

## طراحی فیلم‌های بسته بندی ضد میکروبی زیست تخریب پذیر بر پایه پلی لاکتیک اسید حاوی ترکیبات زیست فعال

محمدرضا رضایی گلستانی<sup>۱</sup>  
 علی خنجری<sup>۲</sup>  
 علی میثاقی\*<sup>۳</sup>  
 افشین آخوندزاده بستی<sup>۴</sup>  
 علی عبدالخانی<sup>۵</sup>  
 سمیرا فیاض فر<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

<sup>۵</sup> دانشیار گروه علوم صنایع و چوب و کاغذ، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، کرج، ایران

<sup>۶</sup> دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات:

[amisaghi@ut.ac.ir](mailto:amisaghi@ut.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۷

### چکیده

زیست تخریب پذیری و فعالیت ضد میکروبی مواد بسته بندی مواد غذایی از مهم ترین پارامترهای صنایع مدرن بسته بندی مواد غذایی به شمار می آیند. برای توسعه و ارتقاء فیلم های پلی لاکتیک اسید به کامپوزیت های ضد باکتریایی، غلظت های مختلف اسانس آویشن شیرازی و یا عصاره اتانولی بره موم به کمک روش قالب ریزی به پلیمر اضافه گردیدند. فعالیت ضد میکروبی کامپوزیت های حاصل با کمک روش انتشار دیسک علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فیلم های طراحی شده به طور مؤثر علیه همه باکتری های مورد آزمایش عمل کردند و کامپوزیت های حاوی اسانس آویشن شیرازی ظرفیت مناسبی برای محدود کردن رشد باکتری های بیماری زای مواد غذایی از خود به نمایش گذاشتند. همچنین اضافه شدن عصاره بره موم به فیلم های حاوی اسانس آویشن ویژگی های ضد باکتریایی فیلم ها را کمتر از انتظار افزایش داد که احتمالاً طبیعت آب گریزی با آب دوستی اجزاء تشکیل دهنده فیلم های فعال تولید شده نقش مهمی در بروز این نتایج داشته است. بر اساس نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مشابه، پلیمر زیست تخریب پذیر پلی لاکتیک اسید می تواند به عنوان یک پلیمر پایه مطلوب برای طراحی و توسعه فیلم های ضد میکروبی نوین مخصوصاً در ترکیب با اسانس های ضد میکروبی گیاهی مطرح باشد.

**واژگان کلیدی:** پلی لاکتیک اسید، فیلم بسته بندی، ضد میکروبی، مواد غذایی، ترکیب زیست فعال.

### مقدمه

امروزه بسته بندی های ضد میکروبی مواد غذایی به عنوان بخشی از بسته بندی های فعال، می توانند یکی از

بهترین استراتژی های مطرح در کنترل رشد میکروبی در محصولات غذایی باشند. به منظور تولید این دسته از فیلم های بسته بندی، مواد بسته بندی گوناگونی به همراه مواد ضد میکروبی مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته اند [۱].

<sup>1</sup> Active Packaging

می‌شوند که عمده‌ی اثرات بیولوژیکی اسانس‌ها در ارتباط با حضور همین ترکیبات است [۹].

اسانس آویشن شیرازی از مهم‌ترین اسانس‌های گیاهی است که مخصوصاً به واسطه ویژگی‌های ضد میکروبی به خوبی شناخته می‌شود [۱۰]. این گیاه به خانواده نعناعیان تعلق دارد و منبع خوبی از مونوترپن‌ها، به ویژه تیمول و کارواکرول، با ویژگی‌های ضد میکروبی برجسته است [۱۰]. اسانس آویشن شیرازی به عنوان یک افزودنی مواد غذایی، ایمن و سالم شناخته شده و این خصوصیت در کنار ویژگی ابگریزی آن را به گزینه‌ی مناسبی برای استفاده در فیلم‌های بسته بندی ضد میکروبی در ترکیب با مواد پلاستیکی آب‌گریز تبدیل می‌کند.

بره‌موم دیگر ترکیب ضد باکتریایی طبیعی است که توسط زنبور عسل جمع‌آوری شده و در ساختمان کندوها و برای حفاظت از آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱]. فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک مهم‌ترین ترکیبات ضد باکتریایی بره‌موم هستند که در اصل از مشتقات ترکیبات گیاهی هستند [۱۲]. در تحقیقاتی که تاکنون در رابطه با اثرات مختلف بره‌موم انجام شده عمدتاً از عصاره اتانولی آن بهره گرفته شده است [۱۲-۱۴].

با توجه به طعم مشخص، قوی و در برخی اوقات نامطبوع اسانس آویشن شیرازی و بره‌موم، 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 بسته بندی است. با در نظر گرفتن موارد فوق‌الذکر، هدف از مطالعه حاضر طراحی و تولید فیلم بسته بندی کاملاً زیست تخریب پذیر بر پایه پلی لاکتیک اسید در ترکیب با دو ترکیب ضد میکروبی طبیعی اسانس آویشن و یا عصاره اتانولی بره‌موم به وسیله روش قالب‌گیری و ارزیابی اثرات ضد باکتریایی کامپوزیت‌های حاصل علیه چهار پاتوژن رایج غذازاد به وسیله روش انتشار دیسک بوده است.

## مواد و روش‌ها

### مواد

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

در این میان، پلاستیک‌های زیست تخریب‌ناپذیر با منشأ ترکیبات نفتی (مانند پلی اتیلن، پلی پروپیلن و پلی آمید) مهم‌ترین ترکیبات بسته بندی مواد غذایی هستند که در بسته بندی‌های فعال و ضد میکروب نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲]. با توجه به مقاومت این دسته از ترکیبات به تخریب میکروبی-شیمیایی، افزایش تولید و مصرف آن‌ها به معضل جدی زیست محیطی تبدیل شده است. برای جایگزینی این دسته از مواد پلاستیکی ترکیبات زیست تخریب پذیر مختلفی توسعه پیدا کرده‌اند که از میان آن‌ها پلی لاکتیک اسید رایج‌ترین پلیمر بسته بندی به شمار می‌آید. پلیمر پلی لاکتیک اسید یکی از مهم‌ترین ترکیبات بیولوژیکی است که به دلیل خصوصاتی مانند زیست تخریب پذیری، قیمت مناسب، زیست سازگاری، شفافیت بالا و خصوصیات برتر مکانیکی و گرمایی (در مقایسه با سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر مهم)، برای کاربرد در بسته بندی‌های مواد غذایی مطرح است [۳]. این پلیمر از منابع ۱۰۰٪ تجدیدپذیر مانند ذرت و چغندر قند و به دنبال تخمیر نشاسته و تراکم لاکتیک اسید به دست می‌آید. پلی لاکتیک اسید در صنایع مختلفی از جمله وسایل پزشکی (مانند ایمپلنت و نخ بخیه) و بسته بندی‌های مواد غذایی کاربرد دارد و با پلی استایرن در بسیاری از بسته بندی‌های کاربردی مواد غذایی رقابت می‌کند [۴].

اخیراً فیلم‌های ضد میکروبی بر پایه پلی لاکتیک اسید و به کمک ترکیبات ضد میکروبی طبیعی و سنتزی با موفقیت طراحی شده‌اند [۵-۷]. به دلایلی که پیش تر ذکر شد پلی لاکتیک اسید می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای طراحی فیلم‌های بسته بندی ضد میکروبی مواد غذایی مطرح باشد و مورد استفاده قرار گیرد.

از میان مواد گوناگون ضد میکروبی رایج، ترکیبات ضد میکروبی طبیعی دارای ظرفیت ارزشمندی برای استفاده به عنوان مواد نگهدارنده مواد غذایی هستند و تاکنون انواع مختلفی از آن‌ها به مواد بسته بندی مواد غذایی اضافه شده‌اند [۸]. اسانس‌های گیاهی گروهی از ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی مهمی هستند که علیه هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و منفی اثر گذارند. درصد بالایی از ترپن‌ها و فنل‌ها در اسانس‌های گیاهی یافت

شد تا عصاره اتانولی به دست آمد. در نهایت 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 برهموم (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 هم‌وزن گردید. انتخاب غلظت مواد مؤثره در محلول کلروفورم 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. در نهایت نیز تمامی فیلم‌ها درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل تا زمان تست قرار گرفتند.

وزن مولکولی ۱۹۷۰۰۰ گرم بر مول تهیه شدند. نمونه‌های خام برهموم و گیاه آویشن شیرازی از شرکت پاکان بذر (اصفهان) تأمین شدند. محیط کشت‌های مورد استفاده از شرکت Quelab (کانادا) و سایر معرف‌ها و حلال‌ها با درجه کیفیت آزمایشگاهی بوده و بدون هیچ‌گونه خالص‌سازی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام مراحل مختلف مطالعه از دستگاه هموژنایزر (مدل IKA T۲۵-digital شرکت Itra turraxU، آلمان) و کالیپر دیجیتال (با دقت  $\pm 2$  میلی‌متر، Fisher Scientific) بهره گرفته شد.

### روش‌ها

#### استخراج اسانس آویشن و عصاره اتانولی برهموم

قسمت‌های هوایی خشک‌شده گیاه آویشن شیرازی به‌خوبی خرد 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<sup>۱</sup> عبارت بودند از ۴۶/۴٪ کارواکرول، ۲۳/۶۱٪ تیمول، ۱۶/۳۷٪ پی‌سایمن و ۳/۳۲٪ آلفا پینن.

عصاره اتانولی برهموم بر اساس روش معرفی‌شده در مطالعه Bodini و همکاران (۲۰۱۳) و با کمی تغییرات تهیه شد [۱۵]. به‌طور خلاصه، ۳۰ گرم از نمونه‌های برهموم 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

<sup>1</sup>Gas Chromatography/Mass Spectrometry

جدول ۱- ترکیب محلول‌های پلی لاکتیک اسید و قطر فیلم‌های تولیدی<sup>۱</sup>

نمونه	میزان پلی لاکتیک اسید	میزان اسانس آویشن	میزان عصاره برهموم	قطر فیلم‌ها (میلی‌متر) <sup>۲</sup>
فیلم شماره ۱	۱	۰	۰	$0.06 \pm 0.02$
فیلم شماره ۲	۱	۱/۵	۰	$0.08 \pm 0.03$
فیلم شماره ۳	۱	۱/۵	۲	$0.11 \pm 0.03$

<sup>۱</sup> میزان ترکیبات بر اساس درصد حجم به حجم در محلول گزارش شده است.

<sup>۲</sup> میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار

### تهیه میزان تلقیح باکتری

اثرات ضد باکتریایی فیلم‌های تهیه شده 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) 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 گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد (۶ ساعت برای ویبریو پاراهمولیتیکوس) از سوسپانسیون حاصل در داخل کووت استریل به میزانی ریخته شد تا تراکم باکتریایی  $1 \times 10^8$  واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 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 تهیه شده در مرحله قبل

روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) قرار داده شد که از قبل ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی (حاوی تراکم باکتریایی  $1 \times 10^7$  واحد تشکیل‌دهنده کلنی) به آن اضافه و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده بود. قطر هاله‌ی عدم رشد تشکیل شده در اطراف دیسک‌ها به وسیله کالیپر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و ثبت شد. فیلم پلی لاکتیک اسید خالص به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و در مورد هر فیلم سه تکرار صورت پذیرفت.

### تحلیل آماری

آنالیز آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS (نسخه شماره ۱۶ برای ویندوز، شیکاگو، آمریکا) انجام شد. برای مقایسه‌ی داده‌ها از ANOVA<sup>۳</sup> یک‌طرفه به همراه آزمون Tukey استفاده شد و از لحاظ 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 مورد مطالعه با روش انتشار دیسک را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است به‌جز فیلم خالص پلی لاکتیک اسید که هیچ فعالیت ضدباکتری نشان نداد، تمامی فیلم‌های فعال توانستند در اطراف خود در تمامی کشت‌ها هاله‌ی عدم رشد ایجاد کنند. بیشترین اثرات ضد میکروبی مربوط به دیسک فیلم شماره ۳ حاوی

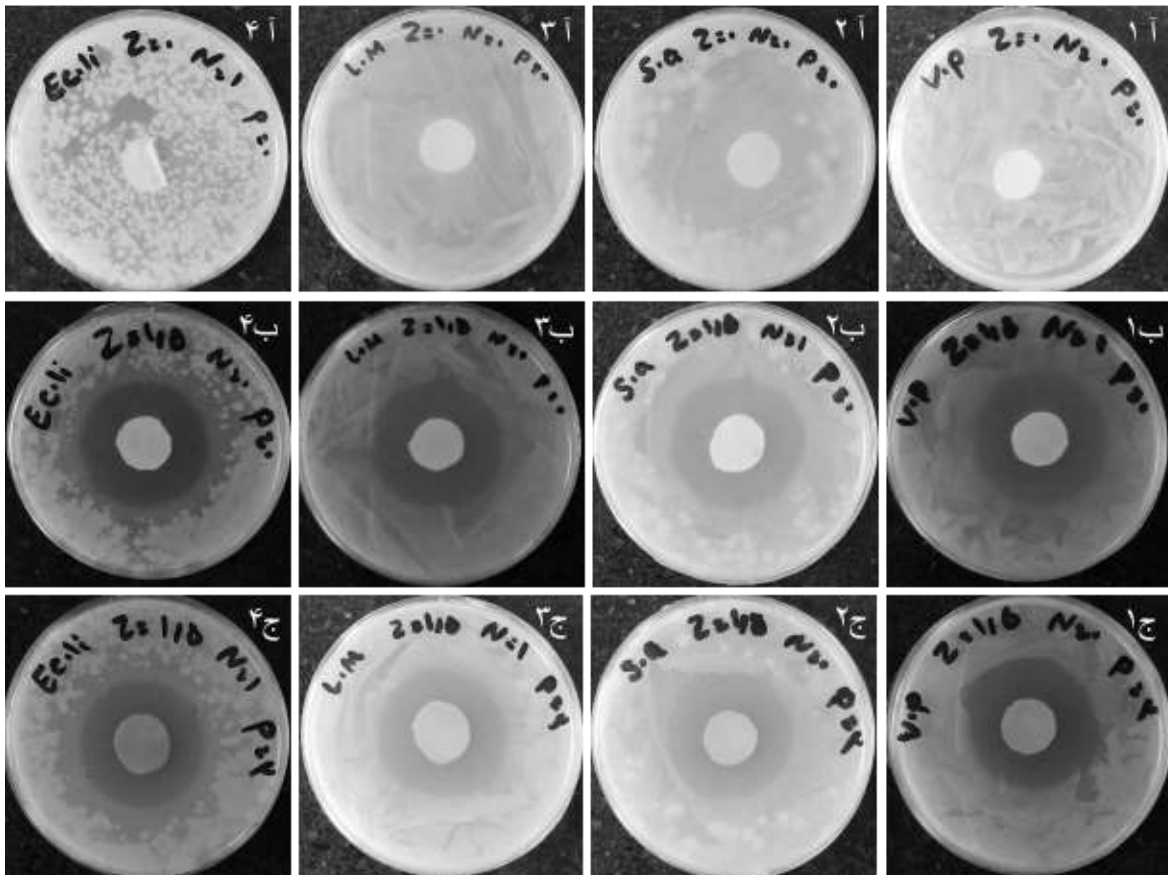
<sup>۲</sup> Muller Hinton Agar

<sup>۳</sup> Analysis of Variance

<sup>۱</sup> Brain Heart Infusion

اسانس آویشن را در تمامی کشت‌ها (به استثناء 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 ایجاد شده توسط فیلم‌های فعال علیه باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه را نمایش می‌دهد.

هر دو ترکیب اسانس آویشن و عصاره بره‌موم 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. در واقع اضافه کردن عصاره اتانولی بره‌موم به صورت معنی‌داری اثرات ضد میکروبی فیلم حاوی



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 مورد مطالعه (شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب مربوط به باکتری‌های *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *اشرشیا کلی*)

شیمیایی ترکیب ضد میکروبی و پلیمر اصلی، ترکیب مواد تشکیل‌دهنده 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

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 به وسیله 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 ضد میکروبی فیلم‌های فعال به عوامل مختلفی از جمله نوع و خصوصیات فیزیکی

عصاره در مقایسه با فیلم حاوی اسانس خالص را می‌توان به آب‌دوست بودن عصاره بره‌موم 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) مورد بررسی 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 مورد مطالعه 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 مورد مطالعه، 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 در نتیجه افزایش نفوذپذیری غشا و آزادسازی محتویات سلولی را در پی دارد [۲۳].

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

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 از لحاظ فنی انجام‌شدنی است و نتایج آزمون ضد میکروبی در این مطالعه نیز با این پدیده مطابقت داشت. در تحقیقات گذشته فعالیت ضدباکتریایی بره‌موم و عصاره‌ی اتانولی آن به‌صورت گسترده گزارش شده است و در تمامی آن مطالعات فلاونوئیدها، استرها و آروماتیک‌ها به‌عنوان اجزاء اصلی ضد میکروبی بره‌موم گزارش شده‌اند که رشد بسیاری از گونه‌های باکتریایی را در شرایط مختلف مهار کرده‌اند [۱۲، ۱۴].

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

ترکیب پلی‌لاکتیک اسید با مواد ضد میکروبی آب‌دوست در مطالعات پیشین مورد بررسی 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. در واقع آن‌ها اشاره نمودند که فیلم‌های آب‌گریز پلی‌لاکتیک 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 پلانٹاروم 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. در نتیجه افزایش کمتر از انتظار فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی اسانس و

را افزایش دادند. در واقع این نوع از اثرات سینرژیستی برای ترکیب عصاره اتانولی برهموم با اسانس زنجبیل و میخک هم گزارش شده است [۱۲].

از جمله کافیک اسید، بنزیل سینامات، سینامیل سینامات و متیل سینامات است [۲۴]. اجزاء فعال مذکور که در ترکیب شیمیایی عصاره برهموم نیز حضور داشتند، به همراه ترکیبات اسانس آویشن قدرت ضدباکتریایی فیلم‌ها

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

قطر هاله عدم رشد*				
نمونه فیلم	استافیلوکوکوس اریوس	اشرشیا کلی	ویبریو پاراهمولیتیکوس	لیستریا مونوسایتوزنز
فیلم شماره ۱	-	-	-	-
فیلم شماره ۲	$b_{1/2} \pm 42/1$	$b_{0/2} \pm 36/2$	$b_{0/7} \pm 39/0$	$a_{0/5} \pm 41/7$
فیلم شماره ۳	$a_{0/4} \pm 43/0$	$a_{0/5} \pm 37/6$	$a_{0/3} \pm 40/1$	$a_{0/6} \pm 41/7$

-: هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک‌ها دیده نشد

\* میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار

<sup>a-b</sup> حروف کوچک لاتین متفاوت در یک ستون نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار است ( $P < 0.05$ )

تولیدشده احتمالاً نقش مهمی در توان ضدباکتریایی آن‌ها ایفا کرد، به صورتی که آب‌گریز بودن پلی لاکتیک اسید و اسانس آویشن منجر به تولید فیلم‌هایی با توان ضد میکروبی بالاتر گردید. نتایج مطالعه حاضر در کنار مطالعات مشابه گذشته بیانگر ظرفیت مناسب پلی لاکتیک اسید برای استفاده به‌عنوان پلیمر پایه در توسعه فیلم‌های فعال مخصوصاً در ترکیب با اسانس‌های گیاهی است.

## نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، از میان فیلم‌های طراحی‌شده در این مطالعه فیلم‌های پلی لاکتیک 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 برهموم علیه باکتری‌های مورد مطالعه ثبت شد. طبیعت آب‌گریزی با آب‌دوستی اجزاء تشکیل‌دهنده فیلم‌های فعال

## 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] Shamel, 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., Tehrani, 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., Krueante, 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 ethanol 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

### 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 antibacterial 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.

M. Rezaeigolestani<sup>1</sup>  
A. Khanjari<sup>2</sup>  
A. Misaghi<sup>3\*</sup>  
A. Akhondzadeh Basti<sup>4</sup>  
A. Abdulkhani<sup>5</sup>  
S. Fayazfar<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Ph.D, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant prof., Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate prof., Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Associate prof., Department of wood and paper science and technology, Faculty of natural resources, University of Tehran, karaj, Iran

<sup>6</sup> Ph.D. student, Department of food hygiene, Faculty of veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Corresponding author:  
[amisaghi@ut.ac.ir](mailto:amisaghi@ut.ac.ir)

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