طراحی فیلم‌های بسته بندی ضد میکروبی زیست تخریب پذیر بر پایه پلی‌لاکتیک اسید حاوی ترکیبات زیست فعال

محمدرضا رضایی گلستانی[۱]
علی خنجری[۲]
علی میثاقی[۳*]
افشین آخوندزاده بستی[٤]
علی عبدالخانی[٥]
سمیرا فیاض‌فر[٦]

[۱] دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

[۲] استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

[۳] دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

[۴] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

[۵] دانشیار گروه علوم صنایع و چوب و کاغذ، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، کرج، ایران

[۶] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات:
amisaghi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷

چکیده

زیست‌تخریب‌پذیری و فعالیت ضد میکروبی مواد بسته‌بندی مواد غذایی از مهم‌ترین پارامترهای صنایع مدرن بسته‌بندی مواد غذایی به شمار می‌آیند. برای توسعه و ارتقاء فیلم‌های پلی لاکتیک اسید به کامپوزیت‌های ضد باکتریایی، غلظت‌های مختلف اسانس آویشن شیرازی و یا عصاره اتانولی برەموم به کمک روش قالب‌ریزی به پلیمر اضافه گردیدند. فعالیت ضدمیکروبی کامپوزیت‌های حاصل با کمک روش انتشار دیسک علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فیلم‌های طراحی‌شده به‌طور مؤثر علیه همه باکتری‌های مورد آزمایش عمل کردند و کامپوزیت‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی ظرفیت مناسبی برای محدود کردن رشد باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی از خود به نمایش گذاشتند. همچنین اضافه شدن عصاره برەموم به فیلم‌های حاوی اسانس آویشن ویژگی‌های ضد باکتریایی فیلم‌ها را کمتر از انتظار افزایش داد که احتمالاً طبیعت آب‌گریزی با آب‌دوستی اجزاء تشکیل‌دهنده فیلم‌های فعال تولیدشده نقش مهمی در بروز این نتایج داشته است. بر اساس نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مشابه، پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر پلی لاکتیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک پلیمر پایه مطلوب برای طراحی و توسعه فیلم‌های ضد میکروبی نوین مخصوصاً در ترکیب با اسانس‌های ضدمیکروبی گیاهی مطرح باشد.

واژگان کلیدی: پلی‌لاکتیک اسید، فیلم بسته‌بندی، ضدمیکروبی، مواد غذایی، ترکیب زیست فعال.

مقدمه

امروزه بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی مواد غذایی به‌عنوان بخشی از بسته‌بندی‌های فعال[1]، می‌توانند یکی از بهترین استراتژی‌های مطرح در کنترل رشد میکروبی در محصولات غذایی باشند. به‌منظور تولید این دسته از فیلم‌های بسته‌بندی، مواد بسته‌بندی گوناگونی به همراه مواد ضدمیکروب مختلفی موردمطالعه قرارگرفته‌اند [۱].

[1] Active Packaging

در این میان، پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌ناپذیر با منشأ ترکیبات نفتی (مانند پلی‌اتیلن، پلی‌پروپیلن و پلی‌آمید) مهم‌ترین ترکیبات بسته‌بندی مواد غذایی هستند که در بسته‌بندی‌های فعال و ضدمیکروب نیز مورداستفاده قرارگرفته‌اند [۲]. با توجه به مقاومت این دسته از ترکیبات به تخریب میکروبی-شیمیایی، افزایش تولید و مصرف آن‌ها به معضل جدی زیست‌محیطی تبدیل شده است. برای جایگزینی این دسته از مواد پلاستیکی ترکیبات زیست‌تخریب‌پذیر مختلفی توسعه پیداکرده‌اند که از میان آن‌ها پلی‌لاکتیک اسید رایج‌ترین پلیمر بسته‌بندی به شمار می‌آید. پلیمر پلی‌لاکتیک اسید یکی از مهم‌ترین ترکیبات بیولوژیکی است که به دلیل خصوصیاتی مانند زیست‌تخریب‌پذیری، قیمت مناسب، زیست‌سازگاری، شفافیت بالا و خصوصیات برتر مکانیکی و گرمایی (در مقایسه با سایر پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر مهم)، برای کاربرد در بسته‌بندی‌های مواد غذایی مطرح است [۳]. این پلیمر از منابع ۱۰۰٪ تجدیدپذیر مانند ذرت و چغندرقند و به دنبال تخمیر نشاسته و تراکم لاکتیک اسید به دست می‌آید. پلی‌لاکتیک اسید در صنایع مختلفی ازجمله وسایل پزشکی (مانند ایمپلنت و نخ بخیه) و بسته‌بندی‌های مواد غذایی کاربرد دارد و با پلی‌استایرن در بسیاری از بسته‌بندی‌های کاربردی مواد غذایی رقابت می‌کند [۴].

اخیراً فیلم‌های ضدمیکروبی بر پایه پلی‌لاکتیک اسید و به کمک ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی و سنتزی با موفقیت طراحی‌شده‌اند [۵-۷]. به دلایلی که پیش‌تر ذکر شد پلی لاکتیک اسید می‌تواند به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای طراحی فیلم‌های بسته‌بندی ضدمیکروبی مواد غذایی مطرح باشد و مورداستفاده قرار گیرد.

از میان مواد گوناگون ضدمیکروبی رایج، ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی دارای ظرفیت ارزشمندی برای استفاده به‌عنوان مواد نگه‌دارنده مواد غذایی هستند و تاکنون انواع مختلفی از آن‌ها به مواد بسته‌بندی مواد غذایی اضافه‌شده‌اند [۸]. اسانس‌های گیاهی گروهی از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی مهمی هستند که علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثرگذارند. درصد بالایی از ترپن‌ها و فنل‌ها در اسانس‌های گیاهی یافت می‌شوند که عمده‌ی اثرات بیولوژیکی اسانس‌ها در ارتباط با حضور همین ترکیبات است [۹].

اسانس آویشن شیرازی از مهم‌ترین اسانس‌های گیاهی است که مخصوصاً به‌واسطه ویژگی‌های ضدمیکروبی به‌خوبی شناخته می‌شود [۱۰]. این گیاه به خانواده نعناعیان تعلق دارد و منبع خوبی از مونوترپن‌ها، به‌ویژه تیمول و کارواکرول، با ویژگی‌های ضدمیکروبی برجسته است [۱۰]. اسانس آویشن شیرازی به‌عنوان یک افزودنی مواد غذایی، ایمن و سالم شناخته‌شده و این خصوصیت در کنار ویژگی ابگریزی آن را به گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در فیلم‌های بسته‌بندی ضدمیکروبی در ترکیب با مواد پلاستیکی آب‌گریز تبدیل می‌کند.

برمموم دیگر ترکیب ضد باکتریایی طبیعی است که توسط زنبورعسل جمع‌آوری شده و در ساختمان کندوها و برای حفاظت از آن‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرد [۱۱]. فلاونوییدها و ترکیبات فنولیک مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتریایی برمموم هستند که در اصل از مشتقات ترکیبات گیاهی هستند [۱۲]. در تحقیقاتی که تاکنون در رابطه با اثرات مختلف برمموم انجام شده عمدتاً از عصاره اتانولی آن بهره گرفته‌شده است [۱۲-۱۴].

با توجه به طعم مشخص، قوی و در برخی اوقات نامطبوع اسانس آویشن شیرازی و برمموم، اضافه شدن مستقیم آن‌ها به ماده غذایی مشکلاتی را به وجود می‌آورد. یکی از راه‌حل‌هایی که برای برطرف نمودن این مشکل مطرح شده، ادغام این نوع ترکیبات معطر با مواد بسته‌بندی است. با در نظر گرفتن موارد فوق‌الذکر، هدف از مطالعه حاضر طراحی و تولید فیلم بسته‌بندی کاملاً زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه پلی‌لاکتیک اسید در ترکیب با دو ترکیب ضدمیکروبی طبیعی اسانس آویشن و یا عصاره اتانولی برمموم به‌وسیله روش قالب‌گیری و ارزیابی اثرات ضدباکتریایی کامپوزیت‌های حاصل علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد به‌وسیله روش انتشار دیسک بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد

گرانول‌های پلی‌لاکتیک اسید از Fkur kunststoff GmbH (آلمان) با چگالی ۱/۳ گرم بر سانتی‌متر مکعب و

وزن مولکولی ۱۹۷۰۰۰ گرم بر مول تهیه شدند. نمونه‌های خام برەموم و گیاه آویشن شیرازی از شرکت پاکان بذر (اصفهان) تأمین شدند. محیط کشت‌های مورداستفاده از شرکت Quelab (کانادا) و سایر معرف‌ها و حلال‌ها با درجه کیفیت آزمایشگاهی بوده و بدون هیچ‌گونه خالص‌سازی اضافی مورداستفاده قرار گرفتند. برای انجام مراحل مختلف مطالعه از دستگاه هموژنایزر (مدل IKA T۲۵-digital ltra turraxU شرکت، آلمان) و کالیپر دیجیتال (با دقت ± ۲ میلی‌متر، Fisher Scientific) بهره گرفته شد.

روش‌ها

استخراج اسانس آویشن و عصاره اتانولی برەموم

قسمت‌های هوایی خشک‌شده‌ی گیاه آویشن شیرازی به‌خوبی خرده شده و اسانس‌گیری با بخار آب به مدت دو ساعت و نیم در دستگاه کلونجر انجام شد. از سولفات سدیم برای خشک‌کردن اسانس بهره گرفته شد و نگهداری اسانس تا زمان استفاده در ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی صورت گرفت. اجزاء اساسی اسانس آویشن اندازه‌گیری شده با دستگاه GC/MS[1] عبارت بودند از ۴۶/۴ ٪ کارواکرول، ۲۳/۶۱ ٪ تیمول، ۱۶/۳۷ ٪ پی سایمن و ۳/۳۲ ٪ آلفا پینن.

عصاره اتانولی برەموم بر اساس روش معرفی‌شده در مطالعه Bodini و همکاران (۲۰۱۳) و با کمی تغییرات تهیه شد [۱۵]. به‌طور خلاصه، ۳۰ گرم از نمونه‌های برەموم به‌خوبی خرد شده و استخراج در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد روی استیرر انجام پذیرفت. سپس مخلوط حاصل در درون دستگاه بن‌ماری به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم زده و با کاغذ صافی شماره ۱ فیلتر شد تا عصاره اتانولی به دست آمد. درنهایت عصاره حاصل (با اجزاء اصلی ۱۸/۵ ٪ پرنیل کافیات، ۱۰/۵ ٪ پینوبانکسین استات، ۴/۳۵ ٪ پینوبانکسین و ۷/۴۵ ٪ ساکورانتین) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد.

تهیه فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید

فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید به کمک روش قالب‌گیری و بر اساس مطالعه Abdulkhani و همکاران (۲۰۱۵) تهیه شدند [۱۶]. به‌طور خلاصه، مخلوطی از گرانول‌های پلی‌لاکتیک اسید در کلروفورم (غلظت ۱٪ وزن به حجم) تهیه و به کمک مگنت استیر به مدت ۸ ساعت تا حل شدن کامل گرانول‌ها به‌خوبی هم زده شد. برای تهیه کامپوزیت‌های ضد باکتریایی، اسانس آویشن (۱/۵٪ حجم به حجم) و عصاره اتانولی برەموم (۰ و ۲٪ حجم به حجم) به محلول کلروفورم اضافه شدند (جدول ۱) و مخلوط حاصل به کمک دستگاه هموژنایزر با دور ۸۰۰۰ (دور بر دقیقه) به مدت ۲ دقیقه کاملاً هموژن گردید. انتخاب غلظت مواد مؤثره در محلول کلروفروم بر اساس مطالعه Shavisi و همکاران (۲۰۱۷) صورت پذیرفت [۱۷]. پس مخلوط‌های به‌دست‌آمده را درون پلیت‌های شیشه‌ای استریل (قطر: ۱۰۰ میلی‌متر، عمق: ۱۵ میلی‌متر) ریخته و جهت تبخیر کامل کلروفورم به مدت ۲۴ ساعت درون هود شیمیایی قرار گرفتند. سه کامپوزیت به‌دست‌آمده در شرایط استریل از سطح پلیت‌ها جدا و در ابعاد دیسک‌های ۹ میلی‌متری بریده شدند. درنهایت نیز تمامی فیلم‌ها درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل تا زمان تست قرار گرفتند.

[1] Gas Chromatogeraphy/Mass Spectrometry

جدول ۱- ترکیب محلول‌های پلی‌لاکتیک اسید و قطر فیلم‌های تولیدی [۱]

نمونه	میزان پلی‌لاکتیک اسید	میزان اسانس آویشن	میزان عصاره بره‌موم	قطر فیلم‌ها (میلی‌متر)[۲]
فیلم شماره ۱	۱	۰	۰	۰/۰۶ ± ۰/۰۲
فیلم شماره ۲	۱	۱/۵	۰	۰/۰۸ ± ۰/۰۳
فیلم شماره ۳	۱	۱/۵	۲	۰/۱۱ ± ۰/۰۳

[۱] میزان ترکیبات بر اساس درصد حجم به حجم در محلول گزارش شده است.
[۲] میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

تهیه میزان تلقیح باکتری

اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های تهیه‌شده علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد مورد ارزیابی قرار گرفت. این باکتری‌ها عبارت بودند از: دو باکتری گرم مثبت *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC ۱۹۱۱۱) *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و دو باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* (ATCC ۴۳۹۹۶) و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* (ATCC ۴۳۹۹۶). کشت‌های استوک سویه‌های باکتری‌ها در محیط آگار قلب و مغز (BHI[۱]) به مدت یک‌شب قبل از انجام آزمون‌های اصلی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد آماده شد. برای تهیه میزان تلقیح، سلول‌های باکتریایی به لوله‌های حاوی محیط آبگوشت قلب و مغز (حاوی ۱/۵ درصد کلرید سدیم برای *ویبریو پاراهمولیتیکوس*) انتقال داده شد و بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه گزاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۶ ساعت برای *ویبریو پاراهمولیتیکوس*) از سوسپانسیون حاصل در داخل کووت استریل به میزانی ریخته شد تا تراکم باکتریایی ۱×۱۰^{۸} واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر حاصل شود. تعداد سلول‌های باکتریایی در سوسپانسیون‌ها به کمک کشت در محیط آگار قلب و مغز تخمین زده شد.

آزمون اثرات ضد باکتریایی فیلم‌ها

فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌ها در شرایط آزمایشگاهی به کمک روش انتشار از دیسک به آگار مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸]. دیسک فیلم‌های تهیه‌شده در مرحله قبل روی محیط مولر هینتون آگار (MHA[۲]) قرار داده شد که از قبل ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (حاوی تراکم باکتریایی ۱×۱۰^{۷} واحد تشکیل‌دهنده کلنی) به آن اضافه و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده بود. قطر هاله‌ی عدم رشد تشکیل‌شده در اطراف دیسک‌ها به‌وسیله کالیپر موردانداز‌ه‌گیری قرار گرفت و ثبت شد. فیلم پلی‌لاکتیک اسید خالص به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در مورد هر فیلم سه تکرار صورت پذیرفت.

تحلیل آماری

آنالیز آماری به‌وسیله نرم‌افزار SPSS (نسخه شماره ۱۶ برای ویندوز، شیکاگو، آمریکا) انجام شد. برای مقایسه‌ی داده‌ها از ANOVA[۳] یک‌طرفه به همراه آزمون Tukey استفاده شد و ازلحاظ آماری اختلاف میانگین‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار تلقی شد.

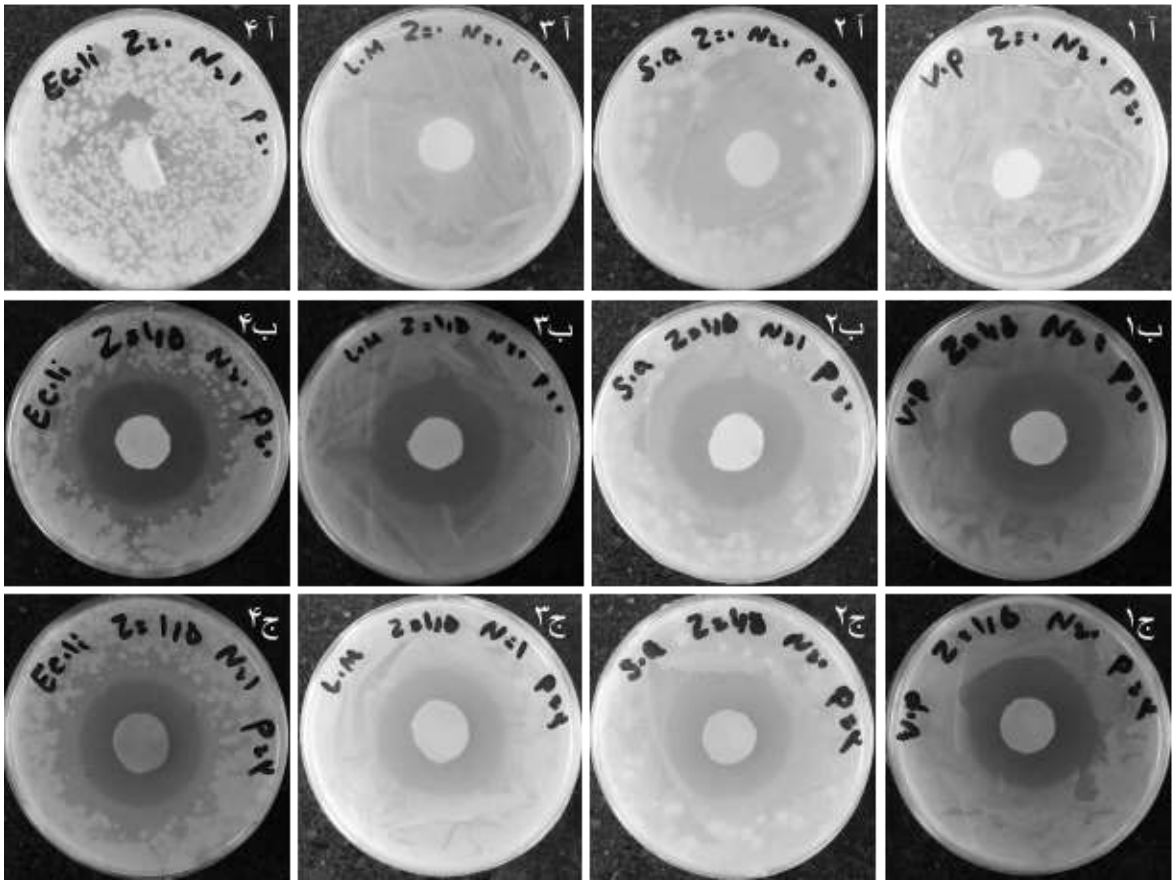
نتایج و بحث

جدول شماره ۲ نتایج مربوط به اثرات ضد میکروبی فیلم‌ها علیه چهار باکتری موردمطالعه با روش انتشار دیسک را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است به‌جز فیلم خالص پلی‌لاکتیک اسید که هیچ فعالیت ضدباکتری نشان نداد، تمامی فیلم‌های فعال توانستند در اطراف خود در تمامی کشت‌ها هاله‌ی عدم رشد ایجاد کنند. بیشترین اثرات ضدمیکروبی مربوط به دیسک فیلم شماره ۳ حاوی

[1] Brain Heart Infusion

[2] Muller Hinton Agar
[3] Analysis of Variance

هر دو ترکیب اسانس آویشن و عصاره برەموم بود که به ترتیب ۴۳، ۳۷/۶، ۴۰/۱ و ۴۱/۷ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد اطراف این فیلم در کشت‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* و *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* ثبت شد. درواقع اضافه کردن عصاره اتانولی برەموم به‌صورت معنی‌داری اثرات ضد میکروبی فیلم حاوی اسانس آویشن را در تمامی کشت‌ها (به استثنا *لیستریا مونوسایتوژنز*) بهبود بخشید. هر دو باکتری گرم مثبت حساسیت بیشتری نسبت به دو باکتری گرم منفی به فیلم‌های فعال داشتند. شکل شماره ۱ تصاویر هاله‌های عدم رشد ایجادشده توسط فیلم‌های فعال علیه باکتری‌های پاتوژن موردمطالعه را نمایش می‌دهد.



شکل ۱- مقایسه اثرات ضدباکتریایی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید (حروف آ، ب و ج به ترتیب مربوط به فیلم‌های شماره ۱، ۲ و ۳) علیه باکتری‌های موردمطالعه (شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اوریوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *اشرشیا کلی*)

در این مطالعه به دو دلیل از روش انتشار دیسک برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی فیلم‌های فعال تولیدی بهره گرفته شد: اولاً، توانایی این آزمون در شبیه‌سازی شرایط پوشش مواد غذایی به‌وسیله مواد بسته‌بندی و ثانیاً کمی بودن آزمون. اساس این روش بر پایه آزادسازی ماده فعال از دیسک فیلم‌ها به آگار پیرامونی و ایجاد ناحیه عدم رشد باکتریایی در اطراف خود است.

بر طبق مطالعات گذشته فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های فعال به عوامل مختلفی ازجمله نوع و خصوصیات فیزیکی شیمیایی ترکیب ضد میکروبی و پلیمر اصلی، ترکیب مواد تشکیل‌دهنده‌ی فیلم‌ها و روش تولید این‌گونه فیلم‌های فعال بستگی دارد [۵, ۱۹].

پلی‌لاکتیک اسید پلیمر آب‌گریزی است و تمایل بیشتری به جذب ترکیبات آب‌گریز دارد. بر اساس این اصل، انتظار می‌رود تا اسانس‌های گیاهی مانند اسانس آویشن توزیع بهتری در پلی‌لاکتیک اسید داشته و مؤثرتر جذب ماتریکس پلیمر شوند. اگرچه حلالیت ضعیف در آب و طبیعت فرار اسانس‌های گیاهی را در جایگاه نامناسبی

برای ترکیب با مواد آب‌دوست (مانند فیلم‌های خوراکی) قرار می‌دهند، اما این مشکلات کمتر در مورد پلیمرهای آب‌گریز مطرح است؛ بنابراین اضافه شدن اسانس آویشن به ماتریکس پلی‌لاکتیک اسید ازلحاظ فنی انجام‌شدنی است و نتایج آزمون ضدمیکروبی در این مطالعه نیز با این پدیده مطابقت داشت. در تحقیقات گذشته فعالیت ضدباکتریایی برەموم و عصاره‌ی اتانولی آن به‌صورت گسترده گزارش شده است و در تمامی آن مطالعات فلاونوییدها، استرّها و آروماتیک‌ها به‌عنوان اجزاء اصلی ضدمیکروبی برەموم گزارش‌شده‌اند که رشد بسیاری از گونه‌های باکتریایی را در شرایط مختلف مهار کرده‌اند [۱۲،۱۴].

نتایج آنالیز عصاره اتانولی برەموم نشان داد که اسیدها و استرهای معطر، اسیدهای آلیفاتیک و فلاونوییدها مهم‌ترین اجزاء برەموم بودند و بنابراین اثرات ضد میکروبی نیز از فیلم‌های حاوی این ترکیب انتظار می‌رفت.

ترکیب پلی‌لاکتیک اسید با مواد ضدمیکروبی آب‌دوست در مطالعات پیشین موردبررسی قرار گرفته است و در بسیاری از آن‌ها اثرات ضدباکتریایی ضعیفی ثبت شده است [۵, ۲۰]. Woraprayote و همکاران (۲۰۱۳) بیوکامپوزیت پلی‌لاکتیک اسید جدیدی از ترکیب پدیوسین (به‌عنوان ماده ضد باکتری) و ذرات خاک‌اره تولید نموده و گزارش کردند که فیلم حاوی پدیوسین خالص قادر به ایجاد هاله‌ی عدم رشد در کشت باکتری *لیستریا مونوسایتوژنز* نبود. درواقع آن‌ها اشاره نمودند که فیلم‌های آب‌گریز پلی لاکتیک اسید ممکن است قادر به جذب پدیوسین آب‌دوست نبوده و اضافه شدن ذرات خاک‌اره به ساختار فیلم‌ها به ورود و اثرگذاری بیشتر پدیوسین کمک کرده است. Jin و همکاران (۲۰۰۹) نیز به‌صورت مشابه مشاهده کردند که اضافه شدن نیسین با طبیعت آب‌دوست به پلیمر پلی‌لاکتیک اسید تأثیری بر رشد باکتری *لاکتوباسیوس پلانتاروم* نداشته است. آن‌ها هم سطوح آب‌گریز پلی‌لاکتیک اسید و محدود بودن اتصال این سطوح با نیسین را به‌عنوان دلیل احتمالی اثر نامطلوب فیلم حاصل ذکر کرده‌اند. درنتیجه افزایش کمتر از انتظار فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس و عصاره در مقایسه با فیلم حاوی اسانس خالص را می‌توان به آب‌دوست بودن عصاره برەموم نسبت داد.

از طرف دیگر نتایج فیلم‌های حاوی اسانس خالص آویشن نشان داد که اسانس به‌خوبی در ساختار فیلم‌ها ادغام شده است و قادر بوده در زمان آزمون به محیط کشت آزاد شود. اخیراً تعدادی از تحقیقات بر روی تولید کامپوزیت‌های بر پایه پلی‌لاکتیک اسید در ترکیب با اسانس‌های گیاهی یا اجزاء اساسی آن‌ها منتشر شده است [۷, ۲۱, ۲۲]. اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های فعال بر پایه پلی‌لاکتیک اسید/تریمنتیلن کربنات حاوی اسانس پونه کوهی توسط Liu و همکاران (۲۰۱۶) موردبررسی قرار گرفت. آن‌ها گزارش کردند که کامپوزیت‌های حاصل، مخصوصاً در غلظت‌های بالاتر از اسانس (مانند ۶ و ۹ درصد وزن/حجم)، علیه هر دو دسته باکتری‌های گرم منفی و مثبت مؤثر بودند. علاوه بر این، Javidi و همکاران (۲۰۱۶) فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید/ اسانس پونه کوهی را به کمک روش قالب‌گیری طراحی و توسعه دادند و اثرات ضدباکتریایی مؤثر فیلم‌ها را علاوه بر شرایط آزمایشگاهی در فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز گزارش کردند.

در تحقیق حاضر باکتری‌های گرم مثبت حساسیت بیشتری به فیلم‌های فعال موردمطالعه نشان دادند. در حقیقت این نتایج در توافق با نتایج مطالعات گذشته است که عموماً اسانس‌های گیاهی (شامل اسانس آویشن) علیه باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر هستند [۹].

اسانس گیاه آویشن شیرازی منبع غنی از مونوترپن‌های فنولیک با خصوصیات برجسته ضد میکروبی است [۱۰]. طبق آنالیز اسانس موردمطالعه، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که فعالیت‌های ضد باکتریایی فیلم‌های حاوی این اسانس ظاهراً مربوط به مقادیر بالای ترکیبات فنولیک کارواکرول و تیمول است که این نکته با مطالعات گذشته نیز همخوانی دارد [۹]. به‌خوبی اثبات شده است که این ترکیبات چربی‌دوست از طریق اثرگذاری بر غشا سلولی باکتری‌ها باعث بروز آسیب‌های اساسی سلولی شده و درنتیجه افزایش نفوذپذیری غشا و آزادسازی محتویات سلولی را در پی دارد [۲۳].

فعالیت ضدباکتریایی برەموم نتیجه‌ی عملکرد پیچیده‌ای از ترکیبات معطر مختلف و سایر ترکیبات

ازجمله کافییک اسید، بنزیل سینامات، سینامیل سینامات و متیل سینامات است [۲۴]. اجزاء فعال مذکور که در ترکیب شیمیایی عصاره برەموم نیز حضور داشتند، به همراه ترکیبات اسانس آویشن قدرت ضدباکتریایی فیلم‌ها را افزایش دادند. درواقع این نوع از اثرات سینرژیستی برای ترکیب عصاره اتانولی برەموم با اسانس زنجبیل و میخک هم گزارش‌شده است [۱۲].

جدول ۲- فعالیت ضدباکتریایی فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید علیه چهار پاتوژن منتخب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با روش انتشار از دیسک

	قطر هاله عدم رشد*			
نمونه فیلم	*استافیلوکوکوس اروئوس*	*اشرشیا کلی*	*ویبریو پاراهمولیتیکوس*	*لیستریا مونوسایتوژنز*
فیلم شماره ۱	-	-	-	-
فیلم شماره ۲	^{b}۱/۲ ± ۴۲/۱	^{b}۰/۲ ± ۳۶/۲	^{b}۰/۷ ± ۳۹/۰	^{a}۰/۵ ± ۴۱/۷
فیلم شماره ۳	^{a}۰/۴ ± ۴۳/۰	^{a}۰/۵ ± ۳۷/۶	^{a}۰/۳ ± ۴۰/۱	^{a}۰/۶ ± ۴۱/۷

-: هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک‌ها دیده نشد

* میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

$^{a-b}$ حروف کوچک لاتین متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$)

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، از میان فیلم‌های طراحی‌شده در این مطالعه فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید حاوی اسانس آویشن شیرازی توان مناسبی برای محدود کردن رشد باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی از خود نشان دادند. علاوه بر این، اثر سینرژیستی ضد باکتریایی بین اسانس آویشن و عصاره برەموم علیه باکتری‌های موردمطالعه ثبت شد. طبیعت آب‌گریزی با آب‌دوستی اجزاء تشکیل‌دهنده فیلم‌های فعال تولیدشده احتمالاً نقش مهمی در توان ضدباکتریایی آن‌ها ایفا کرد، به صورتی که آب‌گریز بودن پلی‌لاکتیک اسید و اسانس آویشن منجر به تولید فیلم‌هایی با توان ضدمیکروبی بالاتر گردید. نتایج مطالعه حاضر در کنار مطالعات مشابه گذشته بیانگر ظرفیت مناسب پلی‌لاکتیک اسید برای استفاده به‌عنوان پلیمر پایه در توسعه فیلم‌های فعال مخصوصاً در ترکیب با اسانس‌های گیاهی است.

منابع

[1] Malhotra, B., Keshwani, A. and Kharkwal H., 2015. Antimicrobial food packaging: Potential and pitfalls. Frontiers in Microbiology, 6:1–9.

[2] Tornuk, F., Hancer, M., Sagdic, O. and Yetim, H., 2015. LLDPE based food packaging incorporated with nanoclays grafted with bioactive compounds to extend shelf life of some meat products. LWT - Food Science and Technology, 64(2):540–6.

[3] Shameli, K., Ahmad, M., Bin, Yunus, W.M., Ibrahim, N.A., Rahman, R.A., Jokar, M. and Darroudi, M.., 2010. Silver / poly (lactic acid) nanocomposites : preparation , characterization , and antibacterial activity. International Journal of Nanomedicine, 5:573–9.

[4] Jamshidian, M., Tehrany, E.A., Imran, M., Jacquot, M. and Desobry, S., 2010. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(5):552–71.

[5] Woraprayote, W., Kingcha, Y., Amonphanpokin, P., Kruenate, J., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2013. Anti-listeria activity of poly(lactic acid)/sawdust particle biocomposite film

impregnated with pediocin PA-1/AcH and its use in raw sliced pork. International journal of food microbiology, 167(2):229–35.

[6] Salmieri, S., Islam, F., Khan, R. a., Hossain, F.M., Ibrahim, H.M.M., Miao, C., Hamad, W.Y. and Lacroix, M., 2014. Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: part A—effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham. Cellulose, 21(3):1837–50.

[7] Javidi, Z., Hosseini, S.F. and Rezaei, M., 2016. Development of flexible bactericidal films based on poly(lactic acid) and essential oil and its effectiveness to reduce microbial growth of refrigerated rainbow trout. LWT . Food Science and Technology, 72:251–60.

[8] Irkin, R. and Esmer, O.K., 2015. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. Journal of Food Science and Technology, 52(10):6095–111.

[9] Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. International journal of food microbiology, 94(3):223–53.

[10] Sajed, H., Sahebkar, A. and Iranshahi, M., 2013. *Zataria Multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)--an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. Journal of ethnopharmacology, 145(3):686–98.

[11] Maurício, J. and Bankova, V., 2011. Propolis : Is there a potential for the development of new drugs . Journal of ethnopharmacology, 133:253–60.

[12] Probst, I., Sforcin, J., Rall, V., Fernandes, A. and Fernandes Júnior, A., 2011. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 17(2):159–67.

[13] Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J. a., Rosalen, P.L. and Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. Journal of ethnopharmacology, 113(2):278–83.

[14] Bryan, J., Redden, P. and Traba, C., 2015. The Mechanism of Action of Russian Propolis Ethanol Extracts Against Two Antibiotic Resistant Biofilm Forming Bacteria. Letters in applied microbiology, 62(2):192–8.

[15] Bodini, R.B., Sobral, P.J.A. and Carvalho, R.A., 2013. Properties of gelatin-based films with added ethanole propolis extract. LWT - Food Science and Technology, 51:104–10.

[16] Abdulkhani. A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S. and Takzare, Z., 2014. Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. Polymer Testing, 35:73–9.

[17] Shavisi ,N., Khanjari, A., Basti, A.A., Misaghi, A. and Shahbazi ,Y., 2017. Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. Meat Science, 124(July 2014):95–104.

[18] Özge Erdohan, Z., Çam, B. and Turhan, K.N., 2013. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. Journal of Food Engineering, 119(2):308–15.

[19] Solano, A.C.V. and de Gante, C.R., 2012. Two Different Processes to Obtain Antimicrobial Packaging Containing Natural Oils. Food and Bioprocess Technology, 5(6):2522–8.

[20] Jin, T., Liu, L., Zhang, H. and Hicks, K., 2009. Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Science and Technology, 44:322–9.

[21] Liu, D., Li, H., Jiang, L., Chuan, Y., Yuan, M. and Chen, H., 2016. Characterization of Active Packaging Films Made from Poly (Lactic Acid)/ Poly (Trimethylene Carbonate). Molecules, 21(6):695.

[22] Tawakkal, I.S.M.A., Cran, M.J. and Bigger, S.W., 2016. Release of thymol from poly(lactic acid)-based antimicrobial films containing kenaf fibres as natural filler. LWT - Food Science and Technology, 66:629–37.

[23] Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., Alipour, M., Razavi ,N.E., Gandomi, H., Noori, N., 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research International, 41(10):1050–7.

[24] Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A. and Esmaeeli, H., 2015. Evaluation of the Antibacterial Activity of Cellulose Nanofibers / Polylactic Acid Composites Coated with Ethanolic Extract of Propolis. Polymer Composites, 38:1–7.

Development of biodegradable antibacterial poly-lactic acid based packaging films with bioactive compounds

M. Rezaeigolestani[1]
A. Khanjari[2]
A. Misaghi[3*]
A. Akhondzadeh Basti[4]
A. Abdulkhani[5]
S. Fayazfar[6]

[1] Ph.D, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

[2] Assistant prof., Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

[3] Associate prof., Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

[4] Professor, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

[5] Associate prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, karaj, Iran

[6] Ph.D. student, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Corresponding author:
amisaghi@ut.ac.ir

Received: 2017/07/11
Accepted: 2017/11/08

Abstract

Biodegradability and antimicrobial activity food packaging materials are among the most important parameters of the modern food packaging industry. For development of poly-lactic acid films to antibacterial compositions, different concentrations of essential oil of *Zataria Multiflora* or propolis ethanolic extract were added to the polymer using the solvent casting method. The antimicrobial activity of the composites was evaluated using disc diffusion method against the four common foodborne pathogens. Our findings showed that the resulting films were effective against all the tested bacteria and the composites containing the essential oil had a good capacity to limit the growth of foodborne pathogenic bacteria. Moreover, the addition of propolis ethanolic extract to films containing the essential oil increased the anti-bacterial properties of the films less than expected, which hydrophilic and hydrophobic nature of films constituents were likely the probable reasons of the results. Based on the results of this study and other similar studies, the biodegradable poly-lactic acid polymer can be considered as a desirable base polymer for development of novel antimicrobial films, especially in combination with herbal antimicrobial agents.

Keywords: poly-lactic acid, packaging film, antimicrobial, food, bioactive agent.