

Investigating of Antifungal Activity of Polylactic Acid Film Containing Iron Nanoparticles in a Food System

Mohammad Javad Akbarian Meymand¹, Arash Babaei^{2*}

1. Department of Grape Environmental Science, Research Institute for Grapes and Raisin (RIGR), Malayer University, Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/09/16
Accepted: 2018/12/16
Available online: 2018/12/22

Article Subject:

Food Microbiology

IJMM 2018; 12(5): 338-347

Corresponding author:

Arash Babaei

Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran

Email:

a.babaei@sheffield.ac.uk

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: Food contamination by fungi threatens human health. Active packaging containing antifungal compounds is a novel method to increase the safety and preservation of food. The aim of this study was to produce and investigate the antifungal properties of poly-lactic acid active film containing iron nanoparticles in grape juice packaging.

Materials and Methods: Poly-lactic acid nanocomposite films were prepared by casting method through adding different amounts of nanoparticles (0, 2 and 4%) to 4% (w/w) solution of poly-lactic acid in chloroform and antifungal effect of films were investigated in in vitro and grape juice packaging. For this purpose, circular disks (6 mm) of film were prepared and placed on Potato Dextrose Agar media culture inoculated with *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Botrytis cinerea*. The diameter of the zone of inhibition was reported based on millimeters after 5 days of incubation of the plates at 27 ° C. In order to investigate the antifungal effect of nanocomposite in packaging of grape juice, 5×10^4 cfu/ml of these molds were inoculated to pasteurized grape juice and then packed with thermal sewing and after a 15-days period, the molds population was counted.

Results: The distribution of nanoparticles in the polymer, was uniform at concentration of 2% and formed agglomerate at concentration of 4%. The results of the disc diffusion test showed that adding of nanoparticles to the film caused antifungal effect against the tested fungi and this property increased with increasing percentage of nanoparticles. Also, the results of the study on the antifungal effect in grape juice packaging in the 15-days period showed that the population of fungi had an inverse relationship with concentrations of iron nanoparticles in grape juice samples. *A. niger* showed the most and *B. sinera* showed the least resistance to this nanoparticle.

Conclusions: Significant compatibility between iron nanoparticles and poly lactic acid provides the possibility of producing poly-lactic acid nanocomposite as an alternative for synthetic polymers from petroleum derivatives. Iron nanoparticles produce anti-fungal effects through the leakage of lactase dehydrogenase from the cell wall, impairment in mitochondrial function, chromosomes compression, and production of free radicals of oxygen. Due to the antifungal effect of iron nanoparticles, its application in poly-lactic acid film decreases fungal growth and, as a result, increases the shelf-life of foods.

Keywords: Active packaging, Poly-lactic acid, Iron nanoparticles, Antifungal effect, Grape juice.

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Akbarian Meymand M J, Babaei A. Investigating of Antifungal Activity of Polylactic Acid Film Containing Iron Nanoparticles in a Food System. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (5) :338-347



بررسی فعالیت ضدقارچی فیلم پلی لاکتیک اسید حاوی نانوذره آهن در یک سامانه غذایی

محمد جواد اکبریان میمند^۱، آرش بابایی^{۲*}

۱- گروه پژوهشی تبدیل و نگهداری انگور، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: آلودگی مواد غذایی از طریق قارچ‌ها، سلامتی انسان را تهدید می‌کند. بسته‌بندی فعال حاوی ترکیبات ضدقارچی روش نوینی برای افزایش ایمنی و نگهداری مواد غذایی است. هدف از این مطالعه، تولید و بررسی خواص ضدقارچی فیلم فعال پلی لاکتیک اسید حاوی نانوذره آهن در بسته‌بندی آب انگور بود.

مواد و روش کار: فیلم‌های نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید با روش قالب‌گیری از طریق افزودن مقادیر مختلف نانوذره (۰، ۲، ۴ درصد) به محلول ۴درصد وزنی از پلی لاکتیک اسید در کلروفرم تهیه و اثر ضدقارچی فیلم‌ها در شرایط آزمایشگاهی و بسته‌بندی آب انگور بررسی شد. بدین منظور، دیسک‌های مدوری (۶ میلی‌متر) از فیلم تهیه و روی محیط‌های کشت پتیتو دکستروز آگار تلقیح شده با سوسپانسیون قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم نوتاتوم* و *بوتریتیس سینرا* قرار داده شد. قطر هاله رشدنیافتگی پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، براساس میلی‌متر گزارش شد. برای بررسی اثر ضدقارچی نانوکامپوزیت در بسته‌بندی آب انگور، تعداد $cfu/ml \times 10^4$ از کپک‌های فوق، به آب انگور پاستوریزه تلقیح شده و سپس با دوخت حرارتی بسته‌بندی و پس از یک دوره ۱۵ روزه، جمعیت کپک‌ها شمارش شد.

یافته‌ها: پراکنش نانوذره در پلیمر، تا غلظت ۲درصد یکنواخت و در غلظت ۴درصد، موجب ایجاد کلوخه شد. نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که افزودن نانوذرات به فیلم، باعث ایجاد خاصیت ضدقارچی علیه قارچ‌های آزمودنی شد و این خاصیت با افزایش درصد نانوذره افزایش یافت. همچنین نتایج بررسی اثر ضدقارچی در بسته‌بندی آب انگور در بازه زمانی ۱۵ روزه نشان داد که جمعیت قارچ‌ها با غلظت نانوذرات آهن در نمونه‌های آب انگور رابطه معکوس داشت. قارچ *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین و قارچ *بوتریتیس سینرا* کمترین مقاومت را نسبت به این نانوذره از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: سازگاری جالب توجه بین نانوذره آهن و پلی لاکتیک اسید، امکان تولید نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید را به‌عنوان یک جایگزین پلیمرهای سنتزی حاصل از مشتقات نفتی، فراهم می‌کند. نانوذره آهن از طریق نشت لاکتاز دهیدروژناز از دیواره سلولی، اختلال در عملکرد میتوکندری، متراکم‌شدن کروموزوم‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب اثر ضدقارچی می‌شود. با توجه به اثر ضدقارچی نانوذره آهن، کاربرد آن در فیلم پلی لاکتیک اسید، موجب کاهش رشد قارچی و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی می‌شود.

کلمات کلیدی: بسته‌بندی فعال، پلی لاکتیک اسید، نانوذره آهن، اثر ضدقارچی، آب انگور

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۰/۰۱

موضوع:

میکروبیولوژی غذایی

IJMM1397;12(5): 338-347

نویسنده مسئول:

آرش بابایی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه،

دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

پست الکترونیک:

a.babaei@sheffield.ac.uk

مقدمه

اکراسئوس، فلاوس، پارازیتیکوس و کاربوناریوس، پنی‌سیلیوم‌ها (ویریدیکاتوم، نوتاتوم و وروکوزوم) و گونه‌های فوزاریوم، از جمله کپک‌هایی هستند که می‌توانند در مواد غذایی رشد کنند و موجب تولید سم اکراتوکسین شوند. اکراتوکسین یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها است که منجر به اختلالات هورمونی، سمیت حاد و مزمن، سمیت ایمنی، سرطان‌زایی، عوارض کلیوی و کبدی در

آلودگی مواد غذایی به قارچ‌ها، خسارات عمده‌ای به تولیدات غذایی وارد می‌کند. قارچ‌ها در طول رشد خود در مواد غذایی، متابولیت‌های ثانویه‌ای به‌نام مایکوتوکسین از خود بر جای می‌گذارند که اثرات مخرب و شدیدی مثل سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی و کاهش رشد، مهار سیستم ایمنی و جهش‌زایی را در موجودات زنده ایجاد می‌کند. *آسپرژیلوس‌ها* (نایجر،

در مواد بسته‌بندی و تولید بسته‌بندی‌های فعال، بهتر از افزودن مستقیم این مواد به غذاها است (۷).

بسته‌بندی فعال نوعی از بسته‌بندی است که با ایجاد تغییرات شیمیایی یا بیولوژیک در محتویات یا فضای داخل بسته‌بندی، مدت‌زمان نگهداری ماده غذایی را افزایش می‌دهد (۷).

معمولاً برای تولید بسته‌بندی مواد غذایی از پلاستیک‌های سنتزی استفاده می‌شود که متأسفانه استفاده بی‌رویه از آن منجر به افزایش آلودگی محیط‌زیست و افزایش تولید فرآورده‌های پتروشیمی شده است. در سال‌های اخیر، استفاده از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر به‌عنوان جایگزین این ترکیبات در بسته‌بندی، گسترش زیادی یافته است (۸). پلی لاکتیک اسید، یک پلیمر زیست تخریب‌پذیری است که از سوی اداره غذا و داروی ایالات متحده در لیست محصولات GRAS (Generally Recognized as Safe) قرار داده شد و برای بسته‌بندی تمام مواد غذایی ایمن شناخته شده است (۷). پلی لاکتیک اسید، علاوه بر داشتن ویژگی‌های مطلوبی مثل استحکام مکانیکی زیاد، شفافیت و بازدارندگی در مقابل عبور نور فرابنفش، معایبی نیز از جمله شکنندگی زیاد، پایداری حرارتی کم و بازدارندگی ضعیف در مقابل رطوبت و اکسیژن دارد که کاربرد آن را به‌عنوان جایگزین پلیمرهای سنتزی در صنعت بسته‌بندی محدود کرده است (۹). لذا به‌منظور بهبود این خواص، اصلاح‌کننده‌هایی مثل نانوذرات در ساختار آن به کار می‌رود. استفاده از نانوتقویت‌کننده‌ها و تولید نانوکامپوزیت‌های پلیمری از روش‌های مؤثری است که برای تقویت خواص پلیمرها طی سال‌های اخیر رواج یافته است (۱۰).

با توجه به تحقیقات اخیر درباره خواص ضد میکروبی نانوذره آهن، تاکنون اثر ضدقارچی آن در بسته‌بندی مواد غذایی بررسی نشده است. لذا در این پژوهش، نانوذره آهن به‌عنوان ماده ضدقارچی علیه قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم نوتاتوم* و *بوتریتیس سینرا* در پلیمر پلی لاکتیک اسید در بسته‌بندی آب انگور بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

گرانول‌های پلی لاکتیک اسید از شرکت فکیور آلمان و کلروفورم به‌عنوان حلال آن از شرکت مرک آلمان خریداری شد. نانوذره آهن نیز از شرکت دانش‌بنیان نانو نوین پلیمر خریداری شد. این پژوهش در سال ۱۳۹۶ انجام شده است.

انسان می‌شود (۱). آب انگور یک نوشیدنی مغذی و یکی از مهم‌ترین محصولات صنایع غذایی در جهان است که در صورت آلودگی آن با قارچ‌ها، ضرر اقتصادی کلانی به این صنعت وارد می‌شود. معمولاً آب انگور از طریق کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سیلیوم نوتاتوم* و *بوتریتیس سینرا* دچار فساد می‌شود (۲).

کپک *آسپرژیلوس نایجر* یکی از مهم‌ترین قارچ‌های عامل فساد در آب انگور است که علاوه بر فاسدکردن آن، می‌تواند مایکوتوکسین تولید کند که تولید آن به شرایط رشد و نوع گونه بستگی دارد (۳). قارچ *پنی‌سیلیوم* گستردگی زیادی در طبیعت دارد و از جمله کپک‌های مهم در صنایع غذایی است. گونه *پنی‌سیلیوم نوتاتوم* نیز از کپک‌های مهم در فساد آب انگور به‌شمار می‌آید که علاوه بر فساد، عامل ایجاد لکه‌های سبز و آبی روی سایر مواد غذایی است (۴). *بوتریتیس سینرا* عامل کپک خاکستری، نیز یکی دیگر از پاتوژن‌های قارچی است. این قارچ نکروتروف سلول‌های میزبان را از طریق آنزیم‌های تجزیه‌کننده از بین می‌برد و آن را برای رشد خود مصرف می‌کند. آلودگی با قارچ *بوتریتیس سینرا* مشکل مهمی برای پس از برداشت میوه‌ها و سبزیجات از جمله انگور است (۵).

به‌منظور افزایش حاشیه امنیت و اطمینان از سلامت و کیفیت مواد غذایی معمولاً از نگهدارنده‌های مختلف (شیمیایی یا طبیعی) استفاده می‌شود. از آنجایی که استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی ممکن است موجب ایجاد اثرات مضر در مصرف‌کنندگان شود، لذا علاقه زیادی به جایگزینی آنها با نگهدارنده‌های طبیعی وجود دارد. نانوذره آهن یکی از نگهدارنده‌های طبیعی است که قابلیت استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی را دارد. این نانوذره از نظر سازمان غذا و داروی آمریکا، تنها نانوذره‌ای است که برای مصرف دارویی و غذایی مورد تأیید بوده و به‌دلیل ویژگی‌های مغناطیسی مناسب، سمیت بسیار اندک، سازگاری زیستی بالا و سهولت نسبی در سنتز، نسبت به نانوذرات دیگر بیشتر در کانون توجه محققان قرار گرفته است. نانوذره آهن موجب نشد لاکتاز دهیدروژناز از دیواره سلولی، ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، متراکم شدن کروموزوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با برهم‌زدن تعادل بین فشار اکسیداتیو، اکسیداسیون آنزیم‌ها و پروتئین‌های ساختاری و شکستن مولکول DNA موجب مرگ سلولی می‌شوند (۶).

با توجه به امکان غیرفعال‌شدن نگهدارنده‌ها بر اثر فعل و انفعالات شیمیایی با ترکیبات مواد غذایی، استفاده از نگهدارنده‌ها

تهیه فیلم پلی لاکتیک اسید

محلول ۴ درصد وزنی پلی لاکتیک اسید در کلروفرم تهیه و به مدت ۴ ساعت در دمای محیط تا حل شدن کامل گرانول ها و ایجاد محلول یکنواخت هم زده شد. برای تهیه فیلم پلی لاکتیک اسید از روش ریخته گری محلول (قالب گیری) استفاده شد. بدین منظور، ۳۵ گرم از محلول پلی لاکتیک اسید روی شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی متر ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط، خشک شد. فیلم خالص پلی لاکتیک اسید با نام PLA (Polylactic Acid) مشخص شد (۱۱).

تهیه فیلم نانوکامپوزیت

برای تهیه فیلم‌های نانوکامپوزیت، مقادیر متفاوت نانوذره آهن به محلول ۴ درصد وزنی پلی لاکتیک اسید اضافه و پس از ۴ ساعت هم زدن، مخلوط نهایی به مدت ۱ ساعت در معرض فراصوت (4R USD)، ساخت کشور ژاپن) قرار گرفت. سپس محلول حاصل روی صفحه شیشه‌ای پخش و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک شد. پس از خشک شدن، فیلم‌های نانوکامپوزیت پیوسته و شفاف پلی لاکتیک اسید با ضخامت 30 ± 50 میکرون (اندازه گیری شده به کمک ریزسنج آلتون ساخت کشور آمریکا، با دقت ۰/۱)، از سطح صفحه شیشه‌ای جدا شد. فیلم‌های نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید/نانوذره آهن که حاوی ۰، ۲ و ۴ درصد وزنی نانوذره آهن بودند، به ترتیب با علائم اختصاری PLA، PLA-Fe-۲ و PLA-Fe-۴ نشان داده شدند (۱۲).

پراش پرتو X (X ray diffraction - XRD)

برای انجام آزمون XRD از دستگاه پراش سنج Bruker مدل Advance ۵۰۰۰ D ساخت شرکت Siemens آلمان استفاده شد. برای انجام آزمون روی فیلم‌های نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید، مولد پرتو X در ۴۰ کیلو ولت و ۴۰ میلی آمپر تنظیم شد و نمونه‌ها در معرض پرتو X با طول موج 0.154 نانومتر قرار گرفتند. پرتوهای بازتابشی از نمونه، در دمای محیط و در محدوده زاویه 2θ برابر $20-40^\circ$ جمع آوری و نمودار مربوط به شدت بازتابش آنها، رسم شد. سرعت انجام آزمون، ۱ min و اندازه گام‌ها 0.02° بود (۱۳).

میکروسکوپی الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM)

مطالعه شکل‌شناسی سطح شکست فیلم‌ها، با میکروسکوپ FE-SEM مدل (MIRA3 FEG-SEM ساخت شرکت تسکن کشور جمهوری چک) بررسی شد. پیش از بررسی، نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه به کمک پوشش دهنده پاششی Cresingtor با طلا پوشش

داده شدند. سپس ریزنگارهای الکترونی پویشی از نمونه‌ها در ولتاژ ۱۵ کیلوولت تهیه شد. برای مطالعه سطح شکست فیلم‌های پلی لاکتیک اسید پس از آزمون مکانیکی، از میکروسکوپ FE-SEM استفاده شد. پس از پوشش طلای سطح شکست، در ولتاژ ۵ کیلوولت تصاویری عمود بر سطح شکست نمونه‌ها تهیه شد (۱۳).

تعیین فعالیت ضدقارچی فیلم‌ها

فعال سازی قارچ‌های مورد آزمون

آسپرژیلوس نایجر (PTTC: ۵۰۱۲)، پنی‌سلیم نوتاتوم (PTTC: ۵۰۷۴) و بوتریتیس سینرا (ATTC: ۱۲۶۵) از ویال لیوفیلیزه در محیط سابوراد دکستروز برات (Saborad -SDB) فعال شده و سپس در محیط پوتیتو دکستروز (Dextrose Broth) قرار داده و به مدت ۵ روز کشت داده شد. آگار (Potato Dextrose Agar -PDA) به صورت شیب‌دار در درجه حرارت ۲۷ درجه سلسیوس و به مدت ۵ روز کشت داده شد. اسپورها پس از برداشت از محیط کشت به آب مقطر استریل حاوی توئین ۸۰ (۰/۱ درصد) منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط گشته و ۵ دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته‌نشین شوند. تعداد اسپورهای موجود در سوسپانسیون حاصل به وسیله لام نئوبار (Boeco, 0.0025 mm², Germany) شمارش و در نهایت غلظت 5×10^4 cfu/ml استاندارد شد.

بررسی اثر ضدقارچی فیلم‌های نانوکامپوزیت

تولید شده

به منظور انجام آزمون‌های تشخیص فعالیت ضد میکروبی، فیلم‌ها با استفاده از چاقو به شکل دیسک‌های دایره‌ای به قطر ۶ میلی‌متر بریده شدند. سپس با استفاده از روش انتشار دیسک، فیلم‌های بریده شده روی محیط‌های کشت تلقیح شده با سوسپانسیون آسپرژیلوس نایجر، پنی سلیم نوتاتوم و بوتریتیس سینرا در فاصله مناسب از هم جای گذاری شده و پلیت‌ها به مدت ۵ روز در انکوباتور ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان مدنظر، قطر هاله شفاف در اطراف فیلم براساس میلی‌متر گزارش شد (۱۴).

استفاده از فیلم نانوکامپوزیت ضدقارچی در

بسته بندی آب انگور

ابتدا انگور تهیه شده از باغ‌های ملایر، آب گیری و سپس در آزمایشگاه به مدت نیم ساعت در دمای ۹۰ درجه سلسیوس پاستوریزه شد. پس از خنک شدن آب انگور، به میزان 5×10^4 cfu/ml از کپک‌های تحت آزمون، تلقیح انجام شد. سپس آب انگور درون فیلم‌های پلی لاکتیک اسید حاوی نانوذرات آهن با مقدار (۰، ۲ و ۴ درصد) ریخته و با استفاده از دستگاه پرس حرارتی لبه

در ۲۰ برابر ۲۲/۵ ایجاد شد که می‌توان آن را به بلورینگی نانوذره آهن نسبت داد. با افزایش مقدار نانوذره آهن، شدت پیک‌ها در ۲۰ افزایش یافت که نشان‌دهنده افزایش حالت بلوری فیلم‌های نانوکامپوزیت است. با این وجود، شدت پیک در ۲۰ برابر ۱۸ که مربوط به تبلور طبیعی پلی لاکتیک اسید است، در تمام سطوح نانوذره آهن بدون تغییر باقی ماند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً نواحی بلوری جدیدی در ماتریس پلیمر تشکیل شده است که می‌توان آن را به تشکیل توده‌های نانوذره آهن نسبت داد. در واقع، با وجود مقادیر زیاد نانوذره، کلوخگی نانوذرات و تشکیل توده‌های بلوری، درصد تبلور نانوکامپوزیت‌ها افزایش یافت. به‌طور کلی طبق الگوهای XRD می‌توان چنین نتیجه گرفت که فیلم‌های نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید/نانوذره آهن نسبت به فیلم خالص پلی لاکتیک اسید از درجه بلورینگی زیادی در ماتریس پلیمر برخوردار بود که دلیل این مسئله، اولاً نقش هسته‌زایی نانوذره آهن و اثر آن در نزدیک کردن رشته‌های پلیمر به یکدیگر و افزایش انسجام و تراکم بین آنها و ثانیاً افزودن پرکننده بلوری و تشکیل توده‌های بلوری به‌ویژه در غلظت‌های زیاد نانوذره آهن است.

فیلم‌ها دوخت داده شد. این نمونه‌ها در ۳، ۷، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ روز پس از ذخیره‌سازی آزمایش شدند. این آزمایش‌ها طبق دستورالعمل سنجش میزان کپک در مواد غذایی مؤسسه تحقیقات استاندارد صنعتی ایران صورت گرفت.

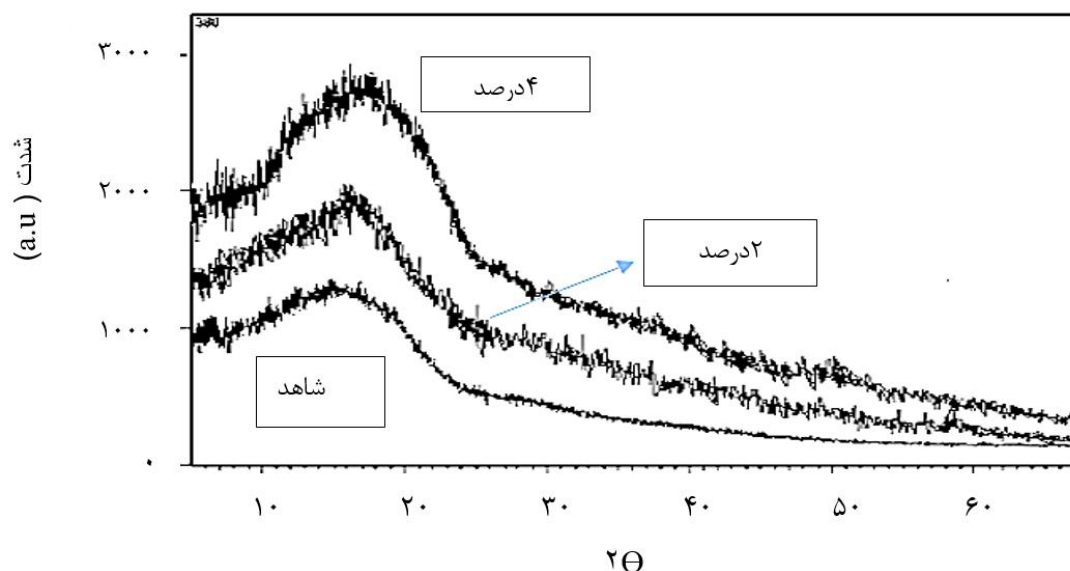
روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، طرحی کاملاً تصادفی به کار رفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند. پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار EXCEL رسم شد.

یافته‌ها

آزمون پراش پرتو x (XRD)

برای بررسی اثر افزودن نانوذرات آهن بر مقدار بلورینگی فیلم پلی لاکتیک اسید، از آزمون XRD استفاده شد. شکل ۱ الگوهای پراش پرتو x فیلم خالص پلی لاکتیک اسید و فیلم‌های نانوکامپوزیت را نشان می‌دهد. به استثنای پیکی که در ناحیه ۲۰ برابر ۱۸ مشاهده شد، پلی لاکتیک اسید ماهیت بی‌شکل داشت؛ بنابراین می‌توان آن را ماده‌ای نیمه‌بلوری دانست. در فیلم‌های حاوی نانوذره آهن، علاوه بر افزایش شدت این پیک، پیک جدیدی



شکل ۱. الگوهای XRD نمونه‌های فیلم پلی لاکتیک اسید خالص و نانوکامپوزیت‌های PLA-Fe

نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در غلظت کمتر از ۴ درصد، نانوذره به‌طور یکنواخت در ماتریس پلی لاکتیک اسید پخش شده است و سطح نمونه PLA-Fe-۲ مانند فیلم خالص، صاف و یکنواخت به‌نظر می‌رسد. با افزایش میزان نانوذره به

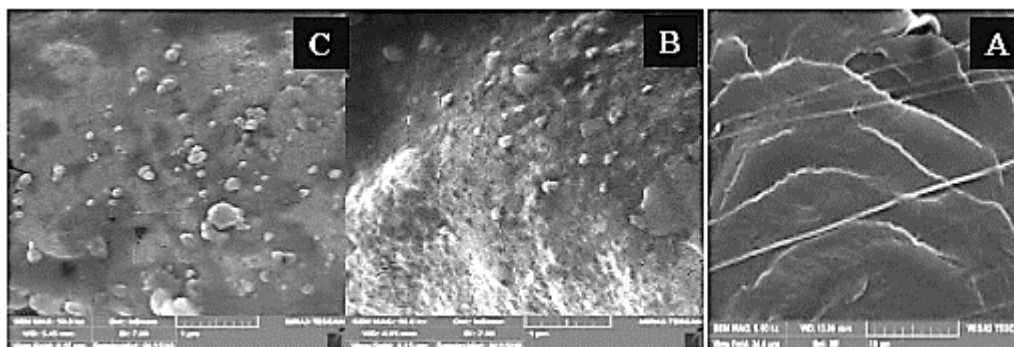
آزمون میکروسکوپی الکترونی روبشی نشر میدانی

(FE-SEM)

تصاویر FE-SEM در شکل ۲، سطح شکست فیلم خالص پلی لاکتیک اسید و فیلم‌های نانوکامپوزیت را پس از آزمون کشش

به خوبی نشان می‌دهد که نانوذره به‌طور کامل با لایه‌ای از ماتریس پلیمر پوشانده و محصور شده است. این تصاویر نشان‌دهنده سازگاری کامل بین نانوذره آهن و پلیمر پلی‌لاکتیک اسید است که می‌تواند در سطوح کمتر این نوع نانوذرات، به تولید کامپوزیت با ساختار واقعی نانو منجر شود.

۴درصد، زبری سطح شکست تا حدودی افزایش یافت. همان‌طور که در شکل (۲- C) مشاهده می‌شود، در نانوکامپوزیت PLA-۴ Fe-، نانوذره کلوخه شده و در ماتریس فیلم به شکل توده درآمده است. هرچند که همین توده‌های تشکیل شده نیز، پراکنش مطلوب و یکنواخت در ماتریس پلی‌لاکتیک اسید داشتند. شکل ۲-B،



شکل ۲. تصاویر SEM مربوط به (A) پلی‌لاکتیک اسید خالص، (B) نانوکامپوزیت حاوی ۲ درصد وزنی نانوذره آهن، (C) نانوکامپوزیت حاوی ۴ درصد وزنی نانوذره آهن

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نانوذره از صفر به ۴ درصد، اثر ضدقارچی به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($P \leq 0.05$). نتایج حاصل از اثر ضدقارچی بر *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی‌سلیم نوتاتوم* و *بوتریتیس سینرا* نشان داد که هر سه قارچ نسبت به این ترکیب حساس بودند؛ اما نتایج اندازه‌گیری قطر هاله رشدنیافتگی نشان داد که قطر هاله رشدنیافتگی نانوذره مربوط به قارچ *بوتریتیس سینرا* نسبت به دو قارچ دیگر بیشتر و قطر هاله رشدنیافتگی در قارچ *آسپرژیلوس نایجر* کمتر از دو قارچ دیگر بود ($P \leq 0.05$). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از عوامل ضد میکروبی به همراه فیلم‌های بسته‌بندی مختلف بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مؤثر است.

نتایج میکروبی

تعیین فعالیت ضدقارچی فیلم‌ها

اساس بسته‌بندی‌های فعال، استفاده از فیلم‌ها به همراه مواد ضد میکروبی است که باعث محدود کردن یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها در سطح مواد غذایی می‌شود. همان‌طور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، فیلم پلی‌لاکتیک اسید، فاقد نانوذره (نمونه شاهد) و هرگونه اثر ضدقارچی بود. همچنین فیلم پلی‌لاکتیک اسید حاوی غلظت‌های مختلف نانوذره روی هر سه قارچ بررسی شده، اثر مهارکنندگی نشان داد.

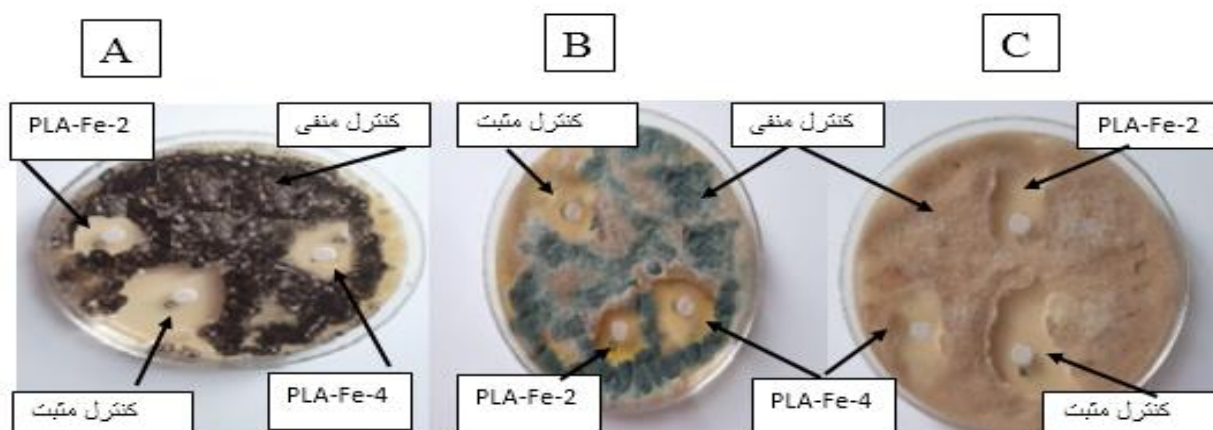
جدول ۱. قطر هاله رشدنیافتگی (میلی‌متر) اطراف فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید حاوی درصد‌های مختلف نانوذره

نانوذره (درصد)	<i>آسپرژیلوس نایجر</i>	<i>پنی‌سلیم نوتاتوم</i>	<i>بوتریتیس سینرا</i>
۰	a	a	a
۲	۱۴/۴۲ ± ۰/۱۰ bA*	۱۸/۰۲ ± ۰/۱۳ bB	۲۵/۴۲ ± ۰/۱۰ bC
۴	۱۸/۲۲ ± ۰/۱۳ cA	۲۸/۰۲ ± ۰/۱۳ cB	۳۰/۲۲ ± ۰/۱۳ cC

* نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده و مقادیر با حرف فوقانی مشابه، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند ($P > 0.05$).

*حروف کوچک متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت در ستون‌ها است.

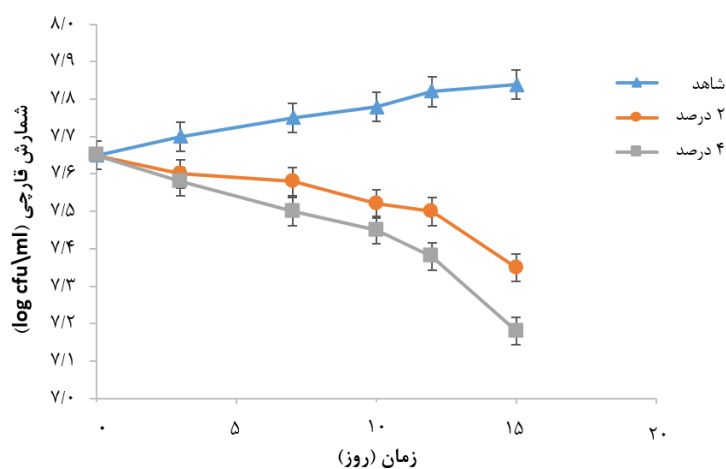
*حروف بزرگ متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت در ردیف‌ها است.



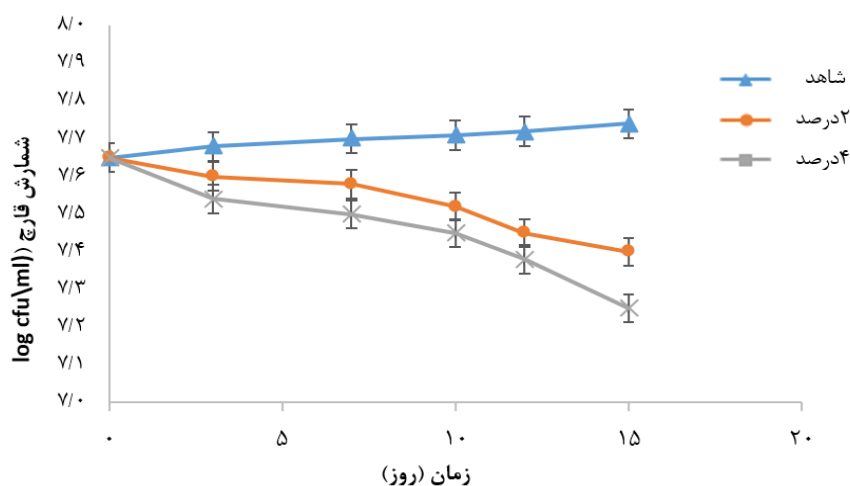
شکل ۳. هاله رشدنیافتگی اطراف کپک‌های مورد مطالعه در فیلم خالص و نانوکامپوزیت‌های PLA-Fe (A) اسپریلوس نایجر، (B) پنی‌سیلیوم نوتاتوم (C) بوتریتیس سینرا

ضدقارچی فیلم حاصل نسبت به بسته‌بندی‌های حاوی ۲ درصد نانوذرات آهن، افزایش یافت. اثرات نانوذره آهن بر مرگ سلول‌های قارچی را می‌توان به علت نشت لاکتاز دهیدروژناز از دیواره سلولی، ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، متراکم شدن کروموزوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نسبت داد (۱۵). در دوره نگهداری ۱۵ روزه، میزان کاهش جمعیت قارچ بوتریتیس سینرا نسبت به دو قارچ دیگر در بسته‌بندی‌های نانوکامپوزیتی بیشتر بود که این نتیجه با نتایج حاصل از آزمون انتشار دیسک نیز مطابقت داشت. از طرفی قارچ اسپریلوس نایجر نسبت به این نانوذره مقاومت بیشتری از خود نشان داده و میزان کاهش جمعیت در آن نسبت به دو قارچ دیگر کمتر بود.

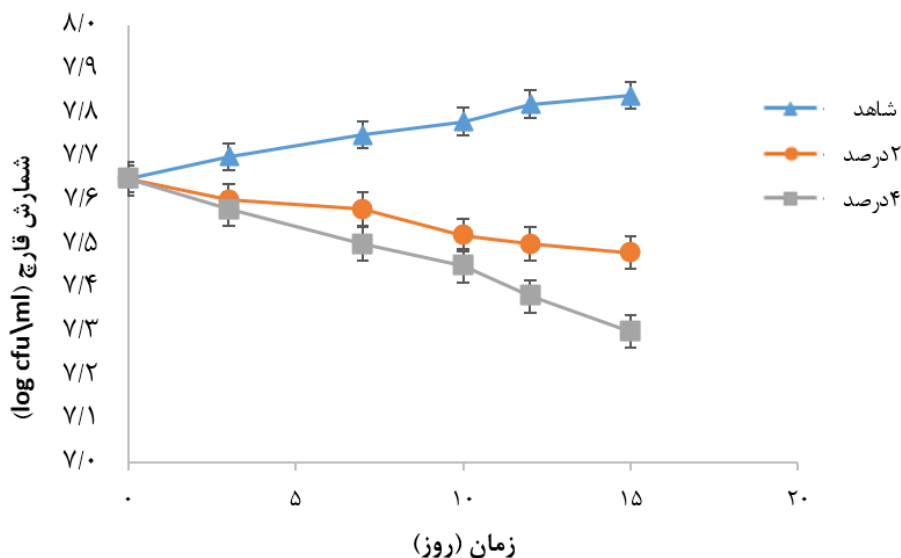
بررسی اثر ضدقارچی در نمونه‌های آب انگور بسته‌بندی‌شده با فیلم نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید
نتایج شمارش قارچی در آب انگور بسته‌بندی‌شده با فیلم پلیلاکتیک حاوی نانوذره (۰، ۲ و ۴ درصد) در حین نگهداری در دمای یخچال در شکل ۴ تا ۶ نشان داده شده است. نتایج حاصل از شمارش کپک‌ها در آب انگور موجود در بسته‌های پلی لاکتیک اسید خالص (نمونه کنترل) پس از ۱۵ روز، بیانگر افزایش تعداد قارچ‌ها است. در آب انگور موجود در بسته‌بندی‌های نانوکامپوزیتی حاوی ۲ و ۴ درصد نانوذره، رشد قارچی به‌طور چشمگیری کاهش یافته است. طبق شکل‌های ۴، ۵ و ۶، جمعیت قارچ‌ها با افزایش غلظت نانوذرات آهن در نمونه‌های آب انگور رابطه معکوس داشت؛ به‌طوری که با افزایش غلظت نانوذرات آهن تا ۴ درصد قدرت



شکل ۴. نتایج شمارش کپک بوتریتیس سینرا/ در آب انگور بسته‌بندی‌شده در فیلم نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید (۴ و ۲،۰)



شکل ۵. نتایج شمارش کپک پنی سلیمون نوتانوم در آب انگور بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید (۲۰ و ۴)



شکل ۶. نتایج شمارش کپک اسپیرژیلوس نایجر در آب انگور بسته‌بندی شده در فیلم نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید (۲۰ و ۴)

بحث و نتیجه‌گیری

پراکنش نانوذره در پلیمر، تا غلظت ۲ درصد یکنواخت و در غلظت ۴ درصد، موجب ایجاد کلوخه شد که نشان‌دهنده سازگاری بین نانوذره آهن و پلیمر پلی لاکتیک اسید در سطوح پایین است که می‌تواند در سطوح کمتر این نوع نانوذرات، به تولید کامپوزیت با ساختار واقعی نانو منجر شوند.

ارزیابی توانایی ضدقارچی فیلم‌های نانو کامپوزیت تولیدشده در مقابله با قارچ‌ها، نشان داد که فیلم تولیدشده حاوی نانوذرات آهن، اثر ضدقارچی داشتند. با توجه به اثبات اثرات نانوذره بر مرگ سلول‌های قارچی، نانوذره آهن موجب نشت لاکتاز دهیدروژناز از غشای سلول، ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری، متراکم شدن

کروموزوم و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن تعادل بین فشار اکسیداتیو و سیستم آنتی‌اکسیدان سلولی را بهم زده با اکسیداسیون آنزیم‌ها و پروتئین‌های ساختاری و شکستن مولکول DNA، در نهایت موجب مرگ سلولی می‌شوند (۱۶، ۱۷).

Zhang و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی استفاده از نانوذرات در پلیمرها به‌عنوان یک ماده ضدقارچی پرداختند. نتایج این تحقیق نشان داد که نانوساختارها و نانوذرات دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصربه‌فردی هستند که از طریق اختلال در ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها باعث از بین رفتن آنها می‌شوند که با نتایج این تحقیق نیز مطابقت داشت (۱۸).

منابع نفتی دانست. از این رو تولید نانوکامپوزیت‌های زیست‌تخریب‌پذیر پلی‌لاکتیک اسید/آهن را می‌توان به‌عنوان راهکاری در راستای رفع مشکلات زیستی ناشی از بسته‌بندی‌های سنتزی و جایگزین پلیمرهای مصنوعی معرفی کرد. در این پژوهش فیلم پلی‌لاکتیک اسید و نانوکامپوزیت‌های پلی‌لاکتیک اسید/آهن با غلظت‌های ۰، ۲ و ۴ درصد نانوذرات آهن تولید شده و خواص فیزیکی اعم از FE-SEM و XRD و همچنین تأثیر آن در جلوگیری از رشد کپک‌های آب انگور در محیط آزمایشگاهی و سامانه غذایی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که واکنش بین نانوذره آهن و پلی‌لاکتیک اسید در سطح ۲ درصد، می‌تواند به تولید کامپوزیت با ساختار واقعی نانو منجر شود. نتایج میکروبی نشان داد که به‌کارگیری نانوکامپوزیت‌های پلی‌لاکتیک اسید/آهن منجر به کاهش جمعیت کپک‌ها در محیط آزمایشگاهی شد. همچنین نتایج حاصل از استفاده از این نانوکامپوزیت به‌عنوان بسته‌بندی ضدقارچی باعث جلوگیری از رشد کپک‌ها شد و نتایج هر دو آزمون میکروبی، بیانگر این مطلب بود که بیشترین اثر ضدقارچی نانوذره مربوط به قارچ بوتریتیس سینرا و کمترین اثر ضدقارچی مربوط به قارچ اسپریلیوس نایجر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، نانوذره آهن سازگاری خوبی با پلی‌لاکتیک اسید ایجاد کرده است و با توجه به اثر ضدقارچی که فیلم‌های حاوی نانوذره آهن داشتند، می‌توانند برای افزایش مدت‌زمان ماندگاری مواد غذایی مناسب باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از گروه زیست‌شناسی دانشگاه ملایر کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Nasrollahi و همکاران (۲۰۱۱)، نیز به بررسی فعالیت ضدقارچی نانوذره نقره از طریق روش دیسک دیفوزیون علیه دو نوع قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و *ساکارومایسس سرویزیه* پرداختند. این محققان پس از سنتز نانوذره، فعالیت ضدقارچی آن را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که نانوذره نقره دارای فعالیت ضدقارچی جالب‌توجهی است که نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌کند (۱۹).

همچنین Turalija و همکاران (۲۰۱۶)، به بررسی خواص ضد میکروبی پلی‌لاکتیک اسید حاوی نانوذره نقره و کیتوزان به روش دیسک دیفوزیون پرداختند که نتایج تحقیق آنها نیز نشان داد با افزایش غلظت نانوذره، اثر ضد میکروبی فیلم‌ها افزایش می‌یابد (۲۰).

در مطالعه Kim و همکاران (۲۰۰۸)، فعالیت ضدقارچی نانوذره نقره در برابر ۶ گونه قارچ بررسی شد. فعالیت ضدقارچی نقره در برابر *کاندیدا آلبیکنس* به دلیل تخریب و اختلال در ساختار غشای سلولی و مهار روند طبیعی جوانه‌زنی کاملاً رؤیت‌پذیر بود (۲۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تعداد کپک‌های مذکور در نمونه‌های آب انگور بسته‌بندی‌شده با فیلم پلی‌لاکتیک اسید حاوی درصد‌های مختلف نانوذره نسبت به گروه شاهد به‌صورت معنی‌داری کمتر شده است ($P \leq 0/05$). همچنین، بین فیلم‌های مختلف، بیشترین اثر ضدقارچی مربوط به فیلم حاوی ۴ درصد نانوذره آهن بود. قارچ اسپریلیوس نایجر نیز بیشترین و قارچ بوتریتیس سینرا کمترین مقاومت را نسبت به این نانوذره از خود نشان دادند.

با توجه به افزایش آلودگی‌های زیست‌محیطی و کمبود منابع نفتی به‌منظور تولید بسته‌بندی‌های مشتق‌شده از این منابع، استفاده از بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب‌پذیر با منابع تجدیدپذیر را می‌توان جایگزین مناسبی برای بسته‌بندی‌های مشتق‌شده از

References

1. Mikaili A. Aflatoxin bread flour and yeast species in Kermanshah in 2003. 9th Iranian Nutrition Congress Tabriz. Tabriz: University of Tabriz press; Sep 4-7, 216.
2. Mikaili A. Aflatoxin bread flour and yeast species in Kermanshah. 9th Iranian Nutrition Congress Tabriz. Tabriz: University of Tabriz press; 2003;(216) 4-7.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary Food Net data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2007 Apr 13; 56 (14):336-9.
4. CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, United States, 2006. MMWR 2007; 55: 392-5.

5. Kazemi A. Consumption of rice contamination by fungi that produce mycotoxins in East Azerbaijan Province. *Tabriz Univ Med Sci.* 2008; 30(3): 111-8.
6. Frisvad JC, Skouboe P, Samson RA. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Syst appl microbiol.* 2005; 28(5): 442-53.
7. Mahdizadeh M, Mohammad Ali Pour M. Bacterial and fungal contaminations of food. Isfahan, Publisher Arkan. 1998; 102-5.
8. Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews.* 2010; 1(1): 5358. <https://doi.org/10.3402/nano.v1i0.5358>
9. Emiroğlu Z K, Yemiş G P, Coşkun B K, Candoğan K. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science.* 2010; 86 (2): 283-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>
10. Ganbarzadeh B, Almasi H, Zahedi J. Biodegradable and edible biopolymers in food and pharmaceutical packaging. First Printing, Amir Kabir Publishers. 1388; 81-6.
11. Jamshidian M, Arab Tehrani E, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly-lactic acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2010; 9(5): 552-71. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x>
12. Suprakas SR, Pralay M, Masami O, Kazunobu Y, Kazue U. New Polylactide / Layered Silicate Nanocomposites. 1. Preparation, Characterization, and Properties, *Macromolecules.* 2002; (35): 3104-10.
13. Almasi H, Ghanbarzadeh B, Dehghannia J. Properties of Poly lactic acid Nanocomposite Film Containing Modified Cellulose Nanofibers. *Poly Sci and Technol.* 2014; 6 (26): 485-97.
14. Li X, Li W, Jiang Y, Ding Y, Yun J, Tang Y, Zhang P. Effect of nano-ZnO-coated active packaging on quality of fresh-cut 'Fuji' apple. *International journal of food science & technology.* 2011; 46 (9): 1947-55.
15. Zapata PA, Tamayo L, Páez M, Cerda E, Azócar I, Rabagliati FM. Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metalocenic "in situ" polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. *European Polymer Journal.* 2011; 47(8): 1541-9.
16. Viota JL, Arroyo FJ, Delgado AV, Horno J. Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2010; 344(1): 144-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.061>
17. Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis ASG. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. *Biomaterials.* 2004; 25(23): 5405-13. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.046>
18. Zhang L, Pornpattananangkul D, Hu CMJ, Huang CM. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry.* 2010; 17(6): 585-94. <https://doi.org/10.2174/092986710790416290>
19. Nasrollahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some os fungi. *International Journal of Nano Dimension.* Dim. 2011; 1(3): 233-9.
20. Turalija M, Bischof S, Budimir A, Gaan S. Antimicrobial PLA films from environment friendly additives. *Composites Part B: Engineering.* 2016; 102: 94-9. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2016.07.017>
21. Kim KJ, Sung WS, Moon SK, Choi JS, Kim JG, Lee DG. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol.* 2008; 18(8): 1482-4.