(مقاله پژوهشی)

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانوذرات نقره‌سنتزی با عصاره‌گیاه نعناع

بهاره حاجی رستملو[1*]، راحله ژیانی[2]، فاطمه امارلو[2]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور ، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.
۲-گروه شیمی، واحد نیشابور ، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران..

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۱

چکیده

با توجه به مشکلات زیست محیطی و اهمیت آن، امروزه استفاده از فیلم های نانو کامپوزیتی زیست تخریب پذیر از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در این پژوهش نانو ذرات نقره با استفاده از عصاره آبی گیاه نعناع سنتز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانو ذره نقره بیوسنتز شده به روش سبز با استفاده از قابلیت جذب رادیکال های ۱،۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل و فعالیت ضدمیکروبی به روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، مورد بررسی قرار گرفت. ساختار یکنواخت و کروی این نانو ذرات توسط دستگاه میکروسکوپ‌الکترونی‌روبشی و عبوری مشخص شد. همچنین اثر ضدمیکروبی فیلم های نانو کامپوزیتی بر پایه نشاسته، همراه با این نانو ذرات به وسیله آزمون نفوذ دیسک و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی نانو ذرات توسط سه باکتری *اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد نانوذرات نقره بیشترین جذب را در ۴۳۰ نانومتر نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آنها بین ۱۵ تا ۳۷nm بودند. نانو ذره نقره تولید شده به عنوان مهارکننده رادیکال DPPH(IC_{50} =170 µ M) عمل کردند. حداقل غلظت مهاری رشد و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ۳/۱ و ۶/۲ بالاترین میزان حداقل غلظت مهار کنندگی را نشان داد. همچنین با اندازه گیری قطر ناحیه روشن بوسیله آزمون نفوذ دیسک نشاسته خالص خاصیت ضدمیکروبی ندارد ولی با افزودن ۲۵۰ppm نانو ذره نقره به فیلم نشاسته در حضور باکتری هاله‌ای با قطر cm ۲/۰۵ تشکیل میشود و در واقع با افزودن نانو ذره خاصیت ضد میکروبی در فیلم نشاسته شکل میگیرد و باز با رساندن مقدار نانو ذره نقره به ۵۰۰ppm در فیلم قطر هاله به ۲/۳۵cm افزایش میابد که نشان دهنده افزایش خاصیت ضد میکروبی است. فیلم های زیست تخریب پذیر بر پایه نشاسته همراه با نانو ذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضدمیکروبی علیه همه میکروب های آزمون شده نشان داد ($p<0/05$).

واژه های کلیدی: بسته بندی، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروب، نعناع، نانو ذرات نقره.

*مسؤل مکاتبات:rostamlo_b214@yahoo.com

۱-مقدمه

ایمنی مواد غذایی یک نگرانی اساسی برای مصرف کنندگان صنایع غذایی است (Deng et al., 2012 and 2013). لازم است به موقع عوامل ضدمیکروبی جدیدی برای تولید و بسته بندی مواد غذایی ایمن ایجاد شود. این امر منجر به کاهش بروز بیماری‌های ناشی از غذا می‌شود(Myszka et al., 2019). در صنایع غذایی فیلم‌های پلیمر نظیر پلی اتیلن، پلی استایرن، پلی پروپیلن، پلی ونیل‌کلراید و غیره به دلیل ویژگی مطلوبشان مانند شفافیت، نرمی، سبکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما اثرات منفی زیست محیطی زیادی در بردارد که ناشی از عدم تجزیه‌پذیری و سوزاندن این ترکیبات در محیط باعث ایجاد ترکیبات سمی برای انسان و محیط زیست از جمله بی فنیل‌ها پلی کربناته، دیوکسین ها، منومرهایی مانند فوران‌ها و استایرن و دارای محدودیت‌های بهداشتی استفاده مجدد، معضل عمده ای برای آن ها محسوب می شود (Motedayen et al., 2013 and Bastioli et al., 2005). با افزایش نگرانی‌های زیست محیطی در رابطه با افزایش تجمع پلاستیک‌ها و تقاضای مصرف‌کنندگان برای مواد غذایی سالم با زمان ماندگاری بالا، به همین دلیل صنایع بسته بندی طی دو دهه اخیر توجه بسیاری به بیوپلیمرها و فیلم های خوراکی داشته است (Lopez-Rubio et al., 2004). بیوپلیمرها ترکیبات زیست تخریب پذیری هستد که دارای خصوصیات نظیر سازگاری با محیط زیست، امکان تولید از ضایعات و تجزیه پذیری را دارا می باشد(Osés et al., 2009). بین انواع مختلف پلیمرها زیست تخریب پذیر نشاسته به دلیل ارزان بودن، وفور در طبیعت و قابلیت ترموپلاست شدن، بیشترین پتانسیل برای کاربرد در بسته بندی مواد غذایی را دارا می باشد(Frone et al., 2015). فیلم‌های خوراکی حاصل از بیوپلیمرها به صورت لایه پوشش نازکی روی سطح بسته بندی موادغذایی قرار گرفته و تغییرات میکروبی، شیمیایی و فیزیکی را کنترل می‌کند (Debeaufort et al., 1998). همچنین به عنوان حامل بسیاری از افزودنی‌ها نظیر ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی عمل می کنند (Shen and Kamdem, 2015). فیلم‌های خوراکی لایه‌های نازک از پیش ساخته شده هستند که بر روی یا بین ترکیبات ماده‌ی غذایی قرار می‌گیرند، در حالی که پوشش‌های خوراکی لایه‌های نازک از مواد خوراکی هستند که میتوانند به طور مستقیم با غوطه‌ورسازی، اسپری کردن و آغشته کردن بر روی محصولات غذایی شکل بگیرند (Šuput et al., 2015). عملکرد محافظتی فیلم‌های خوراکی جلوگیری از فرایند اکسیداسیون، جذب و دفع رطوبت، آلودگی و رشد میکروب و تغییرات حسی است. فیلم‌های خوراکی میتوانند کیفیت، امنیت، پایداری و کنترل خواص مکانیکی غذاها را با بهبود ممانعت نفوذپذیری به بخار آب، اکسیژن، کربن دی‌اکسید بین غذا و محیط اطراف افزایش دهند(Valencia-Chamorro et al., 2011). ترکیبات طبیعی زیادی مانند اسانس ها و عصاره ها ی گیاهی وجود دارند که به فیلم‌های خوراکی اضافه می‌شوند و اثرات ضد میکروبی‌وآنتی‌اکسیدانی‌برجامی گذارد (Genskowsky et al., 2015). کامپوزیت ترکیبی از مواد متفاوت و مختلف در ساختاروشکل است که اجزای تشکیل دهنده آن باهم ممزوج نمی‌شوند. همچنین نانوکامپوزیت دسته‌ای از کامپوزیت هستند که یک جزء آن در مقیاس نانو است(Dadfar et al., 2011). نانو کامپوزیت که دارای نانو ذرات نقره هستند جایگزین بسیار مناسبی برای پلیمرهای معمول در صنایع بسته بندی است (De Azeredo, 2009). در مطالعه ای که بر روی نانو ذرات بیوسنتز شده توسط گیاهان میخک قرنفلی و سنبل شرقی انجام شد، از روش کمی لومینسانس برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات نقره استفاده شد. نانو ذرات نقره نسبت به عصاره گیاهان مورد مطالعه به تنهایی، درجات آنتی‌اکسیدانی بالاتری را از خود نشان داد. هرچه اندازه نانو ذرات نقره کوچکتر باشد فعالیت

آنتی‌اکسیدانی بهتری دارد (Bunghez et al., 2012). در مطالعه دیگری خواص آنتی‌اکسیدانی نانوذرات طلا و نقره سنتز شده از عصاره میوه زردآلو مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنتی اکسیدانی به غلظت نانوذرات وابسته بود که طی آزمایشات حذف رادیکال‌های DPPH مشاهده شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره نسبت به نانوذرات طلا بیشتر بود و با افزایش غلظت نانوذرات فعالیت آنتی اکسیدانی هر دو نانوذره نیز افزایش یافت(Dauthal and Mukhopadhyay, 2013). در مطالعه ای نانو کامپوزیت زیستی از کیتوزان و نشاسته و نانو نقره مورد مطالعه قرا گرفت. در این مطالعه حداقل غلظت مهارکننده برای نانو ذرات نقره و نفوذ دیسک برای‌سه‌گونه‌باکتری‌استافیلوکوکوس‌اورئوس، باسیلوس سرنوس و اشرشیا کلی بررسی شد. با افزودن نانو ذرات نقره به فیلم نشاسته و کیتوزان و با افزایش نانو ذرات نقره خصوصیات ضد میکروبی آن ها افزایش یافت (Yoksan and Chirachanchai, 2010). امروزه بسته بندی مواد غذایی که دارای خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی داشته باشد ضروری به نظر می رسد از این رو در این تحقیق به بررسی ویژگی نانو کامپوزیت ساخته شده برپایه نشاسته و نانو ذرات نقره بیوسنتز شده همراه با عصاره گیاه نعناع و مقایسه اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن پرداخته شده است.

۲-مواد و روش ها

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان، با خلوص بالا ۹۸درصد خریداری شدند. میکرو ارگانیسم های مورد استفاده شامل *E. coli* (PTCC 43895), *S.aureus* (PTCC 25923), *L. monocytogenes* (PTCC 7644), از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

۲-۱-آماده سازی عصاره گیاه نعناع

گیاه نعناع از شهرستان کاشمر واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. همچنین‌گیاه مورد نظر در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد با نام علمی *Mentha* مورد تایید قرار گرفت. برگ گیاه نعناع پس از شستشو، به دور از نور خورشید در درجه حرارت اتاق خشک شد. جهت عصاره گیری بخش های خشک شده پودر گردید و از روش سوکسله استفاده شد. سپس عصاره برگ گیاه نعناع صاف شد و برای حذف کامل ذرات معلق موجود در عصاره، گیاه مورد نظر به مدت ده دقیقه‌سانتریفیوژ شد(Mallikarjuna et al., 2011).

۲-۲- بیوسنتز نانو ذرات نقره

برای بیوسنتز نانو ذرات نقره به روش سبز، ۲ میلی‌لیتر از عصاره گیاه مورد نظر را به ۴ میلی لیتر از محلول ۱ میلی مولار نیترات نقره اضافه شد که تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به قهوه ای تیره نشان دهنده تولید و نانو ذرات نقره بود. این فرآیند در دمای ۴۰ درجه‌سانتی گراد و در pH =۷ انجام شد (Jegadeeswaran et al., 2012).

۲-۳-ساخت فیلم نشاسته

برای ساخت این نوع فیلم ۴ گرم نشاسته را در ۱۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل و دما آن را تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش و بمدت ده دقیقه در دما ۹۰ درجه سانتی‌گراد به وسیله همزن مغناطیسی همزده شد تا محلول ۴٪ نشاسته ساخته شود. سپس۳۰ میلی‌لیتر از عصاره گیاه نعناع و ۲۵ میلی لیتر از محلول های ساخته شده در پلیت ریخته شد و پلیت را در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت یک روز در آون قرار گرفت. سپس فیلم ها به آسانی از پلیت جدا شد و برای انجام آزمون ضد میکروبی نگهداری شدند. مقدار نانو ذرات نقره بیوسنتز شده در فیلم ها به صورت انتخابی از مقادیر ppm ۲۵۰ و ۵۰۰ در فیلم ها مورد استفاده قرار گرفت.

۲-٤-بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH[1]

آزمایش مورد نظر با کمی تغییرات در روش جانسونا و همکاران انجام شد(Johnson et al., 2014). ۰/۵ میلی‌لیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) را دراتانول ۹۵ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر محلول نانو ذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی نعناع مخلوط و محلول حاصله را در دمای ۳۸درجه‌سانتی‌گراد و به مدت ۳۲ دقیقه درتاریکی قرارگرفت. جذب نمونه ها درطول موج ۵۱۸ نانومتر بود. به منظور مقایسه فعالیت نانو ذرات نقره تولید شده ازعصاره‌برگ‌گیاه نعناع از ترکیب استاندارد، گلوتاتیون احیاء(GSH[2]) به عنوان یک آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. برای تعیین مقدارIC_{50} (غلظت مورد نیاز برای‌مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، نانو ذرات نقره‌تولیدشده از عصاره برگ نعناع و ترکیب استاندارد، آزمایش در پنج غلظت مختلف از محلول نانو ذرات مورد نظر و استاندارد گلوتاتیون صورت گرفت. هر آزمایش در سه نوبت انجام شد و مقادیر میانگین ملاک محاسبات قرارگرفت. همچنین درصد فعالیت رادیکال زدایی از طریق رابطه ذیل محاسبه شد:

$$\text{درصد جذب رادیکال} = \frac{\text{جذب واکنش} - \text{جذب بلانک}}{\text{جذب بلانک}} \times ۱۰۰$$

دراین رابطه، جذب بلانک، نشان دهنده جذب محلول شاهد است که حاوی ۰/۵میلی لیترمحلول DPPH ۰/۱ میلی مولار و۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد به جای محلول نانوذرات‌نقره است وجذب واکنش،نشان دهنده جذب محلول محتوای نمونه نانو ذرات نقره است.

۲-۵-روش سنجش آنتی باکتریال

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی گیاه نعناع پس از تخلیص و حلال زدایی محلول عصاره مورد نظر، از آن غلظت های مختلف۱۰۰، ۲۵، ۵۰، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر با حلال ۵ درصدDMSO[3] تهیه گردید و محلول‌های حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[4](MIC) در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرو براث دایلوشن انجام شد. به طورخلاصه ابتدا از محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره حاوی نانو ذرات نقره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شدند. در آخر به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، میزان کدورت که نشان دهنده رشد باکتری است، بوسیله دستگاه الایزاریدر تعیین شد و مطابق تعریف، غلظت رقیق ترین چاهکی که هیچ کدورتی در آن مشاهده نشد، معادل حداقل غلظت مهار کنندگی در نظر گرفته شد. از محلول عصاره تنها نیز به عنوان شاهد استفاده شد. به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی[5](MBC)، همه چاهک های فاقد کدورت جداگانه بر محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند. پس از ۲ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره حاوی نانو ذرات نقره که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین این سه بار تکرار ارائه گردیده است(Veerasamy et al., 2011).

۲-٦-آزمون نفوذ دیسک

هرکدام از باکتری اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز را روی محیط کشت آگار نوترینت[6] کشت خطی داده شدند. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، کشت

1- di(phenyl)-(246-trinitrophenyl)iminoazanium
2-Glutathione

3- Dimethyl sulfoxide
4- Minimum Inhibition Concentration
5 - Minimum Bactericidal Concentration
6- Nutrient Agar

داده شد. سه‌کلونی که شکل یکسانی داشتند و به خوبی ایزوله شده بودند را با استفاده از سواب استریل، به لوله های حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی انتقال داده شد. به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج nm ۶۲۵ کدورت سوسپانسیون‌ها مورد بررسی قرار گرفت در صورتی که شفافیت سوسپانسیون ها در حد نیم مک فارلند باشد، جمعیتی در حدود $۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml از هر میکروب درون محلول های سوسپانسیون وجود دارد، با استفاده از سواب استریل، از هر کدام از لوله های حاوی سوسپانسیون بالا، روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد، به طوری که تمام سطح پلیت به سوسپانسیون آغشته شد. فیلم های تولید شده در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. دیسک ها در شرایط استریل روی مرکز محیط کشت مولر هینتون ۳آگار قرار داده شدند. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. قطر هاله های تشکیل‌شده به عنوان شاخص میزان فعالیت ضدمیکروبی فیلم ها در نظر گرفته شد و در مواردی که هاله ای تشکیل‌نشده، فعالیت ضدمیکروبی وجود ندارد. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری‌ها بر روی سطح پلیت، یک پلیت کشت داده شده فاقد فیلم در نظر گرفته شد. همچنین یک پلیت فاقد باکتری برای اطمینان از عدم آلودگی محیط های کشت استفاده شد.

۲-۷-روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

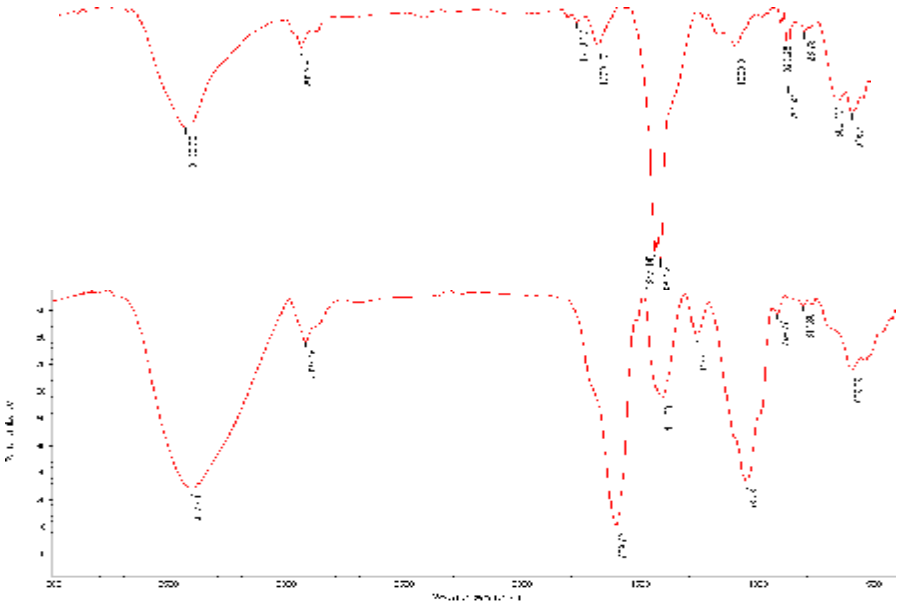
برای بررسی فعالیت ضد میکروبی، از نرم افزار SPSS و همچنین آزمون آنالیز واریانس یک طرفه oneway ANOVA استفاده شده است. سطح اطمینان ٪۵ برای محاسبات به کار رفته است.

۳- نتایج

آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز به منظور شناسایی گروه‌های عملکردی که مسئول محدود کردن و تثبیت نانوذرات نقره هستند استفاده شد و این‌آنالیز در مفیدترین ناحیه زیرقرمز بین $۵۰۰cm^{-1}$ و ۴۰۰۰ انجام شد. نتیجه طیفی نشان داده شده در شکل۱، قسمت الف مربوط به نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره می باشد در حالی‌که شکل ۱ قسمت ب عصاره نعناع معمولی را نشان می دهد. پیک گسترده در $۳۴۱۲ cm^{-1}$ می تواند به علت پیوند OH باشد (شکل ۱، ب). وجود پیک در $۱۶۳۷ cm^{-1}$ به علت پیوند C=O درگروه کربونیل باشد. همچنین این مولکول‌های زیستی به عنوان گروه‌های تثبیت کننده‌احتمالی که‌به‌تشکیل‌نانو ساختارهای یون نقره کمک می کردند، شناسایی شدند و در طیف سنجی مادون قرمز نشان داده شده است (شکل۱). مقایسه دو طیف نشان از کاهش شدت پیک CO در طیف نانو ذرات (شکل۱، الف) نسبت به cm^{-1} ۱۶۰۹ در قسمت ب دارد که نشان می دهد تثبیت سیستم ممکن است ناشی از اتصال گروه کربونیل قندها احیا کننده به نقره باشد.

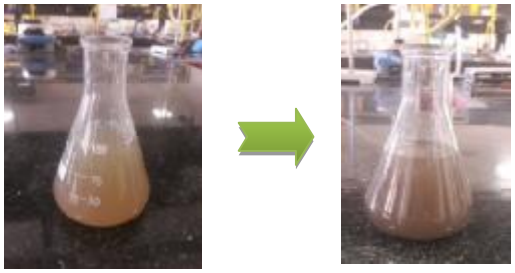
الف

ب



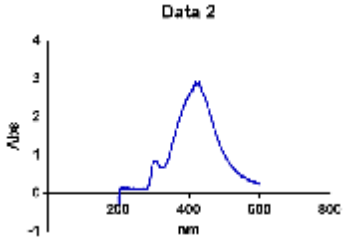
شکل ۱- طیف مادون قرمز الف) نانو ذرات نقره بیوسنتزشده با استفاده از عصاره برگ نعناع، ب) عصاره برگ نعناع

دربیوسنتزنانوذرات‌نقره‌گیاه‌نعناع‌نقش‌احیا و پایدارکننده را ایفامی‌کند. شکل ۲ تغییر رنگ محلول نانو ذرات نقره را نشان می‌دهد .یکی از شاخص‌های واضح از نشکیل نانو ذرات نقره در محیط این است که پس از واکنش با یون نقره رنگ قهوه ای تیره ای ظاهر می شود.

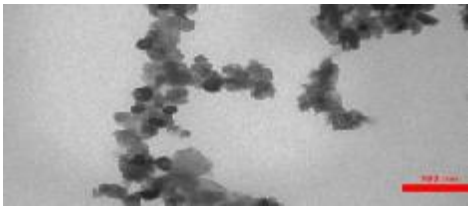


شکل۲-تغییر رنگ محلول نیترات نقره در حضور عصاره آبی برگ نعناع

همان‌طور که در شکل۳ مشهود است، طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش- مرئی در طول موج ۴۳۰ نانومترظاهرشده،که‌مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده می باشد.

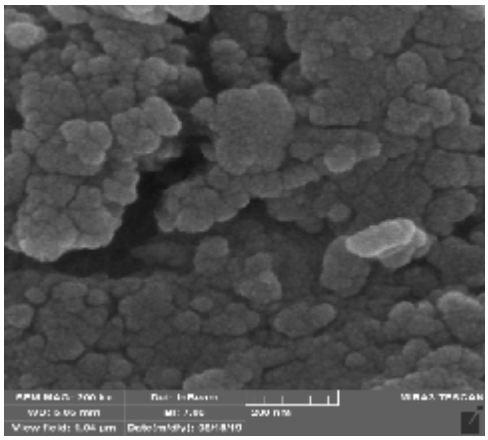


شکل ۳- طیف UV-Vis نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ نعناع



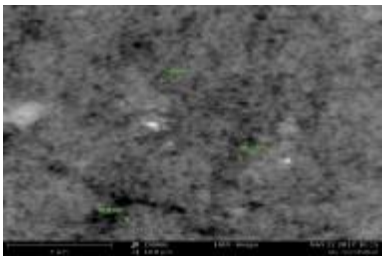
شکل٤- عکس تهیه شده از نانو ذرات نقره بیوسنتز شده باعصاره آبی برگ نعناع توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری

شکل۴ نشان‌دهنده تصویرمیکروسکوپ‌الکترونی عبوری نانو ذرات نقره است که حاکی از ساختار نسبتا کروی ذرات نقره است. همچنین توزیع شکل و اندازه نانو ذرات نقره سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی‌بررسی‌شد. شکل۵تصویرمیکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات‌نقره سنتز شده را نشان می دهد. تصویر نشان می دهد که نانو ذرات بدست آمده همگی تقریباً کروی و اندازه متوسط آن ها بین ۱۵ تا ۳۷ نانومتر است.



شکل۵- عکس تهیه شده از نانو ذرات نقره بیوسنتز شده باعصاره آبی برگ نعناع توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی

در شکل۶ تصاویر SEM[1] فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده مشاهده میشود. همانطور که از این تصویر مشخص است، نانو ذرات با غلظت ۲ درصد وزنی به طور یکنواخت در بستر پلیمر قرار گرفتند و نمای سطحی نمونه صاف و همگن بود.

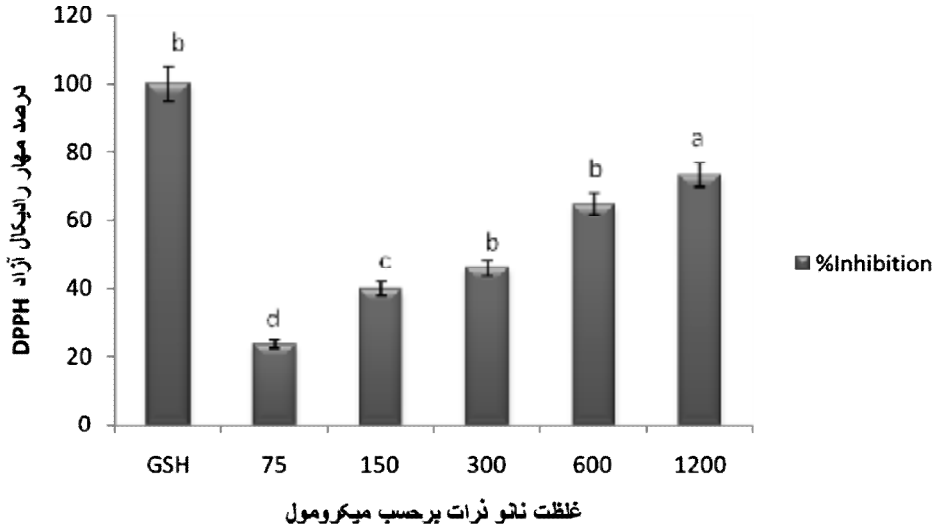


شکل ٦- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از سطح نانو کامپوزیت نقره بیوسنتز شده

1- Scanning Electron Microscope

در شکل۷ فعالیت جذب رادیکال های DPPH توسط نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ گیاه نعناع بررسی شد، با افزایش‌غلظت نانوذره حذف رادیکال‌هایDPPH افزایش یافت. همان‌طور که مشاهده می‌شود در حدود۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد در غلظت ۴۶ میکرومول نانو ذره مهار می شوند.

برخی‌گیاهان از جمله نعناع طی روش سبز دارای توانایی آماده‌سازی نانو ذرات نقره آنتی‌اکسیدانت جدید می‌باشند (داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار گزارش‌شده و گلوتاتیون به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است).



شکل۷-فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه نعناع

در این پژوهش پس از بیوسنتز نانو ذرات نقره، فعالیت ضدمیکروبی نانو ذرات تولیدی در برابر پاتوژن های مورد نظر بررسی‌گردید. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است. حداقل غلظت مهار کنندگی نانو ذرات نقره بیوسنتز شده و بعد از آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی برای هر یک از نمونه‌ها بررسی گردید. بنابراین نانو ذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضد میکروبی خوبی را در مقابل باکتری *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* داد. بعد از اینکه خاصیت ضد میکروبی نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره گیاه نعناع مورد بررسی قرار گرفت، در مرحله آخر خواص ضدمیکروبی این کامپوزیت همراه با نانو ذرات نقره بیوسنتزشده توسط روش آزمون نفوذ دیسک مورد بررسی قرار گرفت.

جدول۱-مقادیر MIC و MBC نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره گیاه نعناع در برابر سه نوع پاتوژن مواد غذایی

باکتری	MIC(میلی گرم بر میلی لیتر)	MBC(میلی گرم برمیلی لیتر)
Escherichia coli	۳/۱±۰/۰۷	۶/۲±۰/۰۱
Listeria monocytogenes	۶/۲±۰/۰۱	۶/۲±۰/۰۱
Staphylococcus aureus	۳/۱±۰/۰۷	۶/۲±۰/۰۱

جدول ۲- قطر هاله (cm) برای فیلم های نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع بر حسب (ppm)

غلظت نانو ذرات بیوسنتز شده (ppm)	*Escherichia coli*	*Listeria monocytogenes*	*Staphylococcus aureus*
۰	۰±۰^{d}	۰±۰^{e}	۰±۰^{e}
۲۵۰	۱/۹۵±۰/۱٤^{b}	۱/۸۳±۰/۰۵^{b}	۲/۰۵±۰/۱۰^{cb}
۵۰۰	۲/۲۵±۰/۱۰^{a}	۲/۱٦±۰/۰۷^{a}	۲/۳۲±۰/۱٤^{ab}

*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری در سطح ۹۵٪ بین نمونه ها می باشد.

در جدول۲ قطر هاله های به دست آمده از تست نفوذ دیسک برای فیلم‌های نانو کامپوزیتی مورد بررسی قرار گرفت که فیلم‌های ساخته شده از نشاسته خالص در این تست خاصیت ضدمیکروبی نداشتند ولی با افزودن عصاره‌گیاهو نانو ذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره برگ گیاه نعناع به فیلم ها محدوده شفاف زیر فیلم و همچنین ناحیه مهاری شفافی در اطراف فیلم مشاهده شد و با افزایش مقدار نانو ذرات نقره بیوسنتز شده قطر هاله افزایش یافت. نتایج نشان دهنده این است که نانو ذرات بیوسنتز شده نقره با عصاره آبی برگ گیاه نعناع دارای فعالیت آنتی میکروبی علیه سه پاتوژن تست شده است. نانو ذرات نقره مورد استفاده شده در این تحقیق با استفاده از روش بالا به پایین تهیه‌گردید که در این روش با استفاده از یک‌سری ابزارها، مواد از جسم حجیم جداشده و جسم‌کوچک می‌شود تا به اندازه‌های نانومتری برسد و همانطور که در قسمت یافته‌ها ملاحظه شد تایید سنتز نانوذرات توسط آزمون اسپکتروفوتومتر UV-Visible(شکل ۳)انجام گردید، تصاویرتهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (شکل۶)، پراکندگی یکنواخت نانو ذرات نقره در سطح فیلم‌های تهیه شده را مشخص کردند. آزمون میکروبی انجام شده همان طور که در جدول۲ ملاحظه میشود، نشان داد که فیلم‌های ساخته شده از نشاسته خالص خاصیت ضد میکروبی نداشتند و در محدوده زیر فیلم میکروب‌ها رشدکردند. با اضافه کردن نانو ذرات به فیلم ها علاوه بر محدوده شفاف زیر فیلم ناحیه مهاری شفافی در اطراف فیلم مشاهده شد. با افزودن مقدار نانو نقره در تمام نمونه‌ها قطر هاله به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که نانو ذره نقره دارای فعالیت آنتی میکروبیال علیه همه میکروب‌های تست شده است. به عنوان مثال در نمونه نشاسته خالص در پلیت حاوی *اشرشیا کلی* هیچ‌گونه هاله‌ای در اطراف فیلم نشاسته شکل نگرفت که نشان میدهد نشاسته خالص خاصیت ضدمیکروبی ندارد ولی با افزودن ۲۵۰ppm نانو ذره نقره به فیلم نشاسته هاله‌ای با قطر۱/۹۵cm تشکیل می‌شود و در واقع با افزودن نانو ذره خاصیت ضدمیکروبی در فیلم نشاسته شکل می‌گیرد و باز با رساندن مقدار نانو ذره نقره به ppm ۵۰۰ در فیلم قطر هاله به ۲/۲۵cm افزایش می‌یابد که نشان دهنده افزایش معنی‌دار خاصیت ضد میکروبی است. با توجه به جدول ۲ فیلم نشاسته همراه با ppm ۵۰۰ نانو ذره بهترین هاله عدم رشد را به ترتیب در مورد *S. aureus* و *monocytogenes L.* از خود نشان دادند. بنابراین آزمون میکروبی به روشنی مشخص کرد که فیلم‌های دارای نانو ذره نقره دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند و با افزایش در مقدار نانو ذره نقره خاصیت ضد میکروبی افزایش یافت. علت میکروب‌کشی نانو نقره را میتوان این چنین تفسیر کرد که بار مثبت روی نقره به میکروب‌کشی کمک کرده و همچنین رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در سطح نانو ذرات باعث آسیب‌رسانی به غشای باکتری میشود. به‌علاوه تشکیل حفره در دیواره سلولی باکتری‌ها و تجمع نانو ذرات نقره در غشای

باکتریایی سبب نفوذپذیری و در نتیجه مرگ سلولی میشود. یوکسان[1] و همکاران نیز نتایج مشابهی با پژوهش حاضر گزارش کردند، در این پژوهش با استفاده از روش agar diffusion disc از سه باکتری *B cereus* و *E. coli, S. aureus* استفاده شد. فیلم نشاسته شاهد هیچ‌گونه هاله عدم رشدی از خود نشان نداد با اضافه شدن مقدار نانو ذره نقره قطر هاله تشکیل شده،افزایش یافت(Yoksan andChirachanchai, 2010). در تحقیقی از طباطبایی و همکاران در تولید پوشش خوراکی ضد میکروبی بر پایه موسیلاژ دانه بارهنگ در ترکیب با اسانس گلپر، بیشترین تاثیر اسانس‌گلپر بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و در غلظت mg/ml ۱۶گزارش شد. هم‌چنین، کم‌ترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌ها ی گرم منفی (*سودوموناس ائروژینوزا و اشرشیاکلی*) در غلظت های مختلف اسانس گلپر بود (یزدی و همکاران، ۱۳۹۶). نانو ذرات نقره‌ای که با روش سبز تولید می‌شوند به علت عدم به کارگیری مواد شیمیایی خطرناک پتانسیل این را دارند تا در صنایع مرتبط با سلامت انسان مانند بهداشت و درمان مورد استفاده قرار گیرند و نیز نانو ذرات نقره حاصله با استفاده از عصاره گیاه نعناع دارای اثرات مهاری خوبی بر روی باکترهای گرم منفی و مثبت بود.

٤-نتیجه گیری

نتایج نشان داد که عصاره برگ نعناع پتانسیل بالایی برای تولید نانو ذرات نقره دارد. طبق نتایج حاصل نانو ذره نقره سنتز شده به عنوان مهارکننده رادیکال DPPH(IC_{50} =170 µM) عمل کرد و فعالیت ضدمیکروبی بالای نانو ذرات بیوسنتز شده از عصاره آبی نعناع نیز در این تحقیق به اثبات رسید، به طور کلی نتایج حاصل نشانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی مناسب نانوذرات بیوسنتز شده بود. افزودن نانو ذرات بیوسنتز شده همراه با عصاره گیاه نعناع در فیلم‌سبب‌ایجاد خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی، در برابر باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* و گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس* اورئوس شد. به طور کلی، خصوصیات فیلم های ساخته شده در این مطالعه کاملاً متأثر از میزان نانو ذرات سنتزی مورد استفاده است و در مجموع موجب بهبود خواص ضدمیکروبی فیلم‌ها گردید. همچنین می‌توان از فیلم‌های حاصل بدلیل خاصیت ضدمیکروبی خوبی که دارد در بسته بندی انواع مختلف مواد غذایی استفاده نمود. بنابراین شناخت درست و کامل خصوصیات فیلم ها و انتخاب بیوپلیمر مناسب در صنایع بسته بندی با توجه به خصوصیات موادغذایی مختلف ضروری است.

٥-سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت های معنوی ومالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

٦-منابع

۱. طباطبایی یزدی، ف.، علیزاده بهبهانی، ب.، وسیعی، ع.، روشنک، س. ۱۳۹٦. تولید پوشش خوراکی ضد میکروبی بر پایه موسیلاژ دانه بارهنگ کبیر در ترکیب با اسانس گلپر: بررسی ویژگی‌ها و کاربرد آن در گوشت گاو نگهداری شده در دمای یخچال. *میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی*, شماره۳ .

2. Bastioli, C., Rapra Technology, L. 2005. *Handbook of biodegradable polymers*. Bunghez, I., Barbinta Patrascu, M., Badea, N., Doncea, S., Popescu, A. and Ion, R. 2012. Antioxidant silver nanoparticles green synthesized using ornamental plants. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 14(11): 1016.
3. Dadfar, S. A., Alemzadeh, I., Dadfar, S. R., Vosoughi, M. 2011. Studies on the oxygen barrier and mechanical properties of low density polyethylene/organoclay

1 -Yoksan

11. Jegadeeswaran, P., Shivaraj, R., Venckatesh, R. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles from extract of Padina tetrastromatica leaf. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3): 991-998.
12. Johnson, A., Obot, I., Ukpong, U. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using Artemisia annua and Sida acuta leaves extract and their antimicrobial, antioxidant and corrosion inhibition potentials. *J. Mater. Environ. Sci*, 5(3): 899-906.
13. Lopez-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., Gavara, R. 2004. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*, 20(4): 357-387.
14. Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, G., Praveen, B., Shreedhar, B., Lakshmi, C.S., Reddy, B., Raju, B.D.P. 2011. Green synthesis of silver nanoparticles using Ocimum leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1): 181-186.
15. Motedayen, A. A., Khodaiyan, F., Salehi, E. A. 2013. Development and characterisation of composite films made of kefiran and starch. *Food chemistry*, 136(3-4): 1231-1238
16. Myszka, K., Leja, K., Majcher, M. 2019. A current opinion on the antimicrobial importance of popular pepper essential oil and its application in food industry. *Journal of Essential Oil Research*, 31(1): 1-18.
17. Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S. A., Cruz-Orea, A., and Maté, J.I. 2009. Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*, 92(1): 56-62.
18. Shen, Z., Kamdem, D.P. 2015. Development and characterization of biodegradable chitosan films nanocomposite films in the presence of ethylene vinyl acetate copolymer as a new type of compatibilizer. *Materials and Design*, 32(4): 1806-1813.
4. Dauthal, P., Mukhopadhyay, M. 2013. In-vitro free radical scavenging activity of biosynthesized gold and silver nanoparticles using Prunus armeniaca (apricot) fruit extract. *Journal of nanoparticle research*, 15(1): 1-11.
5. De Azeredo, H. M. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food research international*, 42(9): 1240-1253.
6. Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., Voilley, A. 1998. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in food science*, 38(4): 299-313.
7. Deng, X., Chai, L., Yang, Z., Tang, C., Tong, H., Yuan, P. 2012. Bioleaching of heavy metals from a contaminated soil using indigenous Penicillium chrysogenum strain F1. *Journal of hazardous materials*, 233: 25-32.
8. Deng, X., Chai, L., Yang, Z., Tang, C., Wang, Y., Shi, Y. 2013. Bioleaching mechanism of heavy metals in the mixture of contaminated soil and slag by using indigenous Penicillium chrysogenum strain F1. *Journal of hazardous materials*, 248: 107-114.
9. Frone, A. N., Nicolae, C. A., Gabor, R. A., Panaitescu, D.M. 2015. Thermal properties of water-resistant starch–polyvinyl alcohol films modified with cellulose nanofibers. *Polymer degradation and stability*, 121: 385-397.
10. Genskowsky, E., Puente, L., Pérez-Álvarez, J., Fernandez-Lopez, J., Muñoz, L., and Viuda-Martos, M. 2015. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (Aristotelia chilensis). *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): 1057-1062.

containing two essential oils. *International journal of biological macromolecules*, 74: 289-296.

19. Šuput, D.Z., Lazić, V. L., Popović, S. Z., Hromiš, N. M. 2015. Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research*, 42(1): 11-22.
20. Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., Del Río, M. A., and Perez-Gago, M. B. 2011. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(9): 872-900
21. Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F.W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N., and Dhanaraj, S. A. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of saudi chemical society*, 15(2): 113-120.
22. Yoksan, R., Chirachanchai, S. 2010. Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch based films: fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: C*, 30(6): 891-897.

(Original Research Paper)

Investigation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Nanocomposite Films Containing Synthesis of Silver Nanoparticles with Mentha extract

Bahareh Haji Rostamloo[1*], Raheleh Zhiani[2], Fatemeh Amarloo[2]

1-Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.
2-Department of Chemistry, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

Received:29/10/2020 Accepted:11/03/2021

Abstract

Today, due to its environmental problems and importance, the use of biodegradable nanocomposite films is of particular importance. In this study, silver nanoparticles were synthesized by means of aqueous extract of *Mentha* and the adsorption capacity of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals and their antimicrobial activity should investigated by the method of determination of minimum inhibitory concentration. The uniformity and shape were structure of these nanoparticles was determined by scanning electron microscopy. The antimicrobial effect of starch-based nanocomposite films, together with these nanoparticles, was investigated by disk diffusion test and determination of minimum inhibitory concentration of nanoparticles by three *Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes.* The results showed that silver nanoparticles showed the highest absorption at 430 nm and had a spherical shape and their average size was between 15-37 nm. The silver nanoparticles produced acted as DPPH radical inhibitors (IC_{50} = 170 µ M). The minimum growth inhibitory concentration and the minimum lethal concentration on *Staphylococcus aureus* showed 3.1 and 6.2 showed the highest minimum inhibitory concentration. Also, by measuring the diameter of the bright area by the disk penetration test, pure starch does not have antimicrobial properties, but by adding 250 ppm silver nanoparticles to the starch film in the presence of bacteria, a halo with a diameter of 2.55 cm is formed and in fact by adding nanoparticles antimicrobial properties Starch is formed in the film and again increases the diameter of the halo to 2.35 cm in the film by bringing the amount of silver nanoparticles to 500 ppm, which indicates an increase in antimicrobial properties. Starch-based biodegradable films with biosynthesized silver nanoparticles showed antimicrobial effect against all tested microbes ($p < 0.05$).

Keywords: Packing, Antimicrobial, Antioxidant, Antimicrobial, *Mentha* , Silver Nanoparticles.

[*] Corresponding Author: rostamlo_b214@yahoo.com