www.nm.iau-shahrood.ac.ir
نانومواد: ۴۲:۱۲ (۱۳۹۹) ۹۲-۸۳

مقاله پژوهشی

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و خاصیت ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز جهت بسته‌بندی مواد غذایی

علیرضا متولی‌زاده کاخکی*، فاطمه امارلو و راحله ژیانی

گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۸/۰۹/۲۱، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۸/۱۰/۲۲، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۸/۱۲/۲۰

چکیده

در این پژوهش، نانوذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه مرزنجوش سنتز شد. فعالیت آنتی اکسیدانی نانوذره نقره تولید شده با استفاده از قابلیت جذب رادیکال‌های ۱، ۱-دیفنیل-۲-پیکریل-هیدرازیل مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات نقره بیشترین جذب را در ۴۳۰ nm نشان دادند و دارای شکل کروی و میانگین اندازه آنها بین ۳۵ تا ۵۰ nm بودند. نانوذره نقره تولید شده به عنوان مهارکننده رادیکال DPPH(IC_{50} = ۱۷۰ µM) عمل کردند. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۳/۱۳ و ۶/۲۵، اشرشیا کلی ۳/۱۳ و ۶/۲۵ و لیستریا مونوسایتوژنز ۳/۱۳ و ۶/۲۵ اندازه‌گیری شد. باکتری *Listeria monocytogenes* بالاترین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان داد. نتایج حاصل نشانگر فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی مناسب نانوذرات بیوسنتز شده بودند. همچنین اثر ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی ساخته شده از نشاسته، همراه با نانوذرات نقره بیوسنتز شده جهت استفاده در صنایع بسته‌بندی مواد غذایی با اندازه‌گیری قطر ناحیه روشن بوسیله آزمون نفوذ دیسک مورد بررسی قرار گرفت. فیلم‌های زیست‌تخریب‌پذیر بر پایه نشاسته همراه با نانوذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضدمیکروبی علیه همه میکروب‌های تست شده نشان داد ($p<۰/۰۵$).

***واژه‌های کلیدی:* بسته‌بندی، ضدمیکروبی، گیاه مرزنجوش، نانوذرات نقره.**

۱- مقدمه

امروزه مواد غذایی گاهی ممکن است بین تولید و مصرف مدت‌ها فاصله بیفتد. به همین دلیل راه‌های موثری برای حفظ کیفیت بهداشتی مواد غذایی باید در نظر گرفته شود [۱]. بسته‌بندی مواد غذایی راهی برای افزایش کیفیت و ایمنی غذایی همچنین به تاخیر انداختن فساد، حفظ اثرات مثبت فرآیند روی غذا و افزایش طول عمر انبارمانی است. یکی از نقش‌های مهم بسته‌بندی حفاظت از غذا در برابر عوامل فیزیکوشیمیایی و بیولوژیک بیرونی را به عهده دارد [۲].

* **عهده‌دار مکاتبات:** علیرضا متولی‌زاده کاخکی
نشانی: گروه شیمی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور
تلفن: ۰۵۱-۱۴۲۶۱۵۴۷۲، **دورنگار:** ۰۵۱-۱۴۲۶۱۵۴۷۲، **پست الکترونیکی:** amotavalizadeh@yahoo.com

بسته‌بندی ضدمیکروبی به منظور کنترل رشد میکروبی در محصولات مواد غذایی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. مواد ضدمیکروبی استفاده شده در بسته‌بندی، علاوه بر افزایش فاز تاخیر میکروارگانیسم باعث کاهش فاز رشد آن‌ها می‌شود و زمان نگهداری محصول را که ضمن حفظ کیفیت و ایمنی غذایی هست را افزایش دهند [۳]. اجزای اصلی فیلم‌سازی شامل پلیمرها با وزن مولکولی بالا، حلال و نرم کننده‌ها است. تولید فیلم مستلزم وجود دست کم یک ترکیب پلیمری است که قادر به ایجاد ساختار شبکه‌ای با پیوستگی و استحکام کافی باشد [۴]. معمولا نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از نانوذرات فلزی، اکسید فلزها، نیمه فلز یا خاک رس در فیلم‌های پلیمری به عنوان بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شوند [۵،۶].

بیوپلیمرها ترکیب‌های زیست‌تخریب‌پذیر هستند که کیفیت مواد غذایی را افزایش می‌دهند و در نهایت در محیط باقی نمی‌مانند. زیرا به سادگی توسط موجودات زنده به ریز واحدهای سازنده خود تجزیه می‌شوند [۷]. از بین انواع مختلف پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر می‌توان به نشاسته اشاره کرد که دارای بیشترین پتانسیل در صنایع بسته است [۸].

کامپوزیت یا مواد مرکب ترکیبی از مواد متفاوت و مختلف در ساختار و شکل می‌باشد که اجزای تشکیل دهنده آن‌ها هویت خودشان را حفظ می‌کنند. نانوکامپوزیت‌ها دسته خاصی از کامپوزیت‌ها هستند و حداقل یک جزء آن در مقیاس نانو باشد [۹]. استفاده از نانوکامپوزیت‌های دارای نانوذرات نقره جایگزین بسیار مناسبی برای پلیمرهای مورد استفاده در صنعت غذا است که توانایی افزایش عمر نگهداری محصولات تازه غذایی مختلف و همچنین کاهش شدت فرآیند در محصولات فرآیند شده است [۱۰].

اخیرا نانوذرات نقره به روش سبز تولید می‌شوند. در این روش از بسترهای گیاهی برای سنتز این نانوذرات استفاده می‌شود که سازگار با محیط زیست می‌باشند. معمولا نانوذرات نقره که از روش سبز تولید می‌شوند دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضد قارچ بهتری در برابر میکروارگانیسم‌ها هستند [۱۳-۱۱]. علاوه بر این گیاهان منبع فراهم کننده مواد فعال زیستی ارزشمند هستند که به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی برای حفظ و بهبود کیفیت بسته‌بندی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. آنتی اکسیدان های طبیعی از گیاهان به شکل عصاره بدست می‌آیند. این عصاره ها سرشار از ترکیبات فنولی بوده و جایگزین خوبی برای آنتی اکسیدان‌های مصنوعی می‌باشد [۱۴].

در مطالعه‌ای که توسط بانگز و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی نانوذرات بیوسنتز شده توسط گیاهان سنبل شرقی، میخک و قرنفلی انجام شد، از روش کمی لومینسانس برای بررسی خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات نقره استفاده شد. نانوذرات نقره نسبت به عصاره گیاهان مورد مطالعه به تنهایی، درجات آنتی اکسیدانی بالاتری را از خود نشان داد. هر چه اندازه نانوذرات نقره کوچکتر باشد فعالیت آنتی اکسیدانی بهتری دارد [۱۵].

در مطالعه دیگری دالات و همکاران در سال ۲۰۱۳ خواص آنتی اکسیدانی 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 [۱۶].

پاندیت و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی فعالیت ضدمیکروبی ناسیین و نقره بر روی گونه‌های استافیلوکوکو اورئوس، لیستریا، سودوموناس فلورسنس، موفیلیفورم فوزاریوم و قارچ اسپرژیلوس پرداختند. نتایج حاکی از آن بود که خاصیت آنتی باکتریالی ناسیین به همراه نانوذرات نقره بطور چشمگیری افزایش می‌یابد [۱۷].

یوکسان و همکاران در سال ۲۰۱۰ نانوکامپوزیت زیستی از کیتوزان و نشاسته و نانونقره مورد مطالعه قرا گرفت. در این مطالعه حداقل غلظت مهار کننده برای نانوذرات نقره و نفوذ دیسک برای سه گونه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس،

باسیلوس سرنوس و اشرشیا کلی بررسی شد. با افزودن نانوذرات نقره به فیلم نشاسته و کیتوزان و با افزایش نانوذرات نقره خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها افزایش یافت [۱۸].

سرکار و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی نانوتکنولوژی در فرآیندهای غذایی و بسته‌بندی مواد غذایی پرداختند و اعلام نمودند که نانوذرات بطور کلی می‌تواند بر روی عوامل مانند ویتامین‌های محلول در چربی، طعم دهنده‌ها، آنتی اکسیدان‌ها تاثیر گذاشته و آنها را کنترل نمایند، همچنین در این بررسی نشان داده شد نانوسنسورها می‌توانند مواد سمی را در غذا تشخیص داده و در بسته‌بندی مواد غذایی این نانوذرات می‌توانند مواد تشکیل دهنده مانند ویتامین‌ها و مواد ضدمیکروبی را حفظ نمایند [۱۹]. کوزوموتا و همکاران در سال ۲۰۱۵ بسته‌بندی نانوکامپوزیت دی اکسید تیتانیوم/نقره تهیه شده به روش محلول‌سازی را جهت افزایش ماندگاری نان مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه آزمایشات شیمیایی و میکروبیولوژی بر روی نان مانند میزان چربی، پروتئین، شکر و همچنین مهار رشد مخمرها، کپک‌ها، باسیلوس، سوتیلیس، باسیلوس سرئوس برای ۶ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوکامپوزیت دی اکسید تیتانیوم/نقره با بستر پلی اتیلن به صورت قابل توجهی زمان ماندگاری نان را افزایش داده و میکروبیولوژی نان با این کامپوزیت بالا رفته است [۲۰،۲۱].

کادام و همکاران در سال ۲۰۱۹ نانوذرات نقره توسط گیاه سیاه دانه سنتز کردند. دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار خوبی بود نانوذرات نقره توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار دادند اندازه نانوذرات ۸ نانومتر بود. علاوه بر این اثر ضدباکتریایی آن را بر روی فیلم کیتوزان بررسی کردند که با توجه به غلظت نانوذرات نقره فعالیت ضدباکتریایی متغیر بود مشاهدات آن‌ها نشان داد که نانوذرات نقره در بهبود بسته‌بندی تجزیه‌پذیر بسیار کاربرد دارد [۲۲].

امروزه بسته‌بندی مواد غذایی که دارای خاصیت ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد از این رو در این تحقیق به بررسی ویژگی نانوکامپوزیت ساخته شده بر پایه نشاسته و نانوذرات نقره بیوسنتز شده همراه با عصاره گیاه مرزنجوش و مقایسه اثر آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن پرداخته شده است.

۲- فعالیت‌های تجربی

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان، با خلوص بالا خریداری شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده شامل انواع باکتری‌های E.coli (ATCC25923)، S.aureus (ATCC43895) و L.*monocytogenes* (ATCC7644) از از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

۲-۱- آماده‌سازی عصاره گیاه مرزنجوش

گیاه مرزنجوش از شهرستان کاشمر واقع در استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. همچنین گیاه مورد نظر در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد با نام علمی *Origanum vulgare* مورد تایید قرار گرفت. برگ گیاه مرزنجوش پس از شستشو، به دور از نور خورشید در درجه حرارت اتاق خشک شد. جهت عصاره‌گیری بخش‌های خشک شده پودر گردید و از روش سوکسله استفاده شد. سپس عصاره برگ گیاه مرزنجوش صاف شد و برای حذف کامل ذرات معلق موجود در عصاره، گیاه مورد نظر به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد [۲۳].

۲-۲- بیوسنتز نانوذرات نقره

برای بیوسنتز نانوذرات نقره به روش سبز، ۲ mL از عصاره گیاه مورد نظر را به ۴ mL از محلول ۱ میلی‌مولار نیترات نقره اضافه شد که شاهد تغییر رنگ محلول از زرد کمرنگ به قهوه‌ای تیره بودیم که نشان‌دهنده تولید و نانوذرات نقره بود. این فرآیند در دمای ۴۰ °C و در pH =۷ انجام شد [۲۴]. علاوه بر سنجش اثر آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی نانوذرات نقره بیوسنتز شده، اثر مقدار نانوذرات نقره بیوسنتز شده در فیلم‌ها مورد بررسی قرار گرفت و به صورت انتخابی از

مقادیر ppm ۲۵۰ و ۵۰۰ نانوذرات نقره بیوسنتز شده در فیلم‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- ساخت فیلم نشاسته

برای ساخت این نوع فیلم ۴ گرم نشاسته را در mL ۱۰۰ آب دوبار تقطیر حل و دما آن را تا °C ۹۰ افزایش و به مدت ده دقیقه در دما °C۹۰ بوسیله همزن مغناطیسی همزده شد تا محلول ۴٪ نشاسته ساخته شود. سپس mL ۳۰ از عصاره گیاه مرزنجوش mL ۲۵ از محلول‌های ساخته شده در پلیت ریخته شد و پلیت را در دمای °C ۵۰ به مدت یک روز تا خشک شدن کامل در آون قرار گرفت. سپس فیلم‌ها به آسانی از پلیت جدا شد و برای انجام آزمون ضد میکروبی نگهداری شدند. مقدار نانوذرات نقره بیوسنتز شده در فیلم‌ها به صورت انتخابی از مقادیر ppm ۲۵۰ و ۵۰۰ در فیلم‌ها مورد استفاده قرار گرفت [۲۵].

۲-٤- بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH

آزمایش مورد نظر با کمی تغییرات در روش جانسونا و همکاران انجام شد [۲۶]. mL ۰/۵ محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) را دراتانول ۹۵٪ و µL ۱۰۰ محلول نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره آبی مرزنجوش مخلوط و محلول حاصله را در دمای °C ۳۸ و به مدت ۳۲ دقیقه در تاریکی قرارگرفت. جذب نمونه‌ها درطول موج nm ۵۱۸ بود. به منظور مقایسه فعالیت نانوذرات نقره تولید شده از عصاره برگ گیاه مرزنجوش از ترکیب استاندارد فرم احیاءگلوتاتیون (GSH) به عنوان یک آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شد. برای تعیین مقدار IC_{50} (غلظت مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی)، نانوذرات نقره تولید شده از عصاره برگ مرزنجوش و ترکیب استاندارد، آزمایش در پنج غلظت مختلف از محلول نانوذرات مورد نظر و استاندارد فرم احیاءگلوتاتیون صورت گرفت. هر آزمایش در سه نوبت انجام شد و مقادیر میانگین ملاک محاسبات قرارگرفت. همچنین درصد فعالیت رادیکال‌زدایی از طریق معادله ۱ محاسبه شد:

$$\text{درصد جذب رادیکال} = \frac{\text{جذب واکنش - جذب بلانک}}{\text{جذب بلانک}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

در این رابطه، جذب بلانک، نشان‌دهنده جذب محلول شاهد است که حاوی mL ۰/۵ محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار و µL ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ به جای محلول نانوذرات نقره است و جذب واکنش، نشان‌دهنده جذب محلول محتوای نمونه نانوذرات نقره است.

۲-۵- روش سنجش خاصیت آنتی باکتریال

جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی گیاه مرزنجوش پس از تخلیص و حلال‌زدایی محلول عصاره مورد نظر، از آن غلظت‌های مختلف µg/ml ۱۰۰، ۲۵، ۵۰، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۳ و ۱/۵۶ با حلال ۵ درصد Dimethyl sulfoxide (DMSO) تهیه گردید و محلول‌های حاصل در دمای °C ۴ نگهداری شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در پلیت ۹۶ خانه استریل و با روش میکرو براث دایلوشن انجام شد. بطور خلاصه ابتدا از محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر داخل ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد؛ سپس به اولین چاهک هر ردیف µL ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره حاوی نانوذرات نقره اضافه گردید و از خانه دوم به سوم به همین ترتیب تا خانه نهم رقیق شدند. در آخر به همه چاهک‌ها µL ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده معادل لوله نیم مک فارلند اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای °C ۳۷، میزان کدورت که نشان دهنده رشد باکتری است، بوسیله دستگاه الایزاریدر تعیین شد و مطابق تعریف، غلظت آخرین (رقیق‌ترین) چاهکی که هیچ

کـدورتی در آن مشـاهده نشـد، معـادل حـداقل غلظـت مهارکنندگی در نظر گرفته شد. از محلول عصاره تنها نیـز بـه عنوان شـاهد اسـتفاده شـد. بـه منظـور تعیـین حـداقل غلظـت کشندگی (MBC)، همه چاهک‌های فاقد کـدورت جداگانـه بـر محـیط مـولر هینتـون آگـار کشـت داده شـدند. پـس از ۲ ساعت، کمترین غلظتی از عصاره حـاوی نـانوذرات نقـره کـه بـاکتری در آن رشـد نکـرده بـود بـه عنـوان حـداقل غلظـت کشندگی گزارش شد. آزمایشات ۳ بار تکرار شده و نتایج به صورت میانگین این سه بار تکرار ارائه گردیده است [۲۷].

۲-٦- آزمون نفوذ دیسک

هر کدام از میکـروب‌هـای یـاد شـده را روی محـیط کشـت Nutrient Agar کشت خطی داده شدند. پلیـت‌هـا در دمـای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت، کشت داده شد. سه تا پنج کلونی که شکل یکسانی داشتند و به خوبی ایزوله شده بودنـد را بـا استفاده از سـواب اسـتریل، بـه لولـه‌هـای حـاوی ۵ ml سـرم فیزیولوژی انتقال داده شد. به کمک اسپکتروفتومتر در طـول موج ۶۲۵ nm کدورت سوسپانسیون هـا مـورد بررسـی قـرار گرفت در صورتی که شفافیت سوسپانسـیون‌هـا در حـد نـیم مک فارلند باشد، جمعیتی در حدود ۱۰۸×۵/۱ cfu/ml از هر میکـروب درون محلـول‌هـای سوسپانسـیون وجـود دارد، بـا استفاده از سواب اسـتریل، از هـر کـدام از لولـه‌هـای حـاوی سوسپانسیون بالا، روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت سـطحی داده شـد، بـه طـوری کـه تمـام سـطح پلیـت بـه سوسپانسیون آغشته شـد. فـیلم‌هـای تولیـد شـده بـه صـورت دیسک‌هایی با قطر ۱/۵ cm برش داده شدند و در اتوکلاو بـه مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C استریل شد. دیسـک‌هـا در شرایط استریل روی مرکز محیط کشت مولر هینتون ۳ آگـار قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C بـه مـدت ۲۴ ساعت در انکوبه شدند. قطر هاله‌های تشکیل شده بـه عنـوان شاخص میزان فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌ها در نظر گرفته شـد و در مواردی که هاله‌ای تشکیل نشده بود یعنی فعالیت ضدمیکروبی وجود نداشت. برای اطمینان از رشد یکنواخت باکتری ها بر روی سطح پلیت، یک پلیت کشـت داده شـده فاقد فیلم در نظر گرفته شد. همچنین یک پلیت فاقد بـاکتری برای اطمینان از عدم آلودگی محیط‌های کشت استفاده شـد [۲۵].

۲-۷- روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

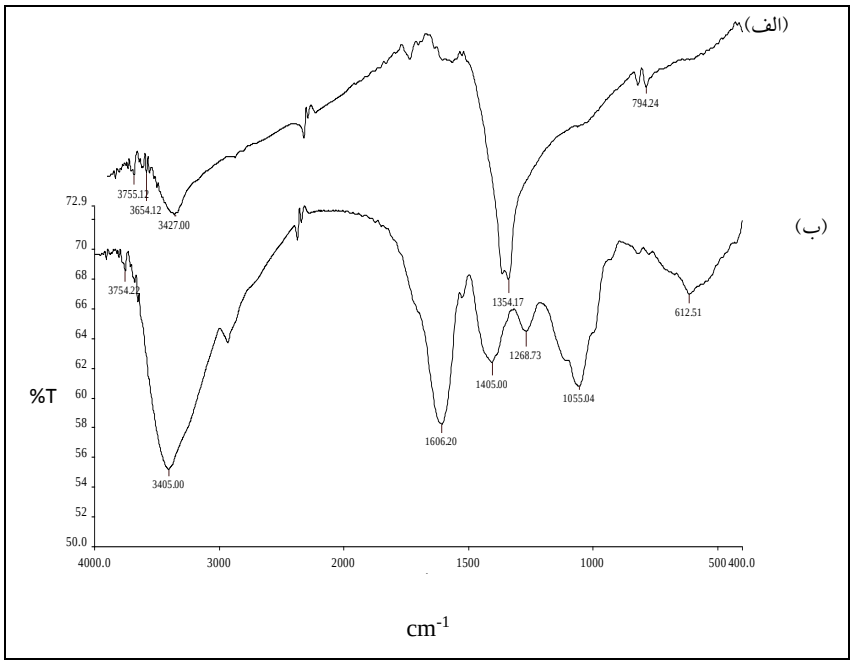
برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی نمونه‌ها، از نرم‌افـزار SOSS و همچنـین آزمـون آنـالیز آمـاری واریـانس یـک طرفـه one way ANOVA اسـتفاده شـده اسـت. سـپس مقایسـه میانگین‌ها با روش حداقل تفاوت معنی‌دار صـورت پـذیرفت. سطح اطمینان ۵٪ برای محاسبات بکار رفته است.

۳- نتایج و بحث

در بیوسنتز نانوذرات نقره گیاه مرزنجوش نقش احیـا و پایـدار کننده را ایفا می‌کند. شکل ۱ تغییـر رنـگ محلـول نـانوذرات نقره را نشان می‌دهد. یکی از شاخص‌هـای واضـح از تشـکیل نانوذرات نقره در محیط این است که پس از واکنش بـا یـون نقره رنگ قهوه‌ای تیره‌ای ظاهر می‌شود.

شکل ۱: تغییر رنگ محلول نیترات نقره در حضور عصاره آبی برگ مرزنجوش.

آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز به منظور شناسـایی گـروه‌هـای عملکردی که مسئول محدود کردن و تثبیـت نـانوذرات نقـره هستند استفاده شد و این آنـالیز بـین ۵۰۰ و ۴۰۰۰ cm^{-1} انجـام شد.

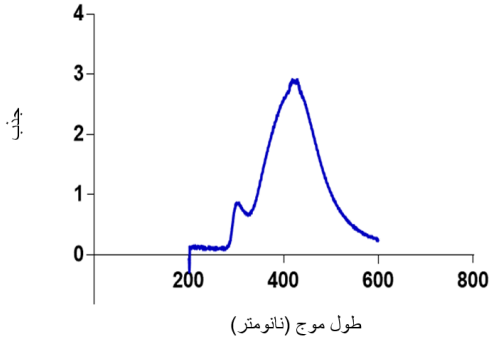


شکل ۲: طیف مادون قرمز الف) نانوذرات نقره بیوسنتزشده با استفاده از عصاره برگ مرزنجوش و ب) عصاره برگ مرزنجوش.

نتیجه طیفی نشان داده شده در شکل ۲، قسمت الف مربوط به نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره می‌باشد در حالیکه شکل ۲ قسمت ب عصاره مرزنجوش معمولی را نشان می‌دهد.

پیک گسترده در $3405\ cm^{-1}$ می‌تواند به علت پیوند OH باشد (شکل ۲، ب). وجود پیک در $1606\ cm^{-1}$ به علت پیوند C=O در گروه کربونیل باشد. همچنین این مولکول‌های زیستی به عنوان گروه‌های تثبیت کننده احتمالی که به تشکیل نانوساختارهای یون نقره کمک می‌کردند، شناسایی شدند و در طیف‌سنجی مادون قرمز نشان داده شده است (شکل ۲). مقایسه دو طیف نشان از کاهش شدت پیک CO در طیف نانوذرات (شکل۲، الف) نسبت به $1606\ cm^{-1}$ در قسمت ب دارد که نشان می‌دهد تثبیت سیستم ممکن است ناشی از اتصال گروه کربونیل قندها احیا کننده به نقره باشد.

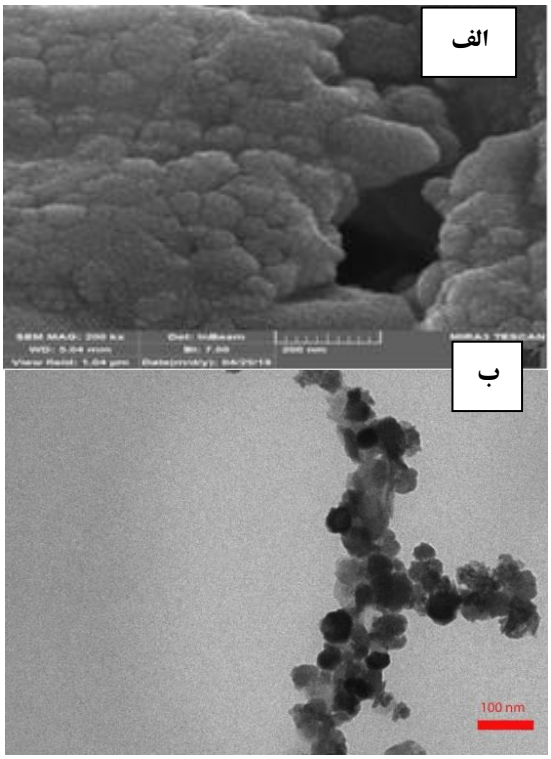
همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید، طیف اسپکتروفتومتری فرابنفش-مرئی در طول موج ۴۳۰ nm ظاهر شده است که مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات نقره بیوسنتز شده می‌باشد.



شکل ۳: طیف UV-Vis نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ مرزنجوش.

توزیع شکل و اندازه نانوذرات نقره سنتز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نانوذرات نقره سنتز شده را نشان

می‌دهد. تصویر نشان می‌دهد که نانوذرات بدست آمده همگی تقریبا کروی بوده و اندازه متوسط آن ها بین ۳۵ nm تا ۵۰ بوده است.



شکل ٤: الف) تصویر SEM نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ مرزنجوش و ب) تصویر TEM نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره آبی برگ مرزنجوش.

در این پژوهش، پس از بیوسنتز نانوذرات نقره، فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات تولیدی در برابر پاتوژن‌های مورد نظر بررسی گردید. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره بیوسنتز شده و بعد از آن آزمون تعیین حداقل غلظت کشندگی برای هر یک از نمونه‌ها بررسی گردید.

بنابراین نانوذرات نقره بیوسنتز شده اثر ضدمیکروبی خوبی را در مقابل پاتوژن‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد بررسی در این مطالعه نشان دادند. بعد از اینکه خاصیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره گیاه مرزنجوش مورد بررسی قرار دادیم. معمولا باکتری‌های گرم منفی دیواره نفوذناپذیری دارند، ولی باکتری‌های گرم مثبت معمولا فاقد غشای خارجی در دیواره سلولی خود هستند و از این جهت با باکتری‌های گرم منفی تفاوت دارند.

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره گیاه مرزنجوش در برابر سه نوع پاتوژن مواد غذایی.

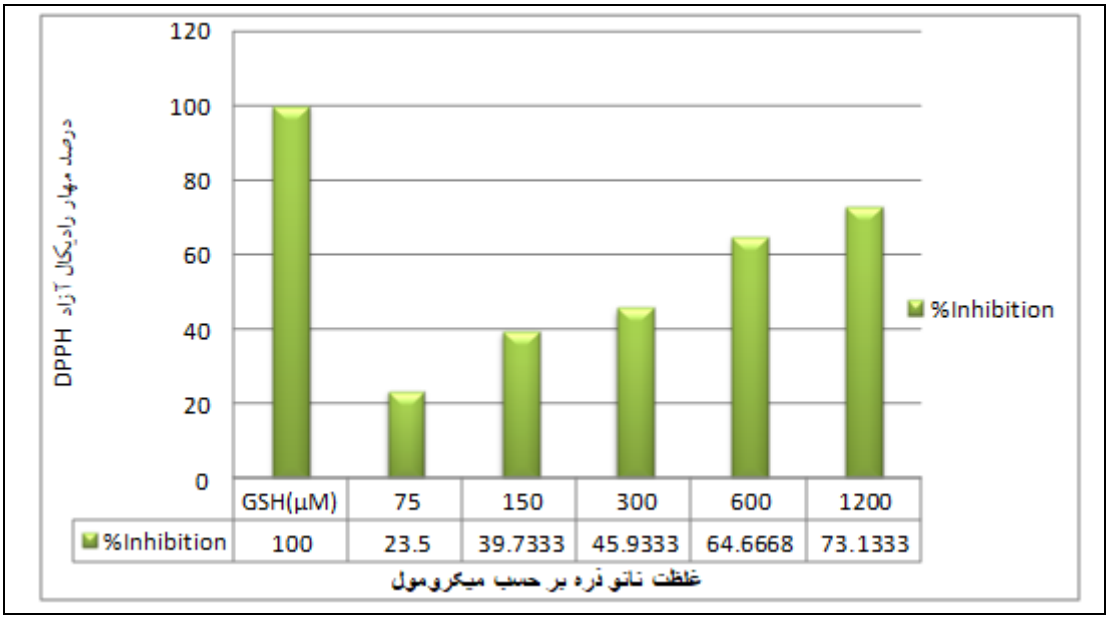
باکتری	MIC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
Escherichia coil	۳/۰±۱۳/۰۷	۶/۰±۲۵/۰۱
Listeria monocytogenes	۶/۰±۲۵/۰۱	۶/۰±۲۵/۰۱
Staphylococcus aureus	۳/۰±۱۳/۰۷	۶/۰±۲۵/۰۱

روش سبز دارای توانایی آماده‌سازی نانوذرات نقره آنتی اکسیدان جدید می‌باشند (داده‌ها بر اساس میانگین± انحراف معیار گزارش شده و گلوتاتیون به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفته است).

در مرحله آخر خواص ضدمیکروبی ساخته شده همراه با نانوذرات نقره بیوسنتز شده را بوسیله آزمون نفوذ دیسک بررسی کردیم.

آزمون انجام شده نشان داد که فیلم‌های ساخته شده از نشاسته خالص خاصیت ضدمیکروبی نداشتند. ولی با اضافه کردن نانوذرات نقره بیوسنتز شده با عصاره مرزنجوش به فیلم‌ها علاوه بر محدوده شفاف زیر فیلم ناحیه مهاری شفافی در اطراف فیلم مشاهده شد. با افزودن مقدار نانوذرات بیوسنتز شده قطر هاله افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات بیوسنتز شده نقره با عصاره آبی گیاه مرزنجوش دارای فعالیت آنتی میکروبی علیه سه پاتوژن تست شده است. قطر هاله‌های بدست آمده از تست نفوذ دیسک برای فیلم‌های مورد نظر حاوی صفر، ۲۵۰ و ppm ۵۰۰ نانوذرات نقره بیوسنتز شده، در جدول ۲ آمده است.

تا به حال هیچ مطالعه‌ای در خصوص خاصیت ضدمیکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی نانوذرات نقره بیوسنتز شده از عصاره گیاه مرزنجوش صورت نگرفته است ولی کاوسی و یعقوبی در سال ۱۳۹۶، به بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات



شکل ۵: فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH نانوذرات نقره بیوسنتز شده با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه مرزنجوش.

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد (cm) برای فیلم‌های نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره مرزنجوش بر حسب (ppm).

غلظت نانوذرات بیوسنتز شده (ppm)	*Staphylococcus aureus*	*Listeria monocytogenes*	*Escherichia coil*
۰	۰	۰	۰
۲۵۰	۲/۰۳±۰/۱۴	۱/۸۸±۰/۰۵	۱/۸۶±۰/۱۰
۵۰۰	۲/۳۳±۰/۱۰	۲/۱۴±۰/۰۷	۲/۲۱±۰/۱۴

نقره سنتز شده با استفاده از عصاره گیاه مرزنجوش اروپایی پرداختند در این مطالعه نانوذرات نقره زیستی دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی بودند. به نظر می‌رسدکه سنتز سبز نانوذرات با استفاده از عصاره گیاهان می‌تواند به افزایش ضد باکتریایی آنها کمک کند. خواص ضدباکتریایی عصاره‌های حاوی نانوذرات به شکل محسوسی افزایش یافته بود [۲۸].

سوکمن و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثر ضد میکروبی اسانس گونه‌های مرزنجوش را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ۳۵ باکتری و ۱۸ قارچ بررسی شدند. از این میکروب‌ها، ۲۷ باکتری و ۱۲ قارچ به اسانس مرزنجوش حساس بودند و رشد آن‌ها توسط اسانس مهار شد [۲۹].

نتایج بدست آمده در این تحقیق با مطالعات صورت گرفته در مورد عصاره گیاه مرزنجوش و نانوذرات سنتز شده همخوانی دارد. نانوذرات نقره حاصله با استفاده از عصاره این گیاه دارای اثرات مهاری بهتری نسبت به عصاره گیاه مرزنجوش بر روی باکترهای گرم منفی و مثبت بود. لذا نانوذرات نقره پتانسیل غشایی پلاسما را ناپایدار می کند که باعث کاهش سطح آدنوزین تری فسفات درون سلول می‌باشد، این عمل با هدف قرار دادن غشاء سلول باکتری انجام می شود. علاوه بر

این نانوذرات به گروه‌های عاملی پروتئین‌ها و ایجاد پیوند با آن‌ها، باعث از بین رفتن خواص اصلی (دناتراسیون) پروتئین‌ها می‌شود. نانوذرات فقط به سطح غشاء سلولی نمی‌چسبد بلکه به درون سلول هم نفوذ می‌کند. نانوذرات پس از نفوذ به داخل سلول باکتری آنزیم‌های آن را غیرفعال کرده و با تولید هیدروژن پر اکسید باعث مرگ باکتری می‌شود [۳۰].

لذا مجموعه‌ای از عوامل ذکر شده باعث شده که نانوذرات نقره حاصله با استفاده از عصاره این گیاه دارای اثرات مهاری خوبی بر روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت از خود نشان می‌دهد. با توجه به مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت گیاه مرزنجوش به علت خواص بالای دارویی می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب در تولید نانوذرات به روش سبز مطرح باشد و به علت عدم به کارگیری مواد شیمیایی خطرناک پتانسیل این را دارند تا در بسته بندی مورد استفاده قرار گیرند.

٤- نتیجه‌گیری

افزودن نانوذرات بیوسنتز شده در فیلم سبب ایجاد خاصیت ضدمیکروبی در برابر انواع باکتری‌های گرم مثبت (SA) *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و گرم منفی *Escherichia coil* شد و با افزایش میزان نانوذره نقره بیوسنتز شده خاصیت ضدمیکروبی افزایش یافت. بطور کلی، خصوصیات فیلم‌های تولیدی با نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره گیاه مرزنجوش کاملا متاثر از میزان نانوذرات بیوسنتز شده مورد استفاده بوده و در مجموع موجب بهبود خواص ضدمیکروبی فیلم‌ها گردید از فیلم‌های حاصل بدلیل خاصیت ضدمیکروبی خوبی که دارد در بسته‌بندی انواع مختلف مواد غذایی استفاده نمود. همچنین هر ماده غذایی خصوصیات منحصربفردی را از لحاظ نوع میکروب‌های عامل فساد، رطوبت، pH و ... را دارا می‌باشد. بنابراین شناخت درست و کامل خصوصیات فیلم‌های مورد نظر و بررسی نقاط ضعف و قوت آن‌ها ما را به انتخاب بیوپلیمر مناسب برای بسته‌بندی مواد غذایی مختلف و رفع عیب‌های آن با توجه به خصوصیات آن ماده غذایی رهنمون می‌کند.

مراجع

[1] F. Licciardello, *Trends in food Science & Technology*, **65**, 2017, 32.

[2] K. Marsh, B. Bugusu, *Journal of Food Science*, **72**, 2007, 39.

[۳] محمد گنجه، سید مهدی جعفری، مرادامان جانی، "استفاده از پوشش‌های با خاصیت ضدمیکروبی در بسته‌بندی مواد غذایی"، فصلنامه علمی-ترویجی علوم و فنون بسته‌بندی، شماره ۱۶، ۱۳۹۲، ۲۳-۱۶.

[۴] سید امیر محمد مرتضویان، محمد حسین عزیزی، سارا سهراب وندی، "فیلم‌های خوراکی: شاخص‌های کیفی و روش‌های تولید"، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، شماره ٤، ۱۳۸۹، ۱۱۷-۱۰۷.

[5] F. Benhacine, A. Ouargli, A.S. Hadj-Hamou, *Polymer-Plastics Technology and Materials*, **58**, 2019, 328.

[6] X.T. Deng, S.F. Yin, X.B. Wu, M. Sun, Z.Q. Li, *International Journal of Hydrogen Energy*, **44**, 2019, 2752.

[7] B. Chatterjee, N. Kulshrestha, P.N. Gupta, *Measurement*, **82**, 2016, 490.

[8] N. Frone, C.A. Nicolae, R.A. Gabor, D.M. Panaitescu, *Polymer Degradation and Stability*, **121**, 2015, 385.

[9] S.A. Dadfar, I. Alemzadeh, S.R. Dadfar, M. Vosoughi, *Materials & Design*, **32**, 2011, 1806.

[10] M. De Azeredo, *Food Research International*, **42**, 2009, 1240.

[11] P. Sanguansri, M.A. Augustin, *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 2006, 547.

[12] S.D.F. Mihindukulasuriya, L.T. Lim, *Trends in Food Science & Technology*, **40**, 2014, 149.

[13] K. Bharathi, V. Thirumurugan, M. Kavitha, G. Muruganadam, K. Ravichandran, M. Seturaman, *World J. Pharm. Sci.*, **3**, 2014, 1415.

[14] M.S. Alsaggaf, S.H. Moussa, A.A. Tayel, *International Journal of Biological Macromolecules*, **99**, 2017, 499.

[15] I. Bunghez, A. Barbinta, M. Patrascu, N. Badea, S. Doncea, A. Popescu, *J Optoelec. Adv. M.*, **14**, 2012, 1016.

[16] P. Dauthal, M. Mukhopadhyay, *J nanopart. Res.*, **15**, 2013, 1.

[17] R. Pandit, M. Rai, C.A. Santos, *Environmental Chemistry Letters*, **25**, 2017, 1.

[18] R. Yoksan, S. Chirachanchai, *Materials Science and Engineering: C*, **30**, 2010, 891.

[19] P. Sarkar, S. Irshaan, S. Sivapratha, R. Choudhary, *Springer International Publishing*, **1**, 2016, 185.

[20] A.M. Cozmuta, A. Peter, L.M. Cozmuta, N. Camelia, L. Crisan, L. Baia, A. Turila. *Packaging Technology and Science*, **1**, 2015, 271.

[21] H. Collins. *Publishers-Self-Help*, **1**, 2016, 168.

[22] D. Kadam, M. Bilal, S. Palamthodi, S.S. Lele, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 2019, 3620.

[23] K. Mallikarjuna, G. Narasimha, G.R. Dillip, B. Praveen, B. Shreedhar, C.S. Lakshmi, B.D.P. Raju, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **6**, 2011, 181.

[24] P. Jegadeeswaran, R. Shivaraj, R. Venckatesh, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **7**, 2012, 991.

[۲۵] زهرا بدیعی، سید علی یاسینی اردکانی، محمد میرجلیلی،"مطالعه ویژگی فیلم‌های نانوکامپوزیتی ساخته شده از نشاسته و کیتوزان، همراه با نانوذرات نقره و مقایسه اثر ضدمیکروبی آن‌ها"، علوم غذایی و تغذیه، شماره **۳**، ۱۳۹۷، ۱۲-۵.

[26] A. Johnsona, I. Obota, U. Ukponga, *J Mater. Environ. Sci.*, **5**, 2014, 899.

[27] R. Veerasamy, T.Z. Xin, S. Gunasagaran, T.F.W. Xiang, E.F.C. Yang, N. Jeyakumar, *J. Saudi. Chem. Soc.*, **15**, 2011, 113.

[۲۸] سمیه کاووسی، هاشم یعقوبی، "سنتز نانوذرات نقره به روش سبز با استفاده از عصاره گیاه مرزنجوش اروپایی (*Origanum majorana*) و بررسی اثرات ضدمیکروبی آن"، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، شماره **۲**، ۱۳۹۶، ۱۷۳-۱۶۱.

[29] T.F. Speth, R.S. Varma, *Accounts. Chem. Res.*, **44**, 2011, 469.

[30] E.T. Hwang, J.H. Lee, Y.J. Chae, Y.S. Kim, B.C. Kim, B.I. Sang, M.B. Gu, *Small*, **4**, 2008, 746.