

بررسی عملکرد ضد میکروبی و فیزیکی فیلم خوراکی بر پایه ایزوله‌ی پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن به روش سطح پاسخ

سید محمد مشکانی^۱، سید علی مرتضوی^۲، زهرا پورفلاح^۳

۱- نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران، پست الکترونیکی: s.m.meshkani@gmail.com

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲۲

چکیده

سابقه و هدف: سال‌هاست که استفاده از پلیمرهای طبیعی به خصوص پروتئین و اسانس‌های گیاهی در تهیه‌ی فیلم‌های خوراکی مورد توجه بوده است. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تولید فیلم خوراکی بر پایه ایزوله‌ی پروتئین نخود و تعیین اثر غلظت پروتئین نخود، گلیسرول و اسانس آویشن بر ویژگی‌های ضد میکروبی، نفوذپذیری نسبت به بخار آب و حلالیت فیلم خوراکی بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا از پودر نخود، وارپته‌ی فیلیپ به روش ترسیب نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین استخراج و سپس در محدوده‌ی ۴ تا ۱۰ گرم پروتئین، گلیسرول به عنوان نرم‌کننده در غلظت‌هایی بین ۴۰ تا ۶۰ درصد و اسانس آویشن در غلظت‌هایی بین صفر تا ۱ درصد، فیلم خوراکی تهیه شد. آزمون ضد میکروبی فیلم خوراکی حاصل روی دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*، نفوذپذیری نسبت به بخار آب و حلالیت روی فیلم با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شد.

یافته‌ها: اسانس آویشن اثر معنی‌داری بر کاهش رشد این دو میکروارگانیسم و کاهش میزان حلالیت و نفوذپذیری نسبت به بخار آب داشت ($p < 0/01$). با افزایش غلظت پروتئین، نفوذپذیری به طور معنی‌داری افزایش و حلالیت کاهش یافت. افزایش گلیسرول نیز باعث افزایش نفوذپذیری و حلالیت شد ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری: در این تحقیق مشخص شد که پروتئین نخود قابلیت تشکیل فیلم را دارد. هم‌چنین، بهینه‌سازی فرمولاسیون نهایی نشان داد که برای داشتن حداکثر عملکرد ضد میکروبی فیلم خوراکی، حداقل نفوذ بخار آب و حداکثر حلالیت باید از ۴ گرم پروتئین نخود، ۴/۴۴٪ گلیسرول و ۱٪ اسانس استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اسانس آویشن، پروتئین نخود، فیلم ضد میکروبی، ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی

• مقدمه

حضور ترکیبات ضد میکروبی در مواد غذایی می‌تواند عمر نگهداری مواد غذایی را افزایش دهد. استفاده از اسانس‌های طبیعی به جای مواد ضد میکروبی شیمیایی نگرانی‌های ناشی از مصرف این گونه مواد را کاهش می‌دهد (۳). اسانس‌های طبیعی گیاهی از گذشته‌های دور به عنوان مواد طعم‌دهنده به کار رفته‌اند و هم‌اکنون ثابت شده است که این مواد دارای طیف وسیعی از فعالیت ضد میکروبی هستند (۴). البته، لازم به ذکر است که ترکیب، ساختار و گروه‌های عاملی اسانس‌ها نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن‌ها دارند (۳).

معمولاً ترکیبات ترپنی حاوی گروه‌های فنلی مانند انواع اسانس‌ها از جمله آویشن بر مهار میکروارگانیسم‌های

مطابق بررسی‌ها و آمارگیری‌های صورت گرفته طی سال‌های اخیر توسط سازمان جهانی بهداشت بیان شده که حدود ۳۰٪ مردم در کشورهای صنعتی حداقل از یک نوع مسمومیت غذایی در سال رنج می‌برند. بنابراین نیاز به استفاده از روش‌های جدید به برای کاهش یا از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا و مسموم‌کننده‌ی غذا احساس می‌شود به خصوص روش‌های ترکیبی که شامل استفاده هم‌زمان از چند عامل نگهدارنده به صورت توأم است و در اکثر موارد با موفقیت در کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و حفظ کیفیت غذاها همراه است (۱، ۲).

کشت‌ها و همه‌ی مواد شیمیایی مصرفی از شرکت Merck خریداری شدند.

تجهیزات: اتوکلاو (Amerex, HV-110, آمریکا)، انکوباتور (VELP FOC 225i, Usmate Velate, ایتالیا)، سانتریفوژ (Osterode am Harz, Sigma, آلمان)، همزن مغناطیسی گرم‌کن‌دار (Schwabach, Heidolph, آلمان)، pH متر (Staffordshir, Jenway, انگلستان)، خشک‌کن انجمادی (Osterode am Harz, Martin Christ, آلمان)، رطوبت‌سنج عقربه‌ای (آلمان)، دسیکاتور، ویال شیشه‌ای، ترازوی ۰/۰۰۱ (آلمان، Balingen, KERN)، میکرومتر دیجیتالی IP54 با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر (Daxin, QLR, چین)، کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر (Osaka, NSK, ژاپن).

روش تهیه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود: به جهت تهیه ایزوله‌ی پروتئین از آرد نخود با مش ۶۰ و چربی‌گیری شده با هگزان نرمال استفاده شد. به این منظور آرد به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط و به کمک محلول سود یک نرمال در $pH=9/5$ تنظیم شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه توسط همزن مخلوط شد و مخلوط حاصل توسط سانتریفوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول شفاف رویی جدا شد و pH آن با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به $pH=4/5$ که نقطه‌ی ایزوالکتریک پروتئین نخود است، رسانده شد. سوسپانسیون حاصل دوباره برای جداسازی به سانتریفوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه منتقل شد. محلول رویی جدا و دور ریخته شد. در ادامه رسوبات پروتئینی حاصل با استفاده از آب مقطر شسته شد تا pH آن به محدوده‌ی خنثی برسد. ایزوله‌ی مرطوب نخود به وسیله‌ی خشک‌کن انجمادی به صورت پودری خشک و متخلخل درآمد و در ظروف در دار در فریزر با دمای $18^{\circ}C$ - نگهداری شد (۱۱).

تهیه فیلم خوراکی از ایزوله‌ی پروتئین نخود: جهت تهیه فیلم خوراکی ۴ تا ۱۰ گرم پروتئین نخود در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. گلیسرول در محدوده‌ی ۴۰ تا ۶۰ درصد به محلول فیلم پروتئینی افزوده شد. مخلوط حاصل توسط همزن مغناطیسی با دور بالا به مدت ۵ دقیقه هم زده شد و در طی فرایند هم زدن pH محلول با سود ۰/۱ نرمال به محدوده‌ی ۹/۵ رسانده شد. محلول فیلم خوراکی به حمام آب داغ $85^{\circ}C$ منتقل و توسط همزن مغناطیسی به طور مداوم هم زده شد. پس از این عملیات به محلول استراحت داده شد تا دمای آن کاهش یابد. سپس اسانس آویشن به میزان صفر تا ۱ درصد به آن افزوده و هم زده شد. سپس

بیماری‌زا مؤثرتر هستند (۵). در این میان، اسانس‌های میخک (Clove)، آویشن (Thyme)، رزماری (Rosemary)، پونه‌ی کوهی (Oregano)، مریم گلی (Sage) و مرزه (Summer savoury) از مؤثرترین ترکیبات علیه میکروارگانیسم‌ها هستند (۶). گیاهان تیره‌ی نعنای دهه‌های گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده اند و به طور معمول برای درمان عفونت‌های گوارش یا دل درد تجویز شده‌اند (۷).

در سال‌های اخیر، تحقیقات فراوانی برای ارزیابی آثار ضد میکروبی انواع عصاره‌ها و ادویه‌ها صورت گرفته است. به تازگی، تحقیقاتی روی اسانس‌های گیاهی صورت گرفته که قدرت و توانایی این ترکیبات را در جلوگیری از رشد دامنه‌ی وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد ماده غذایی نشان می‌دهد. از آن جا که این ترکیبات کاملاً طبیعی هستند، زیان آن‌ها برای سلامت انسان و محیط زیست بسیار کمتر از مواد نگهدارنده‌ی شیمیایی می‌باشد (۸).

برخی ویژگی‌های فیلم‌های خوراکی جلوگیری از نفوذ رطوبت، محدود کردن انتقال گاز (مثل اکسیژن و دی‌اکسیدکربن)، جلوگیری از مهاجرت روغن‌ها و استفاده از ترکیبات معطر فرار در فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی روی مواد غذایی است (۹). یکی دیگر از خواص فیلم‌های خوراکی قابلیت افزودن ترکیبات ضد میکروبی به آن می‌باشد چرا که رشد میکروبی روی سطح مواد غذایی عامل اصلی ایجاد فساد در آن‌ها بوده که می‌توان با استفاده از فیلم‌های خوراکی حاوی مواد ضد میکروبی آن را کنترل نمود (۱۰).

هدف از انجام این تحقیق، تولید فیلم خوراکی بر پایه ایزوله‌ی پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن بود. ویژگی‌های فیزیکی فیلم خوراکی اعم از نفوذپذیری نسبت به بخار آب و حلالیت و ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی فیلم حاوی اسانس روی دو باکتری بیماری‌زا (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی) با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی به صورت Face Centered پرداخته شد.

• مواد و روش‌ها

مواد: نخود واریته فیلیپ با میزان پروتئین حدود ۲۴٪ جهت تهیه‌ی ایزوله‌ی پروتئین از شرکت خدمات حمایتی و کشاورزی و اسانس آویشن از شرکت تک عصاره شرق مشهد تهیه شد. سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431) و اشرشیاکلی (PTCC 1330) به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران خریداری شد. محیط

محلول با کدورت محلول استاندارد مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق شد (۱۰).

آزمون ضد میکروبی فیلم خوراکی: به منظور بررسی اثر ضد میکروبی فیلم ایزوله‌ی پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن بر دو سویه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* از روش کشت سطحی استفاده شد. کشت سطحی به کمک سوآپ استریل به صورت عمود بر هم انجام شد. به این ترتیب که از سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند به سطح محیط کشت Brain Heart Infusion Agar در کنار شعله منتقل شد. سپس از فیلم‌های تولیدی با فرمولاسیون‌های متفاوت به کمک قالب دیسک‌هایی با قطر ۱۰ میلی‌متر تهیه شد و به وسیله‌ی پنس استریل روی محیط کشت در سه تکرار قرار داده شد. محیط کشت‌های همراه دیسک‌ها به صورت وارونه به انکوباتور با دمای ۳۷°C منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها را از گرمخانه خارج کرده و قطر هاله‌ی ایجاد شده توسط کولیس ۰/۰۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۱۰).

اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب (Water Vapor Permeability): اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب بر اساس استاندارد ASTM E96 توسط دسیکاتور حاوی محلول فوق اشباع نیترات منیزیم انجام شد (۱۶). روش آزمون به این ترتیب بود که ویال‌های شیشه‌ای کوچکی انتخاب شد و درون هر ویال مقدار ۳ گرم کلرید کلسیم بدون آب ریخته شد. دهانه‌ی ویال‌های شیشه‌ای توسط فیلم و به کمک گیره مسدود شد. به علت جاذب‌الرطوبه بودن کلرید کلسیم بدون آب، رطوبت نسبی فضای خالی داخل ویال‌های شیشه‌ای و زیر فیلم به صفر رسید. پس از توزین اولیه‌ی همه‌ی نمونه‌ها به طور همزمان به دسیکاتور حاوی نمک نیترات منیزیم فوق اشباع منتقل شد که در دمای آزمایشگاه رطوبتی معادل ۵۵٪ ایجاد می‌کند. جهت اطمینان و کنترل رطوبت نسبی محیط از یک دستگاه رطوبت‌سنج استفاده شد. تغییرات وزن ظروف شیشه‌ای طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال بادقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. نمودار تغییرات وزن بر حسب زمان رسم شد و شیب خط حاصل جهت محاسبات مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه آهنگ انتقال بخار آب از طریق فرمول ۱ محاسبه شد و سپس میزان تراوایی نسبت به بخار آب از طریق فرمول ۲ به دست آمد.

حدود ۱۵ میلی‌لیتر از محلول فیلم به پلیت‌های آلومینیومی با قطر ۱۰ سانتی‌متر منتقل شد. فیلم‌ها در دمای آزمایشگاه بارطوبت نسبی ۳۰ تا ۳۵ درصد به مدت زمان ۴۸ ساعت خشک شدند و جهت آزمون ویژگی‌های ضد میکروبی از کف پلیت‌ها به آهستگی جداسازی شدند (۱۳-۱۰).

اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها: ضخامت فیلم‌های تولید شده با استفاده از یک میکرومتر دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌های تولید شده برای آزمایش نفوذپذیری در برابر بخار آب روی فیلم تولیدی در ۱۰ نقطه‌ی مختلف انجام شد و از مجموع، میانگین گرفته شد.

بررسی اثر ضد میکروبی فیلم ایزوله‌ی پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن

تهیه محلول استاندارد مک فارلند: استاندارد مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک ۱٪ و کلرید باریم ۱/۱۷۵ درصد برای به دست آوردن یک محلول سولفات باریم با دانسیته نوری خاص تهیه شد. کدورت محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر بررسی شد. جذبی در حدود ۰/۱۳۰ تا ۰/۱۴۰ مشاهده شد که معادل جمعیت میکروبی حدود cfu/ml $10^8 \times 1/5$ است (۱۴).

فعال سازی سویه‌ها: جهت فعال سازی سویه‌ها به کشت ۲۴ ساعته از هر باکتری نیاز بود. بنابراین به سرنگ‌های حاوی سویه‌های خالص سازی شده‌ی لیوفلیزه با کمک سمپلر در کنار شعله مقداری از محیط کشت Brain Heart Infusion Broth تزریق شد و دوباره از سرنگ به لوله‌های حاوی محیط کشت مایع منتقل شد. لوله‌ها برای فعال سازی سویه‌ها ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷°C نگهداری شد (۱۵).

تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی: برای تهیه‌ی سوسپانسیون میکروبی کشت ۲۴ ساعته از هر باکتری مورد نیاز است. بنابراین ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار Nutrient Agar تلقیح صورت گرفت. پس از ۲۴ ساعت، کشت مربوط توسط محلول رینگر شسته شد و سوسپانسیون غلیظ میکروبی تهیه شد. مقداری از سوسپانسیون میکروبی در لوله‌ی آزمایش حاوی محلول رینگر استریل ریخته شد و کدورت آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد؛ و تا هنگام برابر شدن کدورت

فرمول (۱)

$$WVT = \frac{G}{T.A}$$

در این فرمول WVT آهنگ انتقال بخار آب (g/m².s)، A سطح مقطع ویال‌های شیشه‌ای (m²) و G/t شیب خط میانگین تغییرات وزن در مدت زمان آزمون (g/s) است.

فرمول (۲)

$$WVP = \frac{WVT}{P(R1-R2)} . X$$

در این فرمول WVP میزان نفوذپذیری نسبت به بخار آب (g/m.Pa.s)، P فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵°C (Pa)، X ضخامت فیلم (m)، R₁ میزان رطوبت داخل دسیکاتور (۰.۵۵) و R₂ میزان رطوبت فضای داخل ویال (۰) است.

اندازه‌گیری حلالیت فیلم در آب: میزان حلالیت فیلم‌های خوراکی در آب طبق روش Dehghan Shoaar و همکاران اندازه‌گیری شد. نمونه‌های فیلم به صورت نوارهایی به ابعاد ۱×۲ سانتی‌متر برش داده شد، به مدت ۳ روز در دسیکاتور حاوی کلرید کلسیم بدون آب خشک و سپس توزین شد (W₁). ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌های خشک و توزین شده‌ی درون لوله‌های آزمایش افزوده شد و مقدار ۰/۰۲ درصد سدیم آزید جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها به محتویات لوله افزوده و سر لوله‌ها بسته شد. این لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. در طول این مدت چندین بار به طور ملایم هم زده شد. سرعت و زمان هم زدن برای همه‌ی لوله‌ها یکسان بود. پس از این مدت، نمونه‌ی فیلم‌های تحت آزمون از محتویات داخل لوله جدا و به پلیت‌های خشک توزین شده منتقل شد. پلیت‌ها در آون خلأ با دمای ۷۰°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و پس از سرد کردن در دسیکاتور توزین شد (W₂). آزمون در چهار تکرار انجام شد و میانگین آن‌ها گزارش شد. میزان حلالیت فیلم‌های خوراکی با استفاده از فرمول ۳ محاسبه شد (۱۷).

فرمول (۳)

$$SM = [(W_1 - W_2) / W_1] . 100$$

تجزیه و تحلیل آماری: هدف اصلی این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای غلظت ایزوله‌ی پروتئین

نخود، درصد گلیسرول و درصد اسانس آویشن بر ویژگی‌های ضد میکروبی و فیزیکی فیلم خوراکی بود. به این منظور از طرح آماری سطح پاسخ با پنج نقطه‌ی مرکزی به صورت face centered استفاده شد. در این طرح با توجه به جدول ۱ غلظت ایزوله‌ی پروتئین نخود با نماد X₁، گلیسرول با نماد X₂ و اسانس آویشن با نماد X₃؛ به عنوان سه فاکتور مؤثر و میزان هاله‌ی مهاری تشکیل شده در اطراف فیلم خوراکی روی محیط کشت، نفوذپذیری نسبت به بخار آب و حلالیت فیلم خوراکی متغیرهای وابسته بودند. در روش سطح پاسخ (RSM) برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را روی هر متغیر جداگانه بیان می‌کند. که در فرمول ۴، قابل مشاهده می‌باشد.

فرمول (۴)

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j$$

در این فرمول، Y پاسخ پیش‌بینی شده، b₀ ضریب ثابت، b_i اثرات خطی، b_{ii} اثر مربعات و b_{ij} اثرات متقابل، X_i، X_j متغیرهای مستقل کدبندی شده هستند.

جدول ۱. نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آن‌ها

متغیرهای مستقل	نماد ریاضی	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
ایزوله‌ی پروتئین نخود (g)	X ₁	۴	۷	۱۰
گلیسرول (%)	X ₂	۴۰	۵۰	۶۰
اسانس آویشن (%)	X ₃	۰	۰/۵	۱

برای تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزار Design Expert 6.0.2 استفاده شد (۱۸).

• یافته‌ها

نتایج تشکیل فیلم: فیلم‌ها به راحتی از ظروف آلومینیومی جدا شدند. فیلم‌ها شفاف، انعطاف‌پذیر و از استحکام قابل قبولی برخوردار بودند. ضخامت فیلم‌ها در محدوده‌ی آزمایش کمتر از ۲۵۰ میکرومتر بود. نتایج ضخامت فیلم‌ها در محاسبات نفوذپذیری نسبت به بخار آب مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج آنالیز آماری: پس از انجام آزمون‌های مختلف فیزیکی و میکروبی بر روی فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود حاوی اسانس آویشن اطلاعات و داده‌های خام

آویشن بود. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که متغیر مستقل درصد اسانس آویشن در سطح $p < 0.01$ معنی دار شد. فاکتورهایی که کفایت مدل را نشان دادند، مدل ریاضی و بهینه شدهی فیلم خوراکی بر اساس آزمون خواص ضد میکروبی در جدول ۳ آورده شده است.

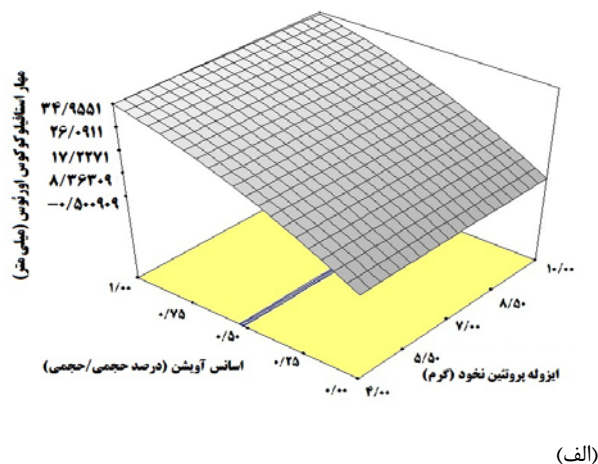
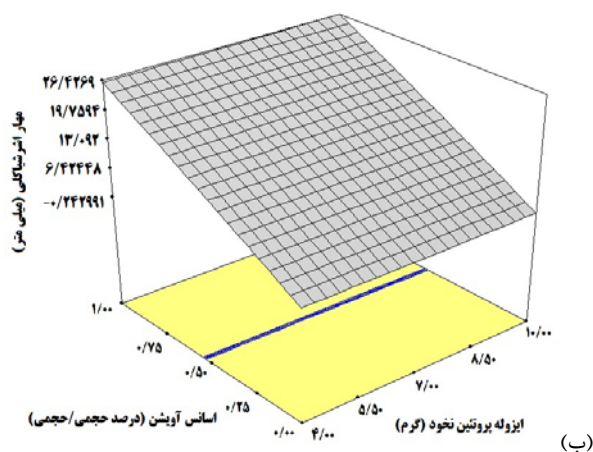
فرایند بهینه‌سازی و براساس خواص میکروبی مطلوب به جهت داشتن میزان هاله‌ی مهارى حداکثر برای *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل $35/4$ میلی‌متر؛ میزان بهینه‌ی غلظت ایزوله‌ی پروتئین نخود $5/8$ گرم و برای گلیسرول 60% و برای درصد اسانس آویشن 1% بود به جهت داشتن میزان هاله‌ی مهارى حداکثر برای *اشرشیاکلی* معادل $26/8$ میلی‌متر؛ 4 گرم ایزوله‌ی پروتئین نخود، 60% گلیسرول و 1% اسانس تعیین شد.

توسط نرم افزار Design Expert 6.0.2 و به کمک طرح سطح پاسخ با ۵ نقطه‌ی مرکزی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج آنالیز واریانس مدل‌های بررسی شده خطی، درجه دوم و اثر متقابل در جدول ۲ قابل مشاهده است. همچنین، سطح پذیرش معنی‌داری آزمون در این تحقیق 99% انتخاب شد ($p < 0.01$).

نتایج خواص ضد میکروبی فیلم خوراکی: همان طور که در جدول ۲ و نمایش سه‌بعدی (شکل ۱) مربوط به مهارکنندگی باکتری‌های بیماری‌زا مشاهده می‌شود، عبارت‌های مدل که برای مهار *استافیلوکوکوس اورئوس* معنی دار شد؛ خطی درصد اسانس آویشن و درجه‌ی دوم درصد اسانس آویشن بود. عبارت‌های مدل که برای مهار *اشرشیاکلی* معنی دار شد، فقط شامل خطی درصد اسانس

جدول ۲. آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم برای آزمون‌های نفوذپذیری نسبت به بخار آب (g/m.Pa.s)، حلالیت (%) و آزمون خاصیت ضد میکروبی در مقابل دو میکروارگانیسم *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* ($P < 0.01$)

منبع	درجه آزادی	نفوذ پذیری نسبت به بخار آب (g/m.Pa.s)		حلالیت (%)		اشرشیاکلی (mm)		مجموع مربعات	احتمال P
		مجموع مربعات	احتمال P	مجموع مربعات	احتمال P	مجموع مربعات	احتمال P		
مدل خطی	۹	$2/65 \times 10^{-18}$	< 0.0001	$362/22$	0.0001	$3156/02$	< 0.0001	$1743/34$	< 0.0001
X_1	۱	$2/17 \times 10^{-18}$	< 0.0001	$219/74$	< 0.0001	$0/23$	$0/4039$ ns	$0/052$	$0/4525$ ns
X_2	۱	$2/92 \times 10^{-19}$	< 0.0001	$85/21$	0.0003	$0/021$	$0/7973$ ns	$0/16$	$0/1948$ ns
X_3	۱	$5/54 \times 10^{-20}$	0.0011	$48/68$	0.0019	$3072/31$	< 0.0001	$1742/4$	< 0.0001
درجه دوم									
X_{11}	۱	$2/24 \times 10^{-20}$	0.0160 ns	$0/057$	$0/8896$ ns	$0/034$	$0/7437$ ns	$0/23$	$0/1276$ ns
X_{22}	۱	$5/88 \times 10^{-22}$	$0/6491$ ns	$5/82$	$0/1810$ ns	$0/80$	$0/1367$ ns	$0/0004$	$0/9477$ ns
X_{33}	۱	$8/56 \times 10^{-22}$	$0/5837$ ns	$4/64$	$0/2281$ ns	$50/65$	< 0.0001	$0/3$	$0/0913$ ns
اثر متقابل									
X_{12}	۱	$7/99 \times 10^{-20}$	0.0003	$0/48$	$0/6868$ ns	$0/58$	$0/1266$ ns	$0/2$	$0/1513$ ns
X_{13}	۱	$1/16 \times 10^{-20}$	$0/0639$ ns	$0/21$	$0/9333$ ns	$0/32$	$0/3292$ ns	$0/0002$	$0/9622$ ns
X_{23}	۱	$8/95 \times 10^{-22}$	$0/8585$ ns	$0/17$	$0/8093$ ns	$0/29$	$0/7646$ ns	$0/14$	$0/2355$ ns
باقیمانده	۱۰	$2/67 \times 10^{-20}$		$28/13$		$3/04$		$0/85$	
عدم برازش	۵	$1/70 \times 10^{-20}$	$0/2773$ ns	$22/63$	$0/0734$ ns	$1/34$	$0/5995$ ns	$0/53$	$0/2939$ ns
خطای خالص	۵	$9/71 \times 10^{-21}$		$5/50$		$1/70$		$0/32$	
کل	۱۹	$2/65 \times 10^{-18}$		$390/36$		$3159/06$		$1744/19$	

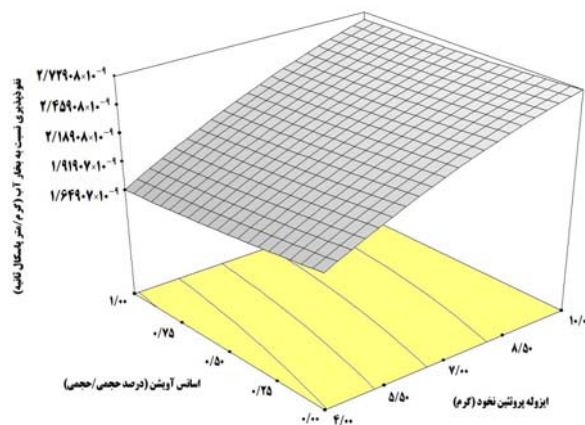


شکل ۱. نمودار سه بعدی، اثر همزمان متغیرها بر مهار الف) استافیلوکوکوس اورئوس و ب) اشرشیاکلی توسط فیلم خوراکی ($p < 0.01$)

فرایند بهینه سازی بر اساس نفوذ پذیری نسبت به بخار آب برای داشتن نفوذی حداقل و معادل $1/4 \times 10^{-9}$ گرم بر متر پاسکال ثانیه؛ میزان بهینه غلظت ایزوله ی پروتئین نخود ۴ گرم و برای گلیسرول ۳/۴۰٪ و ۰/۹۹ درصد اسانس بود. نتایج حلالیت فیلم خوراکی: همان طور که در جدول ۲ و نمودار سه بعدی (شکل ۳) حلالیت فیلم خوراکی مشاهده می شود، عبارت های مدل که برای حلالیت فیلم خوراکی معنی دار شد خطی غلظت ایزوله ی پروتئین نخود، خطی درصد گلیسرول و خطی درصد اسانس آویشن بود ($p < 0.01$). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که هر سه متغیر مستقل (میزان غلظت ایزوله ی پروتئین، درصد گلیسرول و درصد اسانس آویشن) در سطح $p < 0.01$ معنی دار بودند. در راستای فرایند بهینه سازی فرمولاسیون تولید فیلم خوراکی، فاکتورهایی که کفایت مدل را نشان داد، مدل ریاضی و بهینه شده بر اساس آزمون حلالیت فیلم خوراکی در جدول ۳ آورده شده است.

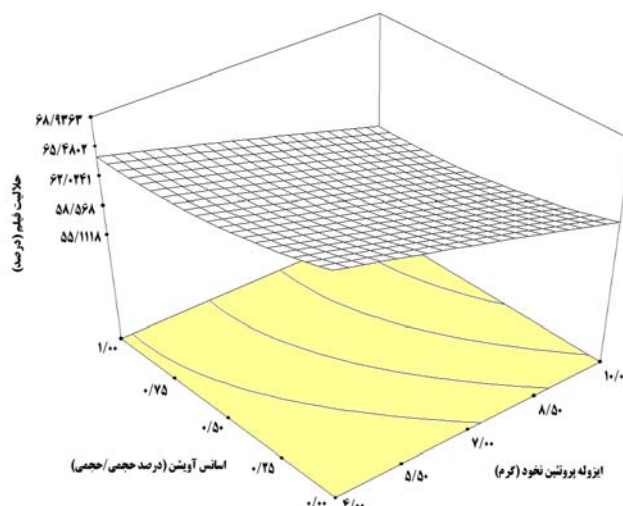
در ادامه فرایند بهینه سازی بر اساس حلالیت فیلم خوراکی، برای داشتن حلالیت حداکثر و معادل ۶۹/۶۵۸ درصد؛ میزان بهینه ی غلظت ایزوله ی پروتئین نخود ۴/۱ گرم و برای گلیسرول ۵۸٪ و اسانس آویشن ۰/۰۵ درصد بود.

نتایج آزمون نفوذ پذیری نسبت به بخار آب: همان طور که در جدول ۲ و نمایش سه بعدی (شکل ۲) نفوذ پذیری نسبت به بخار آب مشاهده می شود، عبارت های مدل که برای نفوذ پذیری نسبت به بخار آب معنی دار شد؛ خطی غلظت ایزوله ی پروتئین نخود، خطی درصد گلیسرول، خطی درصد اسانس آویشن و اثر متقابل غلظت ایزوله ی پروتئین نخود-درصد گلیسرول بود ($p < 0.01$). نتایج آنالیز واریانس نشان داد که هر سه متغیر مستقل میزان غلظت ایزوله ی پروتئین، درصد گلیسرول و درصد اسانس آویشن در سطح $p < 0.01$ معنی دار بود. هم چنین، اثر متقابل غلظت پروتئین و درصد گلیسرول معنی دار شد. فاکتورهایی که کفایت مدل را نشان داد، مدل ریاضی و بهینه شده ی فیلم خوراکی بر اساس آزمون نفوذ پذیری نسبت به بخار آب در جدول ۳ آورده شده است.



شکل ۲. نمودار سه بعدی اثر همزمان متغیرها بر نفوذ پذیری نسبت به بخار آب فیلم خوراکی ($p < 0.01$)

نتایج بهینه‌سازی نهایی: پس از بهینه‌سازی نهایی تولید فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود (جدول ۴) به منظور داشتن خاصیت ضد میکروبی جهت ایجاد هاله‌ی مهارى حداکثر برای استافیلوکوکوس اورئوس معادل ۳۵/۰۰۱ میلی‌متر و برای اشرشیاکلی معادل ۲۶/۱۴۲ میلی‌متر، برای داشتن نفوذ حداقل و معادل $1/4911 \times 10^{-9}$ گرم بر متر پاسکال ثانیه و برای حلالیت حداکثر معادل ۶۲/۵۵۳۱ درصد؛ ۴ گرم ایزوله‌ی پروتئین نخود، ۴۴/۴ درصد گلیسرول و ۱ درصد اسانس تعیین شد. برای رسیدن به شرایط مذکور متغیرهای مستقل (غلظت ایزوله‌ی پروتئین نخود، اسانس آویشن و گلیسرول) در حالت in range در نظر گرفته شدند.



شکل ۳. نمودار سه‌بعدی، اثر همزمان متغیرها بر روی میزان حلالیت فیلم خوراکی ($p < 0/01$)

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس و بهینه‌سازی فیلم خوراکی در آزمون‌های ضد میکروبی و فیزیکی فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود ($P < 0.01$)

آزمون	مدل	R ²	R ² -Adj	R ² -Pre	CV
نفوذ پذیری نسبت به بخار	$Y = -1/5 \times 10^{-9} + 4/5 \times 10^{-10} X_1 + 5/5 \times 10^{-11} X_2 - 4/305 \times 10^{-11} X_3 - 3/33 \times 10^{-12} X_1 X_2$	۰/۹۹	۰/۹۸	۰/۹۵	۲/۳۰
آب (g/m.Pa.s)					
حلالیت (%)	$Y = 25/8 - 1/77 X_1 + 1/7 X_2 - 4/3 \times 10^{-10} X_3$	۰/۹۲۷۹	۰/۸۶۳۱	۰/۵۲۸۴	۲/۷۶
استافیلوکوکوس					
ضدمیکروبی اورئوس (mm)	$Y = 8/5 + 5/38 X_2 - 1/7 X_3$	۰/۹۹۹۰	۰/۹۹۸۲	۰/۹۹۱۹	۲/۸۲
اشرشیاکلی (mm)	$Y = -0/372 + 26/4 X_3$	۰/۹۹۹۵	۰/۹۹۹۱	۰/۹۹۵۸	۲/۱۹

جدول ۴. بهینه‌سازی نهایی تهیه‌ی فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود

شماره	ایزوله‌ی پروتئین نخود (g)	گلیسرول (%)	اسانس آویشن (%)	نفوذ پذیری نسبت به بخار آب (g/m.Pa.s)	حلالیت (%)	استافیلوکوکوس اورئوس (mm)	اشرشیاکلی (mm)	درجه مطلوبیت
۱	۴/۰۰	۴۴/۴۰	۱/۰۰	$1/4911 \times 10^{-9}$	۶۲/۵۵۳۱	۳۵/۰۰۱	۲۶/۱۴۲	۰/۸۶۱
۲	۴/۰۰	۴۴/۴۸	۱/۰۰	$1/4937 \times 10^{-9}$	۶۲/۵۸۳۷	۳۴/۹۹۸	۲۶/۱۴۵	۰/۸۶۱
۳	۴/۰۰	۴۳/۷۸	۱/۰۰	$1/4728 \times 10^{-9}$	۶۲/۲۸۶۸	۳۵/۰۲۷	۲۶/۱۱۶	۰/۸۶۱
۴	۴/۰۰	۴۵/۴۷	۱/۰۰	$1/5217 \times 10^{-9}$	۶۲/۹۷۷۵	۳۴/۹۶۶	۲۶/۱۸۵	۰/۸۶۰
۵	۴/۰۰	۴۰/۸۰	۱/۰۰	$1/3843 \times 10^{-9}$	۶۰/۸۶۵۳	۳۵/۲۰۹	۲۶/۹۹۷	۰/۸۵۵

• بحث

ایزوله‌ی پروتئین نخود هیچ تأثیر معنی‌داری بر مهار باکتری‌ها مشاهده نشد (شکل ۱. الف، ب)، در صورتی که میزان درصد اسانس آویشن به طور معنی‌داری ($p < 0/01$) هاله‌ی مهارى اطراف فیلم‌ها را افزایش داد (شکل ۱. الف،

در ادامه بررسی‌ها روی خواص ضد میکروبی فیلم خوراکی اثر همزمان درصد اسانس آویشن با غلظت ایزوله‌ی پروتئین نخود و درصد گلیسرول، بر میزان هاله مهارى اطراف فیلم‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. با افزایش میزان غلظت

۲۰). در واقع این قبیل ترکیبات، آب دوست هستند و با ایجاد فضاهای خالی در فیلم باعث افزایش سرعت انتقال بخار آب در آن می‌شوند. *Tapia* و همکاران در بیان علت این پدیده چنین تفسیر نمودند که نرم‌کننده‌ها تحرک زنجیره‌های پلیمر را با پر کردن فضاهای خالی بین شبکه‌ی پلیمر افزایش می‌دهند. به دنبال این عمل، نیروهای پیوندی درون ملکولی کاهش یافته، شکنندگی کم، آب دوستی و قابلیت انتقال گاز و بخار آب زیاد می‌شود (۲۲).

با توجه به شکل ۲ نباید نقش اسانس آویشن در کاهش کم اما محسوس نفوذ پذیری نسبت به بخار آب را نادیده گرفت. طبق مطالعات انجام شده وجود مواد آب‌گریز (هیدروفوب) در فرمولاسیون فیلم‌های خوراکی سبب بهبود ویژگی‌های ممانعت‌کنندگی در مقابل نفوذ بخار آب می‌شوند. در تأیید این نتایج *Hettiarachchy* و همکاران نشان دادند که افزودن منوگلیسرید به محلول سازنده‌ی فیلم خوراکی اثر معنی‌داری بر روی نفوذ پذیری نسبت به بخار آب دارد (۲۳). به طور کلی علت کاهش رطوبت و جلوگیری از نفوذ آن را می‌توان اثر دفع‌کننده ترکیبات غیر قطبی موجود در اسانس‌ها دانست که موجب ایجاد تغییراتی در ساختار ملکولی می‌شود. این نتایج مشابه یافته‌های *Pranoto* و همکاران بود (۲۴).

در ادامه‌ی بررسی فیلم خوراکی آزمون حلالیت انجام شد. اثر همزمان ایزوله‌ی پروتئین نخود- درصد اسانس آویشن بر میزان حلالیت فیلم خوراکی بر پایه‌ی پروتئین نخود نشان داده شده است (شکل ۳). بر این اساس افزایش غلظت پروتئین، میزان حلالیت فیلم خوراکی را کاهش داد. دلیل این پدیده را احتمالاً می‌توان به ایجاد یک شبکه‌ی قوی پروتئینی در غلظت‌های بالا مرتبط دانست. البته، دلیل دیگری هم ممکن است وجود داشته باشد؛ در فرایند تهیه‌ی محلول فیلم از دمای بالا (در حدود 85°C) استفاده شد. این دما به مدت ۳۰ دقیقه طی هم‌زدن مداوم برای همه‌ی تیمارها مورد استفاده قرار گرفت و باعث دناتور شدن پروتئین‌ها و تغییر ویژگی‌های آن به ویژه حلالیت شد (۲۷-۲۵). اما از طرف دیگر با افزایش میزان گلیسرول، حلالیت فیلم خوراکی به مقدار زیادی افزایش یافت که به علت کوچک بودن اندازه‌ی ملکولی پلاستی‌سایزرها و نفوذ مناسب آن‌ها به ساختار ملکولی پروتئین، تحرک ملکولی داخل بافت فیلم افزایش یافت. در نتیجه، میزان حلالیت افزایش یافت (۲۸). در واقع به علت ورود ملکول‌های پلاستی‌سایزر در

ب). هم‌چنین مشاهده شد که افزایش گلیسرول هیچ تأثیر معنی‌داری بر افزایش هاله‌ی مهاری نداشت. زمانی که مواد ضد میکروبی به محلول فیلم افزوده شد، این ترکیبات به درون آگار نفوذ کرده و از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کردند. بر اساس تحقیقات صورت گرفته اسانس آویشن از خاصیت ضد میکروبی بالایی برخوردار است. خاصیت ضد میکروبی آن به دلیل حضور دو ترکیب فنلی قوی تیمول (*Thymol*) و کارواکرول (*Carvacrol*) است. این دو ترکیب می‌توانند اثر هم‌افزایی داشته باشند. تیمول و کارواکرول غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب می‌کنند و سبب خروج لیپو پلی ساکاریدها و افزایش نفوذ پذیری غشا نسبت به ATP می‌شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره‌ی انرژی و مرگ سلول می‌شود (۱۵، ۱۰).

در ادامه‌ی تحقیق با بررسی میزان نفوذ پذیری فیلم خوراکی نسبت به بخار آب اثر همزمان ایزوله‌ی پروتئین نخود - درصد اسانس آویشن (شکل ۲) مشخص شد که ایزوله‌ی پروتئین نخود ماهیت آب دوستی دارد و در مقابل نفوذ بخار آب ضعیف عمل می‌کند. این نفوذ پذیری وابستگی زیادی به ترکیبات موجود به ویژه پروتئین‌ها در فیلم دارد. پروتئین‌های اصلی در نخود و اکثر بقولات گلوبولین‌ها و آلبومین‌ها هستند و تقریباً ۷۰٪ پروتئین دانه (شامل پروتئین‌های 7S, 11S, 15S) از گلوبولین‌ها تشکیل شده است. *Kokoszka* و همکاران با بررسی فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله پروتئین سویا مشاهده کردند که با افزایش میزان ایزوله‌ی پروتئین سویا در غلظت ثابت گلیسرول، میزان نفوذ پذیری نسبت به بخار آب افزایش یافت (۱۹).

همچنین با توجه به معنی دار بودن اثر خطی غلظت گلیسرول (جدول ۲) تأثیر غلظت گلیسرول بر میزان نفوذ پذیری نسبت به بخار آب بدون لحاظ کردن تغییرات سایر متغیرها به گونه‌ای است که با افزایش میزان گلیسرول به تدریج نفوذ پذیری فیلم نسبت به بخار آب افزایش می‌یابد. بر اساس مطالعات *Park* و همکاران و *Donhowe* و همکاران پلاستی‌سایزرها ملکول‌های کوچکی هستند و زمانی که به مواد پلیمری اضافه می‌شوند، ساختار سه‌بعدی آن‌ها را تغییر می‌دهند و با کاهش نیروهای جاذبه‌ی بین ملکولی و افزایش سیالیت شاخه‌های پلیمری باعث افزایش انعطاف پذیری فیلم می‌شوند. هم‌چنین با افزایش گلیسرول به محلول فیلم خوراکی؛ نفوذ پذیری نسبت به بخار آب افزایش می‌یابد (۲۱،

ساگوآلژینات حاوی ماده ضد میکروبی اسانس گور گیاه گزارش کردند که استفاده از اسانس گور گیاه موجب کاهش حلالیت فیلم خوراکی شد (۳۱). در تحقیقی مشابه *Noomhorn* و *Laohakonjit* بیان کردند که فیلم خوراکی مطلوب باید در دوره‌ی نگهداری در یخچال یا سردخانه دارای حلالیت کم باشد، ولی در هنگام طبخ دارای حلالیت بالا بوده و به گونه‌ای باشد که نیاز به خارج کردن ماده غذایی از بسته نبوده و ماده غذایی همراه بسته خوراکی مورد فرایند قرار گیرد (۳۲).

در این تحقیق نشان داده شد که ایزوله‌ی پروتئین نخود از قابلیت تشکیل فیلم خوراکی با ترکیب ضد میکروبی برخوردار است. در آزمون خواص ضد میکروبی اثر پارامتر اسانس آویشن روی قطر هاله‌ی مهار در سطح $p < 0.01$ معنی دار شد. به طوری که با افزایش درصد اسانس آویشن به صورت خطی رشد میکروارگانیسم‌ها را مهار کرد. غلظت ایزوله‌ی پروتئین نخود و درصد گلیسرول هیچ تأثیری بر مهار باکتری‌ها نگذاشت ($p < 0.05$) پس می‌توان بیان کرد که فیلم خوراکی بر پایه‌ی ایزوله‌ی پروتئین نخود به تنهایی و بدون افزودن مواد ضد میکروبی، خاصیت ضد میکروبی ندارد. همچنین، آزمون نفوذپذیری نسبت به بخار آب نشان داد که میزان نفوذ با افزایش غلظت ایزوله‌ی پروتئین و درصد گلیسرول و کاهش درصد اسانس آویشن افزایش می‌یابد. آزمون حلالیت فیلم خوراکی نیز نشان داد که با کاهش میزان پروتئین و درصد اسانس آویشن و افزایش میزان گلیسرول، میزان حلالیت افزایش می‌یابد.

ساختار ملکولی فیلم پروتئینی، پیوستگی و جاذبه‌ی بین ملکولی بسیار پروتئینی کاهش یافت این پدیده همراه با افزایش حلالیت در نمونه‌های دارای بیشترین مقدار گلیسرول قابل مشاهده بود. *Dehghan Shoaar* و همکاران اثر غلظت گلیسرول را بر درصد حلالیت فیلم بررسی و مشاهده کردند که با افزایش درصد گلیسرول به محلول تهیه‌ی فیلم خوراکی بر پایه‌ی پروتئین سویا، میزان افزایش حلالیت آن در سطح 0.05 معنی دار است (۱۷). هم‌چنین *Turhan* و *Sahbas* و همکاران نیز با بررسی میزان حلالیت فیلم خوراکی بر پایه‌ی متیل سلولز به نتایج مشابه پژوهش حاضر رسیدند و بیان کردند که ملکول‌های ترکیبات انعطاف‌دهنده جاذبه و پیوستگی بین ملکولی را کاهش می‌دهد و باعث افزایش حلالیت می‌شوند (۲۹). در ادامه نتایج *Adebiyi* و همکاران با بررسی میزان حلالیت فیلم خوراکی بر پایه‌ی پروتئین سبوس برنج ضمن اینکه به نتایجی مشابه رسیدند، بیان کردند فیلم‌هایی که برای مصرف خوراکی همراه با غذا به کار می‌روند، باید حلالیت بالایی داشته باشند (۳۰). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، افزایش درصد اسانس آویشن نیز باعث کاهش میزان حلالیت فیلم شد. دلیل آن هم غیرقطبی بودن و داشتن خاصیت آبگریزی اسانس است که باعث کاهش میزان حلالیت شد. به طور کلی و بر اساس مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر ثابت شده که افزودن ترکیبات غیر قطبی یا آب‌گریز به محلول تهیه‌ی فیلم میزان حلالیت آن را کاهش می‌دهد که از نتایج مشابه ما *Maizura* و همکاران با بررسی خصوصیت حلالیت فیلم ترکیبی نشاسته

• References

- Burt SA. Essential oil : Their antibacterial propeties and potential applications in: Int J Food Microbiol 2004; 94:223-53.
- Hwang CA, Mark T, Tamplin L. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenese* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures. Food Microbiol 2005; 24,211-18.
- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials: A Review. Food Microbiol 2005; 22, 273-92.
- Alzoreky NS, Nakahara K. Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int J Food Microbiol 2002;80, 223-30.
- Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Applied Microbiol 2000; 88, 308-16.
- Marino M, Bersani C, Comi G. Impedance measurement to study antimicrobial activity of

- essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol* 2001; 67, 187–95.
7. Mehrabian S, Mollabashi Z, Majd A. Antimicrobial effects of plant species, spearmint family, 15 strains of pathogenic intestinal bacteria and cause food poisoning. *Nashre Olom* 1996; 8(1):1-11 [in Persian].
 8. Rad S. Increase the storage life of horticultural products using vegetable essentials oil antifungal effects. [dissertation]. Mashhad: Ferdowsi University. M.Sc. Faculty of Food Science and Technology 1999[in Persian].
 9. Debeaufort F, Quezada-Gallo JA, Voilley A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Sci & Nutr* 1998; 38, 299–313.
 10. Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi MA. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *J Food Process & Preserv* 2009; 33:727–43.
 11. Cho SY, Rhee C. Sorption characteristics of soy protein films and their relation to mechanical properties. *LWT Food Sci & Tech* 2002; 35(2):151–7.
 12. Ou S, Kwok KC, Kang Y. Changes in invitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film. *J Food Eng* 2004; 64: 301-305.
 13. Cho SY, Park JW, Batt HP, Thomas RL. Edible films made from membrane processed soy protein concentrates. *LWT Food Sci & Tech* 2007; 40: 418–23.
 14. Salari A, Habibi Najafi MB, Farhoosh R, Marashi SH. Effect of different solvent systems on the extraction of grape seed extract and its antimicrobial properties. *J Food Sci & Tech Iran* 2008;71-79[in Persian].
 15. Seydim AC, Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int* 2006; 39: 639–44.
 16. ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of materials. Annual book of ASTM Standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing & Materials; 2002.
 17. Dehghan Shoaar Z, Badiei F, Behmadi H. The role of glycerol on some physical and mechanical properties of isolated soy protein films. *J Food Sci & Tech* 2009; 6(1): 1-10 [in Persian].
 18. Myers RH, Montgomery DC. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. 2nd Ed. New York; Wiley: 2002.
 19. Kokoszka S, Debeaufort F, Hambleton A, Lenart A, Voilley A. Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innov Food Sci & Emerg Tech* 2010; 11, 503–10.
 20. Park HJ, Weller CL, Verrgano PJ, Testin RF. Permeability and mechanical properties of cellulosebased edible films. *J Food Sci* 1993; 58(6): 1361-70.
 21. Donhowe G, Fennema O. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of Methylcellulose films. *J Food Process Preserv* 1993; 17(4): 247-57.
 22. Tapia MS, Rojas-Grau MA, Carmona A, Rodriguez FJ, Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso, O. Use of alginate and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocoll* 2007; 10:1-11.
 23. Hettiarachchy NS, Satchithanandam E. Organic Acid Incorporated Edible Antimicrobial Films, United States patent, Us 2007; 7,16,580,B2.
 24. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT Food Sci & Tech* 2005;38: 859–65.
 25. Saremnejad S, Azizi MH, Barzegar M, Abbasi S. Effect of pH and Plasticizer concentration on the properties of films prepared from bean protein isolates. *Tarbiat Modarre University. J Food Sci* 2009;6(2): 93-103[in Persian].
 26. Coma V, Sebti I, Pardon P, Deschamps A, Pichavant FH. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Protec* 2001; 64(4): 470–5.
 27. Miller KS, Krochta JM. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: a review. *Trends in Food Sci & Tech* 1997; 8(7): 228–37.

28. Daraei F, Badiei F, Mizani M, Gerami A. The effect of plasticizer addition on the mechanical properties and physical chemistry methylcellulose edible film. *Iranian J Nut Sci & Food Tech* 2009; 4(3): 47-54.
29. Turhan KN, Sahbas F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *J Food Eng* 2004; 61: 459-66.
30. Adebisi AP, Adebisi AO, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K. Rice bran protein-based edible films. *Int Food Sci & Tech* 2007;1-8.
31. Maizura M, Fazilah A, Norziah MH, Karim AA. Antibacterial activity and mechanical of partially hydrolyzed properties of sago starch-alginate edible film containing lemon grass essential oil. *J Food Sci* 2007; 72: 324-30.
32. Laohakonjit N, Noomhorn A. Effect of plasticizer on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch/Starke* 2004; 56: 348-56.

Antimicrobial and physical properties of a chickpea protein isolate-based film containing essential oil of thyme using response surface methodology

Meshkani M^{*1}, Mortazavi A², Pourfallah Z³

1- Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.
Email: s.m.meshkani@gmail.com

2- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Food Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

3- Department of Food Science & Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Received 13 Oct, 2012

Accepted 15 Jan, 2012

Background and Objective: The use of bio-polymers, especially proteins and herbal essences, has received attention for years in the production of edible films. The aim of this study was to prepare edible films based on isolated chickpea protein and determine the effects of concentrations of chickpea protein, glycerol and essence on antimicrobial properties, as well as water vapor permeability and solubility, of the edible film.

Materials and Methods: Protein was extracted from Filip variety chickpea powder by the isoelectric point sequestration method. Then, samples of edible films were prepared using protein (4-10g), glycerol as a plasticizer (40-60%), and thyme essence (0-1%). The antimicrobial effect of the film samples on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, their water-vapor permeability and surface-solubility, by the response-surface method, were determined.

Results: Thyme essence brought about statistically significant reductions ($P < 0.01$) in the growth of the two microorganisms, as well as solubility and water vapor permeability of the films; the higher the protein concentration, the higher the permeability and the lower the solubility ($P < 0.01$). Also, higher glycerol concentrations led to increased permeability and solubility ($P < 0.01$).

Conclusion: Based on the findings, it can be concluded that isolated protein of chickpea can form films. The optimum levels of isolated chickpea protein, glycerol and thyme essence for maximum anti-microbial effects, minimum water-vapor permeability and maximum solubility are 4g, 44.4% and 1%, respectively.

Keywords: Antimicrobial films, Chickpea protein, Thyme essence oil, Physicochemical properties