

## مقاله کوتاه پژوهشی

# بررسی اثرات فتوکاتالیتی-ضد میکروبی فیلم نانوکامپوزیت رس-دی‌اکسیدتیتانیوم در شرایط درون شیشه‌ای و بسته‌بندی پس از برداشت زردآلو

حجت اله بدافی<sup>۱</sup>، یونس مستوفی<sup>۲</sup>، عبدالرسول ارومیه‌ای<sup>۳</sup>، ذبیح اله زمانی<sup>۴</sup>، بابک قنبرزاده<sup>۵</sup>، زیبا قسیم‌ی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۲/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۴/۲۴

## چکیده

در این پژوهش قابلیت ضد میکروبی یک فیلم جدید فتوکاتالیست حاوی نانو ذرات رس و دی‌اکسیدتیتانیوم در ماتریس پلیمری پلی‌اتیلن با چگالی پایین در برابر باکتری‌های *Pseudomonas spp.* و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* در شرایط درون شیشه‌ای و سردخانه ارزیابی شد. فیلم نانوکامپوزیت با اختلاط نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در دو فاز آاناتاز و روتایل و نانوذرات رس کلوزیت ۲۰ (A 20A closite) در ماتریس پلی‌اتیلن با روش مخلوط واکنشی مذاب تهیه شد. در هیچ یک از فیلم‌های شاهد فعالیت میکروب‌کشی در برابر هر دو میکروارگانیزم مشاهده نشد. سلول‌های زنده روی فیلم‌های نانوکامپوزیت برای *Pseudomonas spp.* و *Rhodotorula mucilaginosa*، پس از سه ساعت پرتوتابی با نور UVA با شدت  $0.5 \text{ mW/cm}^2$  (طول موج ۳۰۰-۳۰۰ نانومتر) به ترتیب تا  $4/23 \log \text{ CFU/ml}$  و  $2/12 \log \text{ CFU/ml}$  کاهش یافت. آزمایش شرایط سردخانه، روی میوه‌های تازه زردآلوی بسته‌بندی شده در فیلم‌های نانوکامپوزیت و پلی‌اتیلن خالص به مدت ۱۷ روز در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد تحت تابش لامپ فلورسنت معمولی انجام شد. تعداد سلول‌های باکتری‌های مزوفیلیک و مخمر موجود بر میوه‌های بسته‌بندی شده در فیلم نانویی نسبت به فیلم پلی‌اتیلن خالص از کاهش معنی‌داری برخوردار بود. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی با کاربرد توام فیلم‌های نانوکامپوزیت همراه با پرتوتابی UVA حاصل شد. پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از فیلم نانوکامپوزیت تولید شده با روش واکنشی مذاب، می‌تواند در بسته‌بندی محصولات غذایی رشد میکروبی را کنترل کند.

**واژه‌های کلیدی:** دی‌اکسیدتیتانیوم، رس، فتوکاتالیست، فیلم نانوکامپوزیت، اثر ضد میکروبی، زردآلو

## مقدمه

ضدمیکروب نوعی از بسته‌بندی فعال هستند. این فناوری تلفیقی از برهمکنش بین ماده غذایی، فضای خالی درون بسته و ماده‌ای که بسته از آن ساخته شده، برای حصول نتایج مطلوب می‌باشد (Matsunaga, et al., 1985; Makowski, et al., 2001; Shieh, et al., 2006; Chawengkijwanich, et al., 2008). در ضمن یکی از بهترین روش‌های کاهش یا به تأخیر انداختن رشد میکروارگانیزم‌های درون بسته‌ها یا مواد بسته‌بندی شده در سیستم‌های بسته بندی مواد غذایی به حساب می‌آید (Appendinia, et al., 2002). ممانعت از تکثیر میکروبی در مواد غذایی از مهمترین روش‌های افزایش زمان ماندگاری محصول به‌شمار می‌رود. دی‌اکسیدتیتانیوم ( $\text{TiO}_2$ ) به‌عنوان یک نیمه‌رسانا زمانی که تحت پرتوتابی نور یو وی آ با طول موج کمتر از ۳۴۵ نانومتر قرار می‌گیرد، جفت الکترون‌های غنی از انرژی تولید کرده که می‌تواند به سطح

سیستم‌های بسته‌بندی فعال و هوشمند از جمله فناوری‌های رو به رشدی محسوب می‌شوند که نقش اساسی در حفظ کیفیت و سلامت غذای بسته‌بندی شده و نوشیدنی‌ها ایفا می‌کنند. بسته‌های

- ۱- استادیار، گروه علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، شاهرود، ایران.
  - ۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
  - ۳- دانشیار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی، تهران، ایران.
  - ۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- (Email: h.bodaghi@yahoo.com) \* - نویسنده مسئول:

دارد که با روش مخلوط مذاب<sup>۱</sup> تهیه شده است (Labuza *et al.*, 1989). Yu و همکاران (۲۰۰۳) فیلم نازکی حاوی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و نقره را با روش سل-ژل تولید کردند و گزارش کردند که فعالیت ضد میکروبی بهتر، با افزایش مقدار نانوذرات نقره حاصل شده است. با بررسی که در زمینه مطالعات پژوهشگران قبلی انجام شد هیچ گزارشی در خصوص خواص ضد میکروبی نانوکامپوزیت‌های پلی‌اتیلن با تراکم پایین و دی‌اکسیدتیتانیوم با روش مخلوط مذاب، به‌عنوان یک روش صنعتی یافت نشد. بنابراین بهینه‌سازی فیلم پلی‌اتیلن با تراکم پایین، به‌عنوان یکی از کاربردهای پلیمرهای پلاستیک در صنایع بسته‌بندی، با افزودن نانوذرات بی‌خطر که بتواند به‌عنوان یک فیلم با خواص ضد میکروبی در بسته‌بندی‌های فعال<sup>۲</sup> مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد، می‌تواند گام مهمی در زمینه ارتقای کیفیت محصولات تازه باغبانی در طی مدت زمان انبارداری قلمداد شود. لذا، در این مطالعه فیلم نانوکامپوزیت پلی‌اتیلنی حاوی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و رس مونت‌موریلونیت با استفاده از دستگاه اکسترودر<sup>۳</sup> و دمنده فیلم<sup>۴</sup> تولید شدند. قابلیت ضد میکروبی فیلم‌های جدید در برابر باکتری‌های *Pseudomonas spp.*، باکتری مزوفیلیک و مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* که از جمله میکروارگانیسم‌های مهم در محصولات میوه و سبزی هستند (Yoshihiko *et al.*, 1965; Ahvenainen *et al.*, 1997) در شرایط درون‌شیشه‌ای و کاربرد آن در بسته‌بندی مواد غذایی در شرایط سردخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که هدف از افزودن نانوذرات رس، کاهش نفوذپذیری فیلم نانوکامپوزیت در برابر گازها و بخار آب بود که نتایج بخش مذکور در گزارشات آینده ارائه خواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

پلی‌اتیلن با چگالی کم (LDPE LF0200) با شاخص جریان مذاب (MFI) ۲ g/min از شرکت پتروشیمی اراک، مالٹیک آنیدرید (PE-MA) از شرکت گارانکین، مونت‌موریلونیت کلوزیت ۲۰<sup>۵</sup> از شرکت سادرن کلی پروداکت<sup>۶</sup>، پودر نانو دی‌اکسیدتیتانیوم آنتاز<sup>۷</sup> و

مولکول دی‌اکسیدتیتانیوم انتقال یافته و با افزایش واکنش‌پذیری مولکول‌های جذب شده در سطح دی‌اکسیدتیتانیوم، سبب تولید رادیکال‌های آزاد شود. رادیکال‌های آزاد تولید شده قادرند پیوندهای C-H که از اجزای ساختاری مهم در مولکول‌های آلی محسوب می‌شوند را اکسید کنند که این فرایند منجر به تجزیه و تخریب مولکول‌های آلی خواهد شد (Jeffery *et al.*, 2009). حاصل واکنش فتوکاتالیستی دی‌اکسیدتیتانیوم، تولید رادیکال‌های هیدروکسیل (OH<sup>\*</sup>) و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر (ROS) بر سطح مولکول‌های دی‌اکسیدتیتانیوم است که باعث اکسیداسیون ترکیبات پلی‌فسفولیپیدهای غیراشباع در غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه غیرفعال شدن میکروارگانیسم می‌شود (Hoffmann *et al.*, 1995; Matsunaga *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 1997; Sunada *et al.*, 1998; Liu, *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2003; Del Nobile *et al.*, 2009). اخیراً استفاده از دی‌اکسیدتیتانیوم در مصارف غذایی، دارویی و وسایل آرایشی بهداشتی و صنعت بسته‌بندی به‌عنوان یک ماده غیرسمی توسط وزارت غذا و داروی آمریکا تأیید شده و خاصیت گندزدایی دی‌اکسیدتیتانیوم برای سطوح بسته‌بندی مواد غذایی توجه زیادی از پژوهشگران را به خود معطوف ساخته است (Cho *et al.*, 2004).

فتوکاتالیست دی‌اکسیدتیتانیوم برای تجزیه آلوده‌کننده‌های آلی و غیرفعال کردن طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته است (Hoffmann *et al.*, 1995; Rooney *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003; Guimaraes *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2003; Matsunaga, Mangaraj *et al.*, 2009). همکاران (Matsunaga *et al.*, 1995) گزارش را در مورد اثر ضد میکروبی دی‌اکسیدتیتانیوم بر باکتری *Escherichia coli* ارائه دادند. متعاقباً پژوهشگران متعدد اثر ضد میکروبی دی‌اکسیدتیتانیوم را در مورد *E. coli* (Matsunaga *et al.*, 1995; Rooney *et al.*, 1995; Matsunaga *et al.*, 1998; Wist *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Rahmani *et al.*, 2008; Kubacka *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011) و چندین میکروارگانیسم دیگر از جمله *P. aeruginosa* و *E. Faecalis* (Labuza *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2003) سیانو باکترها و جلبک‌های تک سلولی (Maness *et al.*, 1999)، *Lactobacillus helveticus* (Maneerat *et al.*, 2006)، *Legionella pneumophila* (Costa *et al.*, 2011)، *Clostridium perfringens* (Huang *et al.*, 2000)، *coliform bacteria* (Rooney *et al.*, 1995)، و چندین باکتری بیماری‌زای مواد غذایی از جمله *Salmonella choleraesuis*، *Vibrio parahaemolyticus*، *Listeria monocytogenes* (Kuhn *et al.*, 2003) تأیید کردند.

در اغلب پژوهش‌ها اثرات ضد میکروبی فیلم‌های پوشش‌دار شده با پودر دی‌اکسیدتیتانیوم مورد بررسی قرار گرفته است. تنها یک گزارش در مورد فیلم‌های ایزو تاکتیک پلی‌پروپیلنی و دی‌اکسیدتیتانیوم وجود

<sup>1</sup> Melt blending

<sup>2</sup> Active packaging

<sup>3</sup> Extruder

<sup>4</sup> Film blowing

<sup>5</sup> Closite 15A

<sup>6</sup> Southern Clay Products

<sup>7</sup> Anatase

برای ارزیابی قابلیت ضد میکروبی فیلم‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. *P. mucilaginosus* و *P. putida* از پنیر موتزارلا<sup>۳</sup> و *R. mucilaginosus* از میوه انگور جداسازی شدند. سلول‌های باکتری‌ها و مخمر هر کدام در بطری‌های شیشه‌ای استریل ۳۰۰ میلی‌لیتری رشد داده شد. هر بطری حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر پی‌سی‌بی<sup>۴</sup> (شرکت Oxoid ایتالیا) متشکل از ۵ گرم در لیتر تریپتون، یک گرم در لیتر گلوکز و ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر برای رشد باکتری و دکستروز براس (شرکت آکسوید ایتالیا) متشکل از ۵ گرم در لیتر تریپتون، ۵ گرم در لیتر پیتون<sup>۵</sup> و ۲۰ گرم در لیتر گلوکز برای رشد مخمر بود. بطری‌های مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت برای رشد باکتری و ۴۸ ساعت برای رشد مخمر نگهداری شدند. پس از اتمام مدت زمان مذکور، جداسازی سلول‌های رشد یافته با استفاده از محلول نمکی و سانتریفوژ در  $10000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سلول‌های مورد نظر دو مرتبه با محلول نمکی استریل شستشو شد. با امولسیون مجدد پلت‌های میکروبی در محلول نمکی، استوک‌های میکروبی تهیه شدند. بدین منظور مقادیر مساوی از *P. putida* و *P. fluorescens* مخلوط شدند تا ترکیب نهایی *Pseudomonas spp.* فراهم گردد. جمعیت اولیه *Pseudomonas spp.* و *Rhodotorula mucilaginosus* به ترتیب در حدود  $10^8$  CFU/ml و  $10^7$  CFU/ml بودند که با استفاده از روش شمارش کلونی شمارش گردید.

**آزمایش فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیت در محیط درون شیشه‌ای:** ارزیابی خواص ضد میکروبی مطابق با روش Chawengkijwanick و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییرات انجام شد. یک میلی‌لیتر از استوک‌های میکروارگانیزم به درون پتری دیش‌های شیشه‌ای استریل (قطر ۶ سانتی‌متر) ریخته شد. فیلم مورد آزمایش (قطر ۶ سانتی‌متر) روی محلول درون پتری دیش قرار گرفت. از فیلم‌های پلی‌اتیلنی خالص به عنوان شاهد استفاده شد. هر یک از پتری دیش‌ها به وسیله فیلم نازک پی‌وی‌سی<sup>۶</sup> به ضخامت ۵ میکرومتر پوشیده شد تا بدین وسیله از تبخیر محلول جلوگیری به عمل آید. نمونه‌های آزمایشی تحت تابش نور ماورای بنفش A قرار داده شدند. عمل پرتوتابی توسط ۶ لامپ ۸ واتی درون یک اتاقک کوچک صورت گرفت (شکل ۱). نمونه‌های شاهد، متشکل از پتری دیش‌های فیلم پلی‌اتیلنی بدون پرتوتابی و پتری دیش‌های حاوی

روتایل<sup>۱</sup> از شرکت نانوشل<sup>۲</sup> با قطر ذرات ۲۰ تا ۸۰ نانومتر، گلیسرول (extra pure grade MW of 92.10 g/mole) از شرکت مجللی تهیه و خریداری شدند.

## روش‌ها

**تهیه فیلم‌های نانوکامپوزیت:** نانوکامپوزیت‌های پلی‌اتیلنی - دی‌اکسیدتیتانیوم/رس با روش مخلوط مذاب تولید شدند. پودر دی‌اکسیدتیتانیوم (به‌عنوان فتوکاتالیت) حاوی ۷۰ درصد آناتاز و ۳۰ درصد روتایل در مجموع به مقدار ۳ درصد، کلوزیت ۲۰ (به‌منظور کاهش نفوذپذیری فیلم)، ۵ درصد (نسبت‌های مذکور با توجه به نتایج حاصل از خواص فیلم‌های تولید شده در پروژه مذکور انتخاب شده که در این مقاله ذکر نشده‌اند)، مالئیک آنیدرید به عنوان سازگارکننده (به‌منظور اختلاط بهتر پلی‌اتیلن و نانوذرات رس) ۳ درصد، گلیسرول ۰/۵ درصد به منظور افزایش چسبیدگی نانوذرات به گرانول‌های پلی‌اتیلن و پلی‌اتیلن به مقدار ۸۸/۵ درصد مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پولک‌های مالئیک آنیدرید به گرانول‌های پلی‌اتیلن افزوده شد و با استفاده از همزن مخلوط شدند. بر روی مخلوط حاصل گلیسرول افزوده شد و عمل اختلاط یکنواخت توسط همزن برقی (مدل NS: 919) انجام شد. نانو ذرات با مقادیر مورد نظر بر روی مخلوط حاصل افزوده شد و همزدن تا پوشش کامل نانو ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم و نانورس بر گرانول‌ها ادامه یافت، به نحوی که به‌واسطه افزوده‌شدن گلیسرول، تمامی سطح چسبناک گرانول‌های پلی‌اتیلن آغشته به پودرهای نانوذرات شد. مخلوط نهایی در دستگاه اکسترودر دو پیچ (شرکت Brabender) جهت انجام فرآیند واکنشی مذاب قرار گرفت. فرآیند اختلاط و توزیع نانوذرات در ماتریس پلیمری در حالت مذاب انجام شد. این فرآیند در شرایط دمایی ۱۴۵ تا ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm انجام شد. مواد به محض خروج از قالب در مجاورت هوا خنک شدند. سپس در یک دستگاه خردکن به صورت گرانول در آمدند. گرانول‌های نانوکامپوزیت تولید شده به وسیله دستگاه دمنده فیلم به فیلم‌هایی با ضخامت  $3 \pm 30$  میکرومتر تبدیل شدند. تولید فیلم در حالت مذاب انجام شد و این فرآیند با دور ۴۰ rpm صورت گرفت. در نهایت فیلم‌های نانوکامپوزیت دی‌اکسیدتیتانیوم-رس و فیلم‌های پلی‌اتیلنی خالص بدون نانوذرات تولید شده نیز به عنوان شاهد بدون هیچ گونه پارگی و روزنه تولید شدند.

**تهیه محلول‌های میکروارگانیزم:** باکتری‌های *Pseudomonas spp.* و مخمر *Rhodotorula mucilaginosus*.

<sup>3</sup> Mozzarella cheese

<sup>4</sup> PCB

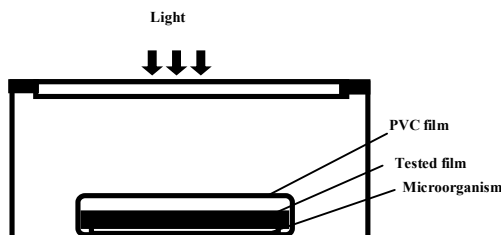
<sup>5</sup> Bacteriological peptone

<sup>6</sup> polyvinyl chloride

<sup>1</sup> Rutile

<sup>2</sup> Nanoshel Co.

۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۱ رقیق‌سازی شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استوک و محلول‌های رقیق شده در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت باکتری و مخمر پخش گردید. محیط کشت‌های باکتری (PAB) و محیط کشت‌های مخمر (SAD) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند و سپس واحدهای کلونی تشکیل شده (CFU) شمارش شدند.



شکل ۱- طرح شماتیک آزمایش فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های آزمایشی. فیلم‌های مورد آزمایش در پتری‌دیش‌های استریل آغشته به محلول‌های میکروارگانیزم به وسیله فیلم نازک پلی وینیل کلراید پوشانده شدند.

در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت باقی ماندند. سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. تعداد کلونی‌های باکتری و مخمر به صورت CFU/g برای هر میوه شمارش شد. همچنین نسبت سلول‌های زنده به وسیله یک فرمول معمولی محاسبه شد:

$$\text{Survival rate} = y/x \times 100\% \quad (1)$$

که در فرمول فوق  $x$  و  $y$  سلول‌های میکروارگانیزم به ترتیب قبل و بعد از پرتوتابی را نشان می‌دهند.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** این آزمایش در سه تکرار و داده‌های آزمایش با نرم افزار Statistica 7.1 با روش تجزیه واریانس یک‌طرفه و نمودارها در محیط Excel ترسیم شدند. مقایسه میانگین‌ها در سطح ۰/۰۵ به روش دانکن انجام شد.

## نتایج و بحث

**ارزیابی فعالیت ضد میکروبی در محیط درون شیشه‌ای**  
اغلب مطالعات قبلی، خواص ضد میکروبی فیلم‌های دی‌اکسیدتیتانیوم بر باکتری *E. coli* را مورد ارزیابی قرار داده‌اند (Matsunaga et al., 1995; Rooney et al., 1995; Wist et al., 2002; Cheng et al., 2007; Rahmani et al., 2008; Kubacka et al., 2009; Yu et al., 2011). در حالی که در این پژوهش اثر فتوکاتالیتی ضد میکروبی فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر *Pseudomonas*

محلول باکتری بدون فیلم ولی تحت تابش، بودند. آزمایش در سه تکرار انجام شد. مدت پرتوتابی سه ساعت بود. نمونه‌برداری و کشت محلول‌های حاوی میکروارگانیزم هر ۶۰ دقیقه پس از پرتوتابی انجام شد. برای این کار هر سری پتری‌دیش از اتاقک پرتوتابی خارج و آزمایش میکروبیولوژی انجام می‌شد. ۹ میلی‌لیتر از محلول نمکی استریل به هر پتری‌دیش افزوده شد و عمل اختلاط به مدت ۱۸۰ ثانیه صورت گرفت. از هر نمونه پتری‌دیش یک میلی‌لیتر محلول برداشت شد و با افزودن به محلول نمکی به غلظت‌های ۰/۱، ۰/۱، ۰/۱

**آزمایش فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های نانوکامپوزیت در شرایط سردخانه:** زردآلوهای جعفری<sup>۱</sup> تازه از منطقه بسطام در ۶ کیلومتری شهرستان شاهرود جمع‌آوری و به مدت یک شب در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. زردآلوه‌ها بر اساس اندازه، شکل ظاهری و رنگ انتخاب و میوه‌های صدمه‌دیده حذف شدند. از فیلم‌های نانوکامپوزیت و فیلم پلی‌اتیلنی خالص، کیسه‌هایی پلاستیکی به ابعاد ۱۲×۳۵ سانتی‌متر تهیه شد.

در حدود ۳۵۰ گرم زردآلو به تصادف درون کیسه‌های مذکور بسته‌بندی شد. سپس میوه‌های بسته‌بندی شده در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ روز تحت تابش لامپ‌های فلورسنت معمولی قرار گرفتند. شدت نور UVA تابیده شده روی سطوح بسته‌ها حدود  $0.5 \text{ mW/cm}^2$  بود. تست میکروبیولوژی باکتری‌های مزوفیلیک بر اساس روش Del Nobile و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. هر شش روز در حدود ۲۰ گرم زردآلو (برش‌های عمودی از سطح میوه سطح میوه به سمت مرکز با پهنای سه سانتی‌متر) تهیه شد و در ۱۸۰ میلی‌لیتر محلول نمکی قرار گرفت و توسط یک دستگاه استومپر به مدت ۱۲۰ ثانیه عمل هموژنیزه شدن صورت گرفت. ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول هموژنیزه و محلول‌های رقیق‌سازی شده آن بر روی محیط‌های کشت باکتری و مخمر پخش شد. برای باکتری مزوفیلیک، محیط کشت پلیت کانت آگار استفاده شد و نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. از محیط کشت دکستروز آگار برای کشت مخمر استفاده شد و نمونه‌ها

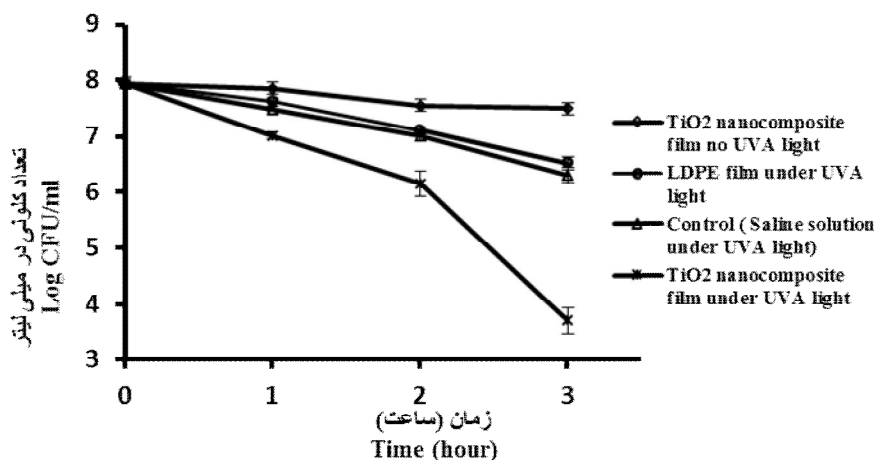
<sup>۱</sup> *Prunus armenica* cv. jafari

میکروارگانیزم نبوده است. پس از قرارگیری فیلم‌های نانوکامپوزیت اثر فتوکاتالیتی این فیلم‌ها در غیر فعال کردن میکروارگانیزم مشاهده شد. از نتایج آزمایش چنین استنباط می‌شود که بین زمان‌های مختلف پرتوتابی (هر یک ساعت) بر غیر فعال کردن میکروارگانیزم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد وجود دارد. در تیمار فیلم‌های نانوکامپوزیت تعداد سلول‌های زنده کمتر بود در حالی که در فیلم‌های کنترل (پلی اتیلن خالص و تیمار پرتوتابی شده فاقد فیلم) تعداد سلول‌های زنده میکروارگانیزم‌ها به ترتیب  $6/52 \log \text{CFU/ml}$  و  $6/3 \log \text{CFU/ml}$  مشاهده شد. به بیان دیگر می‌توان گفت تعداد سلول‌های زنده پس از ۳ ساعت پرتوتابی بر فیلم‌های نانوکامپوزیت و فیلم پلی‌اتیلن خالص به ترتیب تا  $4/23 \log \text{CFU/ml}$  و  $2/12 \log \text{CFU/ml}$  کاهش یافتند. این نتایج با نتایج Chawengkijwanich و همکاران (۲۰۰۸) که کاهش  $3 \log \text{CFU/ml}$  و  $1 \log \text{CFU/ml}$  را به ترتیب برای فیلم‌های پلی‌پروپیلن پوشش‌دار با دی‌اکسیدتیتانیوم و فیلم غیر پوشش‌دار گزارش کردند، مطابقت دارد.

*Rhodotorula* و *Pseudomonas putida*, *fluorescens mucilaginos* مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب این میکروارگانیزم‌ها مربوط به شواهدی بود که نشان می‌داد از بین میکروب‌های جدا شده از میوه و سبزی‌ها این میکروارگانیزم‌ها از جمله شایع‌ترین آن‌ها هستند (Ahvenainen et al., 1996; Yoshihiko et al., 1997). سلول‌های زنده در تیمار فیلم‌های نانوکامپوزیت و پلی‌اتیلن خالص با روش شمارش کلونی‌ها قبل و بعد از ۳ ساعت پرتوتابی صورت گرفت که در شکل ۲ آمده است.

### *Pseudomonas* spp.

با توجه به شکل ۲ تعداد سلول باکتری زنده در نمونه بدون پرتوتابی کاهش معنی‌داری نشان ندادند که این نتیجه با نتایجی که در مطالعات قبلی توسط شاونگیجوانیک و همکاران (۲۰۰۸)، روی *E. coli* گزارش شده بود مطابقت دارد. این یافته نشان می‌دهد که فیلم نانوکامپوزیت به تنهایی و بدون پرتوتابی قادر به غیر فعال کردن



شکل ۲- غیر فعال شدن *Pseudomonas* spp. در آزمایش درون شیشه ای (محلول نمکی) با استفاده از فیلم‌های نانوکامپوزیت دی‌اکسیدتیتانیوم و فیلم پلی‌اتیلن با تراکم کم تحت پرتوتابی نور ماورای بنفش. هر داده حاصل از میانگین سه تکرار و سه پتری برای هر تکرار است (میلله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد داده‌هاست).

نسبت زنده‌مانی *Pseudomonas* spp. در فیلم نانوکامپوزیت ۴۶/۷۲ درصد و در فیلم پلی‌اتیلن خالص ۸۲ درصد بود (جدول ۱). Shieh و همکاران (۲۰۰۶) نیز نسبت فوق را برای *E. coli* و تیمار فیلم پوشش‌دار شده با نانوذرات آنتاز دی‌اکسیدتیتانیوم ۵۷ درصد گزارش کردند. این نتایج غیر فعال شدن *Pseudomonas* spp. تحت نور UVA تأیید می‌کند. در واقع پس از جذب نور UVA توسط فیلم نانوکامپوزیت در طول موج کمتر از ۳۵۰ نانومتر، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر که در سطح فیلم تولید

می‌شوند نقش اساسی در از بین بردن میکروارگانیزم‌ها ایفا می‌کنند (Sunada et al., 1998). به هر حال نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که کاربرد فیلم نانوکامپوزیت توام با پرتوتابی اثر بیشتری در از بین بردن میکروارگانیزم نسبت به پرتوتابی تنها داشته است همچنان که در گزارشات گذشته نیز مشاهده شد (Labuza et al., 1989; Yu et al., 2003; Cho et al., 2004). هستند. در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیر مشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ به روش دانکن هستند.

*Rhodotorula mucilaginosa*

تعداد سلول‌های زنده مخمر در تمام نمونه‌های فیلم بدون پرتوتابی کاهش معنی‌دار نشان ندادند (شکل ۳). در آغاز آزمایش تعداد سلول زنده مخمر ۶/۰۶ CFU/ml بود. پس از ۳ ساعت پرتوتابی این مقدار به ۳/۹۴ CFU/ml، ۵/۲۵، و ۵/۳۸ به ترتیب برای تیمارهای فیلم نانو کامپوزیت، فیلم پلی‌اتیلن خالص و تیمار محلول پرتوتابی شده بدون فیلم (شاهد) کاهش یافت که به لحاظ آماری معنی‌دار نبود.

به نحوی که این کاهش برای هر کدام از تیمارهای مذکور به ترتیب ۲/۱۲ CFU/ml، ۰/۸۱ و ۰/۶۸ بود. در واقع می‌توان گفت نسبت زنده‌مانی سلول‌های مخمر برای فیلم نانو کامپوزیت ۶۵ درصد در حالی که در مورد فیلم پلی‌اتیلن خالص ۸۹ درصد بوده است (جدول ۱).

جدول ۱- نسبت زنده‌مانی (%) *Rhodotorula mucilaginosa* و *Pseudomonas spp.* در آزمایش درون شیشه‌ای با استفاده از نمونه‌های مورد آزمایش تحت نور UVA.

نسبت زنده‌مانی (%) بعد از سه ساعت		نسبت زنده‌مانی (%) بعد از دو ساعت		نسبت زنده‌مانی (%) بعد از یک ساعت		نمونه‌های آزمایشی
<i>P. spp.</i>	<i>R. m</i>	<i>P. spp.</i>	<i>R. m</i>	<i>P. spp.</i> ††	<i>R. m</i> †	
۹۴/۴۵ <sup>a</sup>	۹۰/۵۹ <sup>a</sup>	۹۵/۲۱ <sup>a</sup>	۹۳/۳۹ <sup>a</sup>	۹۸/۹ <sup>a</sup>	۹۷/۸۵ <sup>a*</sup>	تیمار بدون پرتو تابی
۸۲/۱۱ <sup>b</sup>	۸۸/۷۷ <sup>a</sup>	۸۹/۵۴ <sup>a</sup>	۹۲/۴۰ <sup>a</sup>	۹۵/۷۲ <sup>ab</sup>	۹۴/۰۵	فیلم اتیلن خالص
۷۹/۳۳ <sup>b</sup>	۸۶/۶۳ <sup>a</sup>	۸۸/۴۱ <sup>a</sup>	۹۰/۲۶ <sup>a</sup>	۹۴/۳۳ <sup>b</sup>	۹۱/۴۱ <sup>a</sup>	تیمار شاهد بدون فیلم
۴۶/۷۳ <sup>c</sup>	۶۵/۰۱ <sup>b</sup>	۷۷/۴۵ <sup>b</sup>	۷۶/۰۷ <sup>b</sup>	۸۸/۴۱ <sup>c</sup>	۸۳/۳۳ <sup>b</sup>	فیلم نانو کامپوزیت

داده‌ها بیانگر میانگین درصدی نسبت زنده‌مانی در سه تکرار ، † *Rhodotorula mucilaginosa* †† *Pseudomonas spp.*

که با حذف دی‌اکسیدتیتانیوم این مقدار به ۴۲ درصد رسید.

**ارزیابی فیلم‌های در شرایط آزمایش سردخانه:** دلیل اصلی برای انتخاب این میکروارگانیسم‌ها این بود که آن‌ها از جمله میکروبی‌های اصلی فساد میوه و سبزی محسوب می‌شوند (Del Nobile et al., 2009). جمعیت سلول‌های باکتری مزوفیلیک در میوه‌های بسته‌بندی شده با فیلم‌های نانو کامپوزیت پس از ۱۷ روز از  $3/55 \log \text{CFU/g}$  به کمتر از  $2 \log \text{CFU/g}$  کاهش یافت (اختلاف معنی‌دار، در سطح ۵ درصد) در حالی که جمعیت این باکتری در مورد میوه‌های بسته‌بندی شده در فیلم معمولی پلی‌اتیلنی از  $2/82 \log \text{CFU/g}$  به  $5/2 \log \text{CFU/g}$  (شکل ۴) افزایش یافت (اختلاف معنی‌دار، در سطح ۵ درصد). نتایج مشابه در مورد مخمر نیز به دست آمد به نحوی که سلول‌های مخمر در مورد فیلم نانو کامپوزیت از  $2/79 \log \text{CFU/g}$  به کمتر از  $2 \log \text{CFU/g}$  کاهش یافت در حالی که در مورد فیلم پلی‌اتیلنی از  $2/4$  به  $3/94$  (اختلاف معنی‌دار، در سطح ۵ درصد) افزایش یافتند (شکل ۵). از نتایج فوق چنین استنباط می‌شود که فیلم نانو کامپوزیت تولید شده تحت تابش نور UVA با شدت  $0/05 \text{ mW/cm}^2$  قادر است آلودگی سطحی محصول غذایی را کاهش دهد و بنابراین توانایی افزایش زمان ماندگاری محصول بسته‌بندی شده را به واسطه کاهش رشد میکروبی محصول بسته‌بندی

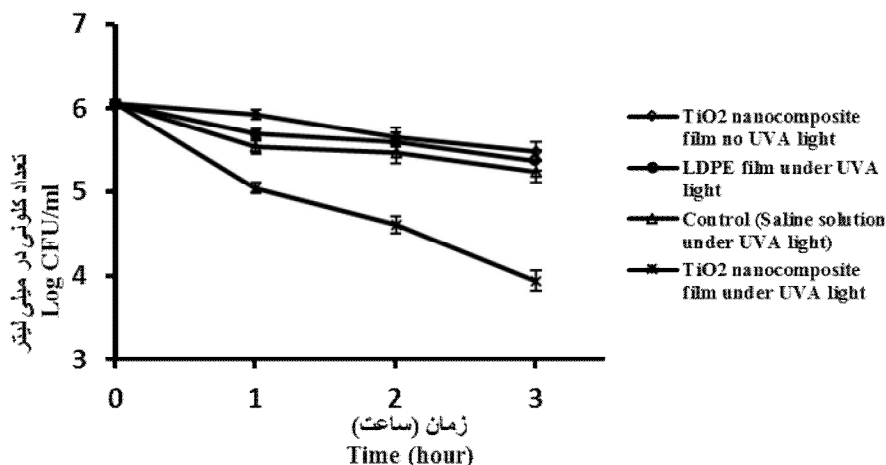
اختلافات جزئی در داده‌های حاصل از آزمایش فیلم‌ها با توجه به نوع میکروارگانیسم دور از انتظار نیست. این تفاوت‌ها احتمالاً به دلیل تفاوت رفتاری، ضخامت دیواره سلولی و ماهیت ترکیبات فسفولیپیدهای غیراشباع در غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها است (Labuza et al., 1989; Cho et al., 2004). برخلاف سلول باکتریها دیواره سلولی قارچ‌ها لایه لایه بوده و هر لایه، از فیبریل‌هایی که در جهات مختلف آرایش یافته است، تشکیل شده‌اند (Bartnicki-Garcia, 1973). کیتین به عنوان یک ترکیب پلی‌ساکارید رایج نیز در دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد (Chai et al., 2000). نتایج مشابه در مورد فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های پلی‌پروپیلن ایزوتاکتیک با درصد‌های متفاوت دی‌اکسیدتیتانیوم علیه میکروارگانیسم‌های *Enterococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* گزارش شده است (Labuza et al., 1989). اغلب مطالعات گذشته بر فعالیت میکروبی باکتری‌ها صورت گرفته در حالی که مخمرها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اولین گزارش در مورد مکانیزم کشندگی دی‌اکسیدتیتانیوم در مورد مخمر توسط Matsunaga و همکاران (۱۹۸۸) انجام شد. آن‌ها شواهدی در مورد اکسیدشدن کوآنزیم‌آ در مخمر *S. cerevisiae* در مقابل نور و دی‌اکسیدتیتانیوم مخلوط با پلاتین ارائه داده و بیان کردند که ۹۷ درصد محتوای کوآنزیم‌آ در فواصل درون سلول‌ها در حضور دی‌اکسیدتیتانیوم تحت تابش لامپ هالیدی به مدت ۱۲۰ دقیقه، از بین رفته است در حالی

بنابراین این فیلم‌های بسته‌بندی توانایی مقابله با میکروارگانیسم‌های زنده را داشته و بعنوان بسته‌های ضد میکروبی در صنعت بسته‌بندی قابل استفاده هستند. ضمناً افزودن نانوذرات رس به منظور بهبود خواص مکانیکی، پایداری حرارتی و بهبود خواص نفوذپذیری این فیلم‌ها در برابر گازهای اکسیژن، دی‌اکسید کربن و سایر گازها صورت گرفت که نتایج آن متعاقباً ارائه خواهد شد

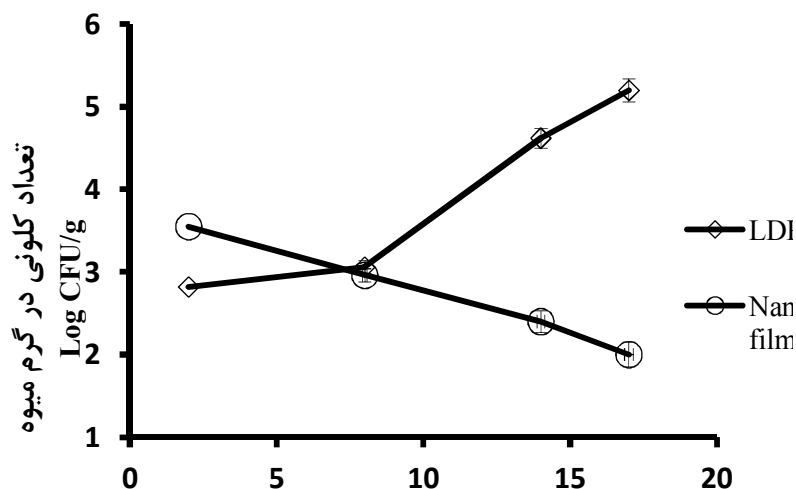
شده داراست.

نتایج مشابهی در مورد کاهش تعداد سلول‌های *E. coli* جدا شده از کاهوی برش خورده و بسته‌بندی شده در فیلم پوشش‌دار شده پلی‌پروپیلنی با ذرات دی‌اکسید تیتانیوم گزارش شده است (Chawengkijwanich *et al.*, 2008).

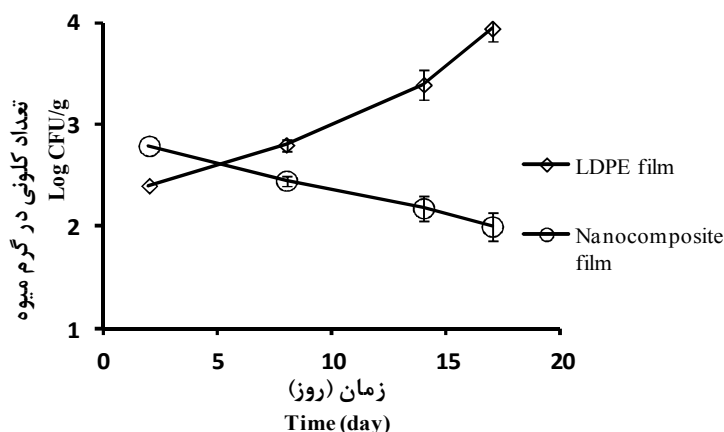
نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که فیلم‌های تولید شده با روش مخلوط مذاب قادر به غیر فعال کردن سلول‌های باکتری و مخمر هم در شرایط درون شیشه‌ای و هم شرایط سردخانه هستند.



شکل ۳- غیر فعال شدن *Rhodotorula mucilaginosa* در آزمایش درون شیشه‌ای (محلول نمکی) با استفاده از فیلم‌های نانوکامپوزیت دی‌اکسید تیتانیوم و فیلم پلی اتیلن با تراکم کم تحت پرتوتابی نور ماورای بنفش. هر داده حاصل از میانگین سه تکرار و سه پتری برای هر تکرار است (میله‌های عمودی معرف انحراف استاندارد داده هاست).



شکل ۴- جمعیت سلول‌های باکتری مزوفیلیک در میوه‌های زرد آلو بسته‌بندی شده در فیلم‌های آزمایشی تحت نور فلورسنت



شکل ۵- جمعیت سلول‌های مخمر در میوه‌های زردآلوی بسته‌بندی شده در فیلم‌های آزمایشی تحت نور فلورسنت

این فیلم ممکن است در محدوده گسترده‌ای از کاربردهای غذایی مورد استفاده قرار گیرد و به‌ویژه می‌تواند توجه تولیدکنندگان زیادی را به عنوان بسته‌بندی فعال برای افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی تازه را به‌خود جلب کند.

### قدردانی

نویسندگان این مقاله کمال تشکر را به منظور حمایت مالی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و همچنین از پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران دارند.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش تولید یک فیلم نانوکامپوزیت پلی‌اتیلن دی‌اکسیدتیتانیوم-رس با روش مخلوط واکنشی مذاب همراه با ویژگی‌های ضد میکروبی برای مصارف بسته‌بندی مواد غذایی مطالعه شد. توانایی میکروبی کشی این فیلم نانوکامپوزیتی بدون در نظر گرفتن نوع میکروارگانیسم پس از ۳ ساعت پرتوتاب با نور UVA حاصل شد. همچنین در آزمایش سردخانه، غیرفعال شدن باکتری مزوفیلیک و مخمر پس از نگهداری میوه‌های زردآلو در بسته‌های ساخته شده از این فیلم‌ها در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ روز بررسی شد. این نتایج یک تکنیک کارآمد برای توسعه فیلم‌های نازک فتوکاتالیستی را به عنوان یک سیستم بسته‌بندی فعال ارائه می‌دهد.

### منابع

- Ahvenainen, R., 1996, New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 179-187.
- Appendinia, P. & Hotchkiss, J. H., 2002, Review of antimicrobial food packaging, *Innovative Food Science and Emerging*, 3, 113-126.
- Arnoson, J. M., 1965, The Cell Wall. In: G. C. Ainsworth and A. S. Sussman (Eds.). *The Fungi*, New York: Academic Press, NY. 49-76
- Bartnicki-Garcia, S. 1973, Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. J. M. Ashworth and J. E. Smith (Eds.). *Microbial differentiation*, London: Cambridge University Press, UK. 245-267
- Brody, A., E. Strupinsky and L. Kline. 2001, *Active Packaging for Food Applications*. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co.
- Chai, Y. S., Lee J. C. & Kim, B. W., 2000, Photocatalytic disinfection of E. coli in a suspended TiO<sub>2</sub>/UV Reactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 17(6), 633-637.
- Chawengkijwanich, C. & Hayata Y., 2008, Development of TiO<sub>2</sub> powder-coated food packaging film and its ability to inactivate Escherichia coli in vitro and in actual tests. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 288-292.
- Cheng, Y. W., Chan R. C. Y. & Wong. P. K., 2007, Disinfection of Legionella pneumophila by photocatalytic oxidation. *Water Research*, 41, 842-852.
- Cho, M., Chung, H., Choi W. & Yoon, J., 2004, Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical



- concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Research*, 38 (4), 1069–1077.
- Costa, C., Conte, A., Buonocore, G. C., & Del Nobile, M. A., 2011, Antimicrobial silver-montmorillonite nanoparticles to prolong the shelf life fresh fruit salad. *International Journal of Food Microbiology*, 148 (3), 164–167.
- Del Nobile, M. A., Conte, A., Scrocco, C., Laverse, J., Brescia, I., Conversa, G., & Elia, A., 2009, New packaging strategies to preserve fresh-cut artichoke quality during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 10, 128–133.
- Duffy, E. F., Touati, F. A., Kehoe, S. C., McLoughlin, O. A., Gill L. W., & Gernjak, W., 2004, A novel TiO<sub>2</sub>-assisted solar photocatalytic batch-process disinfection reactor for the treatment of biological and chemical contaminants in domestic drinking water in developing countries. *Solar Energy*, 77 (5), 649–655.
- Fujishima, A., Hashimoto K., & Watanabe, T., 1999, TiO<sub>2</sub> Photocatalysis Fundamentals and Applications. Japan, Tokyo: Best Knowledge Center (BKC).
- Guimaraes, J. R., & Barretto. A. S., 2003, Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and Coliphages in water. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20 (4), 403–411.
- Hoffmann, M. R., S. T. Martin, W. Choi and D. W. Bahnemann. 1995. Environmental applications of semiconductor photocatalysis. *Chemical Reviews*. 95 (1): 69–96.
- Huang, Z., P. C. Maness, D. M. Blake, E. J. Wolfrum, S. L. Smolinski and W. A. Jacoby. 2000. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J Photochemistry and Photobiology A*. 130 (2–3): 163–170.
- Jeffery, B., Pepler, M., Lima, R. S., & McDonald A., 2009, Bactericidal effects of HVOF-sprayed nanostructured TiO<sub>2</sub> on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Thermal Spray Technology*, 19, 344–349.
- Kikuchi, Y., Sunada, K., Iyoda T., & Hashimoto, K., 1997, Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 106, 51–56.
- Kim, B., Kim, D., Cho, D., & Cho, S., 2003, Bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*, 52 (1), 277–281.
- Kubacka, A., Ferrer, M., Cerrada, M. L., Serrano, C., Sanchez-Chaves, M., & Fernandez-Garcia, M. 2009, Boosting TiO<sub>2</sub>-anatase antimicrobial activity: Polymer-oxide thin films. *Applied Catalysis B: Environmental*, 89, 441–447.
- Kuhn, K. P., Chaberny, I. F., Massholder, K., Stickler, M., Benz, V. W. & Sonntag, H. G., 2003, Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere*, 53 (1), 71–77.
- Labuza, T. P., & Breene, W. M., 1989, Application of active packaging for improvement of shelf-life and nutrition quality of fresh and extended shelf-life foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13, 1–69.
- Liu, H. L., & Yang, T. C. K., 2003, Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. *Process Biochemistry*, 39, 475–481.
- Makowski, A., & Wardas W., 2001, Photocatalytic degradation of toxins secreted to water by cyanobacteria and unicellular algae and photocatalytic degradation of the cells of selected microorganisms. *Current Topics in Biophysics*, 25(1), 19–25.
- Maneerat, C., & Hayata, Y., 2006, Antifungal activity of TiO<sub>2</sub> photocatalysis against *Penicillium expansum* in vitro and in fruit tests. *International Journal of Food Microbiology*, 107 (2), 99–103.
- Maness, P. C., Smolinski, S., Blake, D. M., Huang, Z., Wolfrum, E. J., & Jacoby, W.A., 1999, Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied Environmental Microbiology*, 65 (9), 4094–4098.
- Mangaraj, S., Goswami, T. K., & Mahajan, P. V., 2009, Applications of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables: a review. *Food Engineering Review* 1, 133–158.
- Matsunaga, T., & Okochi, M., 1995, TiO<sub>2</sub>-mediated photochemical disinfection of *Escherichia coli* using optical fibers. *Environmental Science Technology*, 29, 501–505.
- Matsunaga, T., Tomada, R., Nakajima, T., & Wake, H., 1985, Photochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *Fems Microbiology Letters*, 29 (1–2), 211–214.
- Matsunaga, T., Tomoda, R., Nakajima, T., Nakamura, N., & Komine, T., 1988, Continuous-sterilization system that uses photo semiconductor powders. *Applied Environmental Microbiology*. 54 (6), 1330–1333.
- Rahmani, A. R., Samadi, M. T., & Enayati Moafagh, A., 2008, Investigation of photocatalytic degradation of phenol by UV/TiO<sub>2</sub> process in aquatic solutions. *Journal of Health Research*, 8 (2), 55–60.
- Rooney, M. L., 1995, Active Food Packaging. Glasgow, UK: Blackie Academic and Professional.
- Saito, T., Iwase, T., & Morioka, T., 1992, Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO<sub>2</sub> on mutants streptococci. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14 (4), 369–379.
- Shieh, K. J., Li, M., Lee, Y. H., Sheu, S. D., Liu, Y. T., & Wang, Y. C., 2006, Antibacterial performance of photocatalyst thin film fabricated by defect effect in visible light. *Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2, 121–126.
- Sunada, K., Kikuchi, Y., Hashimoto, K., & Fujishima, A., 1998, Bactericidal and detoxification effects of TiO<sub>2</sub> thin film photocatalysts. *Environmental Science Technology*, 32 (5), 726–728.
- Tourmasa, V. H., Heeresb, J., & Burgessb, L., 2006, Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Short

- Communication *Food Microbiology*, 23, 684–688.
- Wist, J., Sanabria, J., Dierolf, C., Torres, W., & Pulgarin, C., 2002, Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 147 (3), 241–246.
- Yoshihiko, K., & Sunadaetal, K., 1997, Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 106, 51-56.
- Yu, B., Leung, K. M., Guo, Q., Lau W. M., & Yang, J., 2011, Synthesis of Ag–TiO<sub>2</sub> composite nano thin film for antimicrobial application. *Nanotechnology*, 22, 115603 (9 pp).
- Yu, J. G., Yu, H. G., Cheng, B., Zhao, X. J., Yu, J. C., & Ho, W. K., 2003, The effect of calcination temperature on the surface microstructure and photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> thin films prepared by liquid phase deposition, *Journal of Physical Chemistry B*, 107(50), 13871-13879.

## Control of microbial population using of nanocomposite film *in vitro* and *in vivo* tests

H. Bodaghi<sup>1\*</sup>, Y. Mostofi<sup>2</sup>, A. Oromiehie<sup>3</sup>, Z. Zamani<sup>2</sup>, B. Ghanbarzadeh<sup>4</sup>, Z. Ghasimi Hagh<sup>1</sup>

2014.02.12

2014.07.15

**Introduction:** Active and intelligent packaging devices and systems represent emerging technologies that may have profound implications on the quality, safety and integrity of packaged food and beverage products. It is well known that the photocatalyst titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), being a wide band gap (3.2 eV) semiconductor under UV illumination, generates energy-rich electron-hole pairs that can be transferred to the surface of TiO<sub>2</sub>, and promotes reactivity with the surface-absorbed molecules leading to the production of active radicals. These active radicals oxidize C-H bonds resulting in degradation of the organic molecules. TiO<sub>2</sub> photocatalyst has been used to degrade organic pollutants and inactivate a wide spectrum of microorganisms. To the best of our knowledge, there is no report on the photocatalytic disinfection properties of low density polyethylene (LDPE)-TiO<sub>2</sub> nanocomposite produced by extrusion. Therefore, in this study LDPE-TiO<sub>2</sub> nanocomposite film was prepared by a film blowing machine. The antimicrobial activity of the new packaging film against *Pseudomonas* spp. and *Rhodotorula mucilaginosa*, representing the main microorganisms on fruit and vegetable crops, was examined *in vitro* under UVA light. The antimicrobial property of the developed active film was also tested in a food application.

**Materials and methods:** LDPE -TiO<sub>2</sub> nanocomposite was prepared by the melt blending method. Modified TiO<sub>2</sub> (M-TiO<sub>2</sub>) powder obtained by mixing modified anatase and rutile phases in a weight ratio of 7:3 (total of 30 g), LDPE granules (935 g), PE-MA (30 g) and glycerol (5 g) were blended for 1 h using a mixer. The mixture was extruded by a Brabender twin-screw compounder (model DSE 20, Germany) for incorporating nanoparticles into the LDPE matrix. For LDPE and its nanocompounds, a constant temperature of 130 °C was used in all the zones of the extruder and the speed of the central screw was set to 120 rpm. The extrudate was cooled down in air at 23 ± 3 °C and pelletized. A composite LDPE-TiO<sub>2</sub> film with a thickness of 30 ± 3 μm was finally obtained by a film-blowing machine. The resulting film had a milky whitish appearance.

### *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity test of film

Each test film (6 cm diameter) was placed in sterilized petri dishes under aseptic conditions. One mL of each microorganism stock solution (containing approximately 10<sup>8</sup> and 10<sup>7</sup> CFU/mL for *Pseudomonas* spp. and *R. mucilaginosa*, respectively) was pipetted onto each test piece in its petri dish. Test samples were placed at a distance of 25 cm from six 8-WUVA black light bulbs. Samples were taken in three replicates at 60 min intervals for 3 h. Then, 9 mL of sterile saline solution was added to the petri dishes containing the test and polyethylene films and shaken for 180 s on a universal small shaker (IKA MS 3 digital, Germany). One milliliter of solution was withdrawn at each sampling event and diluted to 1/10, 1/100, 1/1000, and 1/10,000 with sterile saline solution. A volume of 0.1 mL of the undiluted and diluted solutions was plated over appropriate media. *Pseudomonas* agar base (PAB) was incubated at 25 °C for 48 h for *Pseudomonas* spp. and Sabouraud dextrose agar for *R. mucilaginosa* and the colony-forming units (CFU) were counted. For *in vivo* test, every 6 days, approximately 20 g of packed apricot pieces with nanocomposite films, were collected randomly and placed into 180 mL of saline solution and agitated in a stomacher bag for 120 s. Decimal dilutions were made in sterile saline solution and 0.1 mL of the undiluted and diluted solutions were plated.

**Results and discussion:** This work describes a TiO<sub>2</sub> nanocomposite thin film with biocidal capacity for food packaging that was prepared by the extrusion method. The film caused inactivation of *Pseudomonas* spp., *R.*

1- Department of Horticulture Science and Plant Protection, College of Agriculture, University of Shahrood, Shahrood, Iran

2- Department of Horticulture Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3- Iran Polymers and Petrochemical Institute, Tehran, Iran

4- Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

(\*-Corresponding Author Email: h.bodaghi@yahoo.com)

*mucilaginosa* and mesophilic bacteria in saline solution and on apricot when exposed to UVA light. The number of microorganisms on LDPE-TiO<sub>2</sub> nanocomposite film plus UVA light was lower than that on LDPE-TiO<sub>2</sub> nanocomposite film without UVA light and LDPE film exposed to UVA light. These results suggest that the TiO<sub>2</sub> nanoparticles were responsible for the antimicrobial effect when exposed to UVA light illumination. The higher antimicrobial activity of the composite films under UV light is due to the photocatalytic reaction of the TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the matrix. Thus, the prepared TiO<sub>2</sub> nanocomposite films are effective in diminishing live microorganisms and are promising as antimicrobial packages.

**Keywords:** TiO<sub>2</sub>, *Pseudomonas spp.*, yeast, Photocatalytic disinfection, Nanocomposite film, Food packaging.