \pm 0/77 ^d	شاهد (صفر) Sample (0)
5/27 \pm 0/16 ^a	11/25 \pm 0/59 ^b	5 %
5/19 \pm 0/39 ^a	9/22 \pm 0/65 ^a	10 %
5/46 \pm 0/51 ^a	14/47 \pm 0/19 ^c	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

جدول (۳) پارامترهای رنگی فیلم‌های مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم.

Table 3 color parameters of composite films containing various percentages of propolis extract.

b*	a*	L*	عصاره اتانولی بره موم (%) Ethanolic extract of propolis (%)
2/43 \pm 0/04 ^a	-4/11 \pm 0/02 ^a	89/05 \pm 0/01 ^a	شاهد (صفر) Control (0)
13/13 \pm 0/31 ^b	-8/05 \pm 0/07 ^b	88/71 \pm 0/16 ^b	5 %
19/18 \pm 0/57 ^c	-9/05 \pm 0/12 ^c	88/12 \pm 0/35 ^{bc}	10 %
27/74 \pm 0/84 ^d	-11/05 \pm 0/13 ^d	86/85 \pm 0/60 ^c	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

جدول (۴) اختلاف رنگ کلی (ΔE)، اندیس زردی (YI)، اندیس سفیدی (WI) و کدورت فیلم‌های مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم.

Table 4 Total color difference (ΔE), yellow index (YI), white index (WI) and opacity of composite films containing different percentages of propolis extract.

کدورت Opacity	اندیس سفیدی White Index	اندیس زردی Yellow Index	اختلاف رنگ کلی Total color difference	عصاره اتانولی بره موم (%) Ethanolic extract of propolis (%)
2/04 \pm 0/21 ^c	88/05 \pm 0/01 ^a	3/89 \pm 0/07 ^a	9/65 \pm 0/02 ^a	شاهد (صفر) Control (0)
0/93 \pm 0/13 ^a	80/91 \pm 0/32 ^b	21/15 \pm 0/53 ^b	10/94 \pm 0/29 ^b	5 %
0/96 \pm 0/27 ^a	75/39 \pm 0/58 ^c	31/10 \pm 0/98 ^c	15/90 \pm 0/57 ^c	10 %
1/79 \pm 0/39 ^b	67/23 \pm 0/87 ^d	45/63 \pm 1/54 ^d	23/98 \pm 0/88 ^d	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

عصاره بود. نتایج اختلاف رنگ فیلم‌ها (ΔE) نسبت به صفحه استاندارد نیز نشان داد که کمترین اختلاف مربوط به نمونه شاهد بود و با افزودن عصاره و افزایش درصدهای آن بر میزان اختلاف رنگ فیلم‌ها افزوده شد که به معنی تیره‌تر شدن رنگ آن‌ها می‌باشد. همان‌طور که در جدول (۴) مشاهده می‌شود افزودن عصاره

کاهش مولفه قرمزی (a^*) نسبت به نمونه کنترل شد در حالی که بر میزان شاخص زردی (b^*) فیلم‌ها افزوده شد که سبب افزایش اندیس زردی (YI) نمونه‌ها گردید به طوری که کمترین میزان شاخص a^* (۱۱/۰۵-) و بیشترین میزان مولفه های b^* و YI (به ترتیب برابر ۲۷/۷۴ و ۴۵/۶۳) مربوط به نمونه حاوی ۲۰٪

مربوط باشد که باکتری‌های گرم منفی به دلیل دیواره خارجی لیپوپولی‌ساکاریدی که اطراف دیواره پپتیدوگلیکانی باکتری را احاطه کرده است، مقاومت بیشتری در مقابل عوامل ضد باکتریایی دارند [۴۶]. سیرپیتراوان و همکاران [۴۸] و میرزووا و همکاران [۲۴] اثرات ضد میکروبی عصاره بره موم را به وجود فلاونوئیدهای آن (Rutin, Quercetin, Naringenin) نسبت دادند [۴۸ و ۲۴]. بودینی و همکاران تاثیر افزودن عصاره الکی بره موم بر روی خواص ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی بر پایه ژلاتین را علیه باکتری گرم مثبت *S. aureus* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که در غلظت‌های بالای افزودن این عصاره، قطر هاله عدم رشد به صورت معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است [۴]. همچنین جولیانو و همکاران نیز با افزودن عصاره بره موم به فیلم‌های سدیم آلزینات، آگار و مرکب سدیم آلزینات-کیتوزان گزارش کردند که افزودن عصاره باعث ایجاد هاله عدم رشد در برابر باکتری گرم مثبت *S. aureus* شده است [۲۳]. سیلیسی و همکاران نیز گزارش کردند که عصاره اتانولی بره موم اثرات ضد میکروبی قابل توجهی در برابر باکتری گرم مثبت *S. aureus* از خود نشان داد هر چند تاثیر ناچیزی بر باکتری گرم منفی *E. coli* داشت [۴۹].

۸.۳. تعیین محتوای فنول تام و ظرفیت آنتی اکسیدانی

جدول (۶)، میزان فنول کل و ظرفیت آنتی اکسیدانی تیمارهای حاوی درصدهای مختلف عصاره در مقایسه با نمونه شاهد را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است افزودن عصاره باعث افزایش معنی‌داری در میزان فنل کل نمونه‌ها می‌شود به طوری که کمترین میزان فنل کل برای نمونه شاهد بود و با افزایش درصد عصاره میزان فنل کل نمونه نیز به طور قابل توجهی

باعث کاهش کدورت فیلم شده و میزان عبور نور در ناحیه مرئی نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است که احتمالاً دلیل آن را می‌توان به جایگیری خوب ترکیبات عصاره در بین رشته‌های پلیمرها دانست که نتیجه آن بهبود شفافیت و کاهش کدورت فیلم‌های عصاره دار شده است [۴۵].

۷.۳. اندازه‌گیری خواص ضد میکروبی

نتایج فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه شاهد بر روی باکتری گرم مثبت *S. aureus* و باکتری گرم منفی *E. coli* در جدول (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود فیلم شاهد در مقابل هر دو نوع باکتری مورد مطالعه موثر نبود و هیچ هاله عدم رشدی در نمونه شاهد مشاهده نگردید. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول (۵)، افزودن عصاره به طور معنی‌داری باعث افزایش قطر هاله عدم رشد شده به طوری که بیشترین قطر هاله ایجاد شده در مورد نمونه حاوی بیشترین درصد عصاره (حاوی ۲۰٪ عصاره) می‌باشد.

به طور کلی عصاره الکی بره موم به دلیل دارا بودن خاصیت هیدروفوبی قادر به واکنش با ساختارهای لیپیدی مانند غشاء سلولی باکتری‌ها، میتوکندری و سایر ترکیبات درون سلولی هستند و در نتیجه منجر به تجزیه ساختار سلولی، تراوش ترکیبات درون سلولی به خارج آن، تغییر بار یونی سلول، جلوگیری از تنفس سلولی و دگرگونی در نفوذپذیری غشاء سلولی شده و در نهایت منجر به مرگ سلول باکتری می‌شوند [۴۶، ۴۷]. همان‌طور که مشاهده می‌شود قطر هاله ایجاد شده در باکتری *S. aureus* بیشتر از باکتری *E. coli* بوده و نشان دهنده مقاومت کمتر باکتری گرم مثبت در برابر عوامل ضد میکروبی نسبت به باکتری گرم منفی می‌باشد که این تفاوت می‌تواند به این واقعیت

جدول (۵) خاصیت ضد میکروبی فیلم‌های مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم بر روی دو باکتری مختلف.

Table 5 Antimicrobial properties of composite films containing different percentages of propolis extract on two different bacteria.

قطر هاله عدم رشد (mm) The diameter of inhibition zone		عصاره اتانولی بره موم (%) Ethanol extract of propolis (%)
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Control (0) شاهد (صفر)
0 ^a	0 ^a	
6/25 ±0/07 ^b	9/35 ±0/16 ^b	5 %
6/97 ±0/09 ^c	9/97 ±0/09 ^c	10 %
7/50 ±0/07 ^d	11/83 ±0/15 ^d	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ می‌باشد.

فنولی ناشی از عصاره در فیلم‌های حاوی غلظت‌های مختلف آن، با افزایش شدت پیک‌های و جابه‌جایی آن‌ها خود را نشان دادند. طبق نتایج آزمون مکانیکی، افزودن عصاره به علت قرارگیری ترکیبات آن در بین زنجیره‌های پلیمرها، باعث کاهش مدول الاستیسیته و استحکام کششی نمونه‌های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه شاهد گشت اما درصد ازدیاد طول را افزایش داد. به علت ماهیت آبگریزی عصاره و پیوندهای هیدروژنی گروه‌های عاملی آن با گروه‌های هیدروکسیل بیوپلیمرها، افزودن آن، نفوذپذیری به بخار آب نمونه‌های عصاره دار در مقایسه با نمونه شاهد را کاهش داد. اما تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر روی جذب رطوبت فیلم‌ها معنی دار نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن عصاره باعث ایجاد هاله عدم رشد در دو باکتری مورد آزمایش گردید اما تأثیر آن بر باکتری S.aureus در مقایسه با باکتری E.coli بیشتر بود. افزودن عصاره به دلیل وجود مقادیر بالای ترکیبات فنولی، باعث افزایش محتوای فنول کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه شاهد شد. علاوه بر این، افزودن عصاره باعث بهبود در شفافیت نمونه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد شد. همچنین به علت داشتن ماهیت رنگی، افزودن عصاره باعث افزایش پارامترهای ΔE و اندیس زردی شد در حالی که پارامتر روشنایی (L^*) را کاهش داد. به‌طور کلی و با در نظر گرفتن تغییرات همه ویژگی‌ها، نمونه دارای ۱۰ درصد عصاره بره موم به‌عنوان بهترین فیلم از نظر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی انتخاب شد. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند دریچه جدیدی به سوی استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب پذیر در صنعت غذا جهت بهبود کیفیت و ایمنی مواد غذایی و کاهش مخاطرات زیست محیطی حاصل از انباشت مواد بسته‌بندی سنتزی بگشاید.

افزایش یافت. با توجه به داده‌های موجود در جدول (۶)، قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد فیلم‌های حاوی عصاره اختلاف معنی داری با فیلم شاهد نشان داد که به دلیل ترکیبات فنولی فراوان موجود در عصاره می‌باشد. نتایج حاصله نشان داد که افزودن عصاره اتانولی بره موم قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد را در فیلم شاهد از ۰۱/۵۵ به محدوده ۵۵/۶۱-۳۱/۶۱٪ بسته به غلظت عصاره افزوده شده، افزایش می‌دهد که به‌عنوان مثال در نمونه فیلم حاوی ۲۰٪ عصاره قدرت مهارکنندگی در حدود ۳۶ برابر فیلم شاهد بود. نتایج نشان داد که از این عصاره می‌توان به‌عنوان یک ترکیب فعال در فرمولاسیون پوشش‌ها و فیلم‌های بسته‌بندی استفاده نمود. سیرپیتراوان و همکاران، گزارش دادند که ترکیبات اصلی عصاره بره موم تایلندی شامل Rutin، Naringenin و Quercetin می‌باشد [۴۸] و طبق گزارش‌های اوانس و همکاران این مواد، ترکیبات اصلی عصاره‌های بره موم در نقاط مختلف جهان بوده و علت وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بره موم به وجود این ترکیبات نسبت داده شده است [۵۰].

۴. نتیجه گیری

در این تحقیق امکان فیلم مرکب بر پایه نشاسته-ژلاتین-PVA حاوی غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره موم (۵، ۱۰ و ۲۰٪) مورد بررسی تهیه گردید و خواص ضد میکروبی-آنتی‌اکسیدانی، فیزیکی، ممانعتی و ریزساختاری آن مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بررسی ظاهری فیلم و تصاویر SEM نمونه‌های شاهد و حاوی ۱۰٪ عصاره مشاهده شد که در فیلم شاهد، به علت عدم سازگاری بین بیوپلیمرها، فیلمی یکنواخت تشکیل نمی‌شود، اما این نقیصه در نمونه‌های عصاره‌دار به علت خاصیت امولسیفایری احتمالی آن و همچنین حضور اتانول مشاهده نشد. ترکیبات

جدول (۶) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنول کل نمونه های فیلم مرکب حاوی درصدهای مختلف عصاره بره موم.

Table 6 Antioxidant strength and total phenolic content of composite films containing various percentages of propolis extract.

فنول کل Total phenol (mg GA/g film)	درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH Percentage of DPPH free radicals	عصاره اتانولی بره موم (%) Ethanol extract of propolis (%)
2/79 ±0/17 ^a	1/55 ±0/40 ^a	شاهد (صفر) Control (0)
44/20 ±0/34 ^b	31/61 ±0/44 ^b	5 %
75/06 ±1/67 ^c	45/28 ±0/32 ^c	10 %
116/37 ±1/67 ^d	55/61 ±0/17 ^d	20 %

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده معنی داری در سطح $p < 0/05$ می‌باشد.

109(4), 2452–2459.

[16] Gupta, B., Agarwal, R., Sarwar Alam, M.S. (2013). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol–polyethylene oxide–carboxymethyl cellulose blend membranes. *J. Appl. Polym. Sci.*, 127(2), 1301–1308.

[17] Silva, F.E.F., Batista, K.A., Di-Medeiros, M.C.B., Silva, C.N.S., Moreira, R.B., Fernandes, K.F. (2016). A stimuli-responsive and bioactive film based on blended polyvinyl alcohol and cashew gum polysaccharide. *Mat. Sci. Eng.*, 58, 927–934.

[18] Shen, Z., Ghasemlu, M., Kamdem, D.P. (2015). Development and compatibility assessment of new composite film based on sugar beet pulp and polyvinyl alcohol intended for packaging applications. *J. Appl. Polym. Sci.*, 132, 41354.

[19] Majdzadeh-Ardakani, K., Nazari, B. (2010). Improving the mechanical properties of thermoplastic starch/poly(vinyl alcohol)/clay nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, 70(10), 1557–1563.

[20] Paralikar, S.A., Simonsen, J., Lombardi, J. (2008). Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanocrystal barrier membranes. *J. Mem. Sci.*, 320(1-2), 248–258.

[21] Mascheroni, E., Guillard, V., Nalin, F., Mora, L., & Piergiovanni, L. (2010). Diffusivity of propolis compounds in Poly(lactic acid) polymer for the development of anti-microbial packaging films. *J. Food Eng.*, 98(3), 294–301.

[22] Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 347–363.

[23] Juliano, C., Pala, C.L., Cossu, M. (2007). Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *J. Drug Del. Sci. Technol.*, 17(3), 177–182.

[24] Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.*, 152, 239–246.

[25] Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacology*, 64(3), 235–240.

[26] Koo, H., Gomes, B.P., Rosalen, P.L., Ambrosano, G.M., Park, Y.K., & Cury, J.A. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.*, 45, 141–148.

[27] Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Prado, A. et al. (2009). Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quimica Nova*, 32, 1523–1527.

[28] Pastor, C., Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing

منابع

[1] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S. W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.*, 68(2), 408–420.

[2] Chen, T.B., Chai, L.T. (2010). Attitude towards the environment and green products: Consumers' perspective. *Manag. Sci. Eng.*, 4(2), 27–39.

[3] De Abreu, D.P., Losada, P.P., Maroto, J., Cruz, J.M. (2011). Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 12(1), 50–55.

[4] Bodini, R.B., Sobral, P.J.A., Favaro-Trindade, C.S., Carvalho, R.A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. *LWT-Food Sci. Technol.*, 51(1), 104–110.

[5] Bertoft, E. (2004). Analyzing starch structure. In A. C. Eliasson (Ed.), *Starch in Food. Structure, function and applications* (pp. 57–96). New York: CRC Press.

[6] Krochta, J.M., DeMulder-Johnson, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol.*, 51(2), 61–74.

[7] Ropert, H. (1996). Starch: present use and future utilization. In H. Van Bekkum, H. Ropert, F. Voragen, & A. G. Voragen (Eds.), *Carbohydrates as organic raw materials III* (pp. 17–35). Weinheim, Germany: Wiley VCH.

[8] Barreto, P.L.M., Pires, A.T.N., Soldi, V. (2003). Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Deg. Stab.*, 79(1), 147–152.

[9] Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int. Food Res. J.*, 15(3), 237–248.

[10] Boanini, E., Rubini, K., Panzavolta, S., Bigi, A. (2010). Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. *Acta Biomaterialia*, 6(2), 383–388.

[11] Baldwin, E.A., Hagenmaier, R., Bai, J. (Eds.). (2011). *Edible coatings and films to improve food quality*. CRC Press, UK, London, pp. 231–239.

[12] Pereda, M., Ponce, A.G., Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., & Martucci, J.F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocoll.*, 25(5), 1372–1381.

[13] Srinivasa, P., Ramesh, M., Kumar, K., Tharanathan, R. (2003). Properties and sorption studies of chitosan–polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydr. Polym.*, 53(4), 431–438.

[14] Kanatt, S.R., Rao, M., Chawla, S., Sharma, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocoll.*, 29(2), 290–297.

[15] Yang, S.Y., Huang, C.Y. (2008). Plasma treatment for enhancing mechanical and thermal properties of biodegradable PVA/starch blends. *J. Appl. Polym. Sci.*,

- structural properties of chitosan films. *Food Hydrocoll.*, 36, 287-293.
- [41] Shen, Z., & Kamdem, D. P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 289-296.
- [42] Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocoll.*, 61, 695-702.
- [43] Chang-Bravo, L., López-Córdoba, A., Martino, M. (2014). Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. *Reac. Func. Polym.*, 85, 11-19.
- [44] Shekarabi, A.S., Oromiehie, A.R., Vaziri, A., Ardjmand, M., Safekordi, A.A. (2014). Investigation of the effect of nanoclay on the properties of quince seed mucilage edible films. *Food Sci. Nut.*, 2(6), 821-827.
- [45] Pineros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A., Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocoll.*, 63, 488-495.
- [46] Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94(3), 223-253.
- [47] Devi, K.P., Nisha, S.A., Sakthivel, R., Pandian, S.K. (2010). Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *J. Ethnopharmacology*, 130(1), 107-115.
- [48] Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., Sanguandeeul, R. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48(1), 22-27.
- [49] Silici, S., Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- [50] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 20(7), 933-956.
- propolis as affected by moisture content. *Carbohydr. Polym.*, 82(4), 1174-1183.
- [29] de Araújo, G. K. P., de Souza, S. J., da Silva, M. V., Yamashita, F., Gonçalves, O. H., Leimann, F. V., & Shirai, M. A. (2015). Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 50(9), 2080-2087.
- [30] Basiak, E., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2017). Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. *Int. J. Biol. Macromol.*, 98, 348-356.
- [31] Jouki, M., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Koocheki, A. (2014). Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocoll.*, 36, 9-19.
- [32] ASTM (1995a). Standard test method for tensile properties of thin plasticsheeting. Annual books of ASTM Standards. Designation 882-95, Philadelphia: ASTM, pp.182-188.
- [33] ASTM(1995b). Standard test method for water vapor transmission of materials. Annual books of ASTM Standards. Designation E96-95, Philadelphia: ASTM, pp. 785-792.
- [34] Angle, M. N., & Dufresne, A. (2000). Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposites. *Macromolecules*, 33(22), 8344-8353.
- [35] Siripatrawan, U., Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.*, 24(8), 770-775.
- [36] Bazargani-Gilani, B., Aliakbarlu, J., Tajik, H. (2015). Effect of pomegranate juice dipping and chitosan coating enriched with *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 29, 280-287.
- [37] Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., German, J.B., Ghanati, K., Khaksar, R. (2015). Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil. *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, 606-613.
- [38] López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz, S., Silva-Beltrán, N.P., Ornelas-Paz, J.D.J., Zamudio-Flores, P.B., Burruel-Ibarra, S.E. (2013). Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. *Molecules*, 18(11), 13735-13753.
- [39] Choo, K., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Julai, S., Liou, N.S. (2016). Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. *Materials*, 9(8), 644.
- [40] Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and

*Research Article***Investigation of the Effect of Propolis Ethanolic Extract on the Physicochemical, Microstructural, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Starch-Gelatin-Polyvinyl Alcohol Blend Film****Mohammad javad Abedi¹, Mohsen Esmaili^{2*}, Hadi Almasi³**

1. MSc Student, Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Professor, Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Associate Professor, Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

In this study, biodegradable blend based on wheat starch, gelatin and polyvinyl alcohol was prepared and ethanolic extract of propolis (5, 10 and 20 %) (EPE) as antimicrobial and antioxidant agent was incorporated. The films were prepared by solvent casting method and their microstructural, mechanical, barrier, color, antioxidant and antimicrobial properties were investigated. In the control sample, homogenous structure was not formed due to the incompatibility of the biopolymers with each other, while the addition of EPE caused to formation of uniform structure and cracks were decreased according to SEM observations. FT-IR test approved the formation of new interactions between biopolymers and components of EPE. Addition of EPE caused to decrease the tensile strength, water vapor permeability and opacity. But the elongation to break and yellowness index increased. Total phenol content and antioxidant capacity of the films increased with increasing concentrations of EPE. Different concentrations of EPE significantly affected all properties of the film, exception water absorption. The films containing EPE had more antimicrobial effects on *Saureus* compared to *E.coli* bacteria. Generally, the film containing EPE 10% demonstrated the best physicochemical and functional characteristics. Results of this research revealed that the blend film activated with propolis extract is a good candidate for antioxidant and antimicrobial packaging and increasing the shelf life of foods.

Keywords: Blend film, Propolis, Physical properties, Microstructure, Antimicrobial property.

* Corresponding author: m.esmaili@urmia.ac.ir