



## تاثیر فیلم فعال حاوی هیبرید نانوهالوسیت رس/کارواکرول و کیتوزان بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا

حسین عراقی<sup>۱</sup>، سیمه رستگار<sup>۲</sup>، بهجت تاج‌الدین<sup>۳\*</sup>، محمد جوان نیکخواه<sup>۴</sup>، محمدعلی عسکری سرچشمه<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی پس از برداشت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- دانشیار گروه مهندسی صنایع غذایی و مسائل پس از برداشت، موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
- ۴- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
- ۵- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

چکیده	اطلاعات مقاله
<p>کاربرد نانو ذرات در بسته‌بندی مواد غذایی گام موثری در جهت کاهش ضایعات حاصل از عوامل بیماری‌زا و افزایش عمر انباری محصولات غذایی گوناگون است. هدف از اجرای این پژوهش، بررسی اثر ضد قارچی فیلم نانوکامپوزیت بر پایه پلی‌اتیلن سبک حاوی هیبرید نانوهالوسیت رس/کارواکرول و کیتوزان روی قارچ‌های <i>آسپرژیلوس نیجر</i>، <i>آسپرژیلوس فلاوس</i>، <i>بوتریتیس سینرا</i>، <i>پنی‌سلیموم</i> و <i>رایزوپوس اوریزا</i>، عامل اصلی پوسیدگی‌های پس از برداشت محصولات کشاورزی است. از این رو، فیلم‌های نانوکامپوزیتی پلی‌اتیلن سبک حاوی ۱/۵ و ۳ درصد نانو هالوسیت رس/کارواکرول، و ۱ و ۲ درصد کیتوزان با آمیزه‌سازی در اکسترودر دوماریچچه و از طریق دستگاه فیلم دمشی تولید و تاثیر ضد قارچی آن روی پنج گونه قارچ فوق ارزیابی شد. نتایج تجزیه واریانس مشخص کرد که میزان رشد پنج گونه قارچ موردبررسی، به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر استفاده از نانو هالوسیت رس/کارواکرول قرار دارد. بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به فیلم حاوی ۳ درصد نانو هالوسیت رس/کارواکرول بود. فیلم حاوی کیتوزان تاثیر معنی‌داری بر رشد قارچ‌های مورد مطالعه نداشت.</p>	<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۹۹ / ۰۷ / ۱۶</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰ / ۰۱ / ۱۴</p> <p>کلمات کلیدی:</p> <p>نانوهالوسیت رس، خواص ضد قارچی، کیتوزان، بسته‌بندی، اسانس روغنی.</p> <p><b>DOI: 10.29252/fsct.18.06.18</b></p> <p>* مسئول مکاتبات: <a href="mailto:b.tajeddin@areeo.ac.ir">b.tajeddin@areeo.ac.ir</a></p>

## ۱- مقدمه

تاثیر بر جوانه‌زنی و رشد اسپور قارچ‌های بیماری‌زا قادر به کنترل آنها هستند [۱۱ و ۱۲]. کیتوزان نیز یک پلیمر طبیعی است که بعد از حذف بخش عمده‌ای از گروه‌های استیل کیتین حاصل می‌شود و امروزه در صنایع پزشکی و دارویی به دلیل سازگاری زیستی بالا، خواص ضد میکروبی و ضد حساسیت اهمیت زیادی دارد [۱۳ و ۱۴].

با توجه به اهمیت بسته‌بندی در افزایش زمان نگهداری و کاهش ضایعات محصولات باغی در انبار، اهمیت روزافزون جایگزینی ترکیبات طبیعی به جای مواد ساختگی و اثر مثبت فناوری نانو روی بهبود خواص فیلم‌های بسته‌بندی، این مقاله به مطالعه تاثیر فیلم فعال تولیدی حاوی نانوهالوسیت رس/کارواکرول و کیتوزان بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا می‌پردازد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

برای تهیه فیلم، پلی‌اتیلن سبک با وزن مخصوص 0.92  $\text{g/cm}^3$  و شاخص جریان ذوب 2g/10min به صورت گرانول از شرکت ملی صنایع پتروشیمی در نقش پلیمر اصلی (شبکه پلیمری)، کارواکرول با خلوص ۹۸ درصد از شرکت مرک آلمان در نقش ماده فعال، نانوذرات هالوسیت رس با خلوص ۹۰ درصد و با قطر خارجی کمتر از 100 nm از شرکت Natural nano آمریکا در نقش محافظ و کپسوله کننده کارواکرول، و کیتوزان با وزن ملکولی متوسط ساخت شرکت سیگما خریداری شدند. جدایه‌های قارچ *Aspergillus flavus* کد: IBRC-M 30029، قارچ *Aspergillus niger* کد: IBRC-M 30064، قارچ *Rhizopus oryzae* کد: IBRC-M 30154، قارچ *Penicillium sp.* کد: IBRC-M 30044، و قارچ *Botrytis cinerea* کد: IBRC-M 30162 عامل اصلی پوسیدگی‌های پس از برداشت، از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت کشت فعال تهیه شد.

### ۲-۲- تهیه هیبرید نانو هالوسیت کارواکرول

برای تولید ترکیب نانوهالوسیت/کارواکرول (Halloysite nanotubes (HNTs)/carvacrol hybrid) نانو هالوسیت رس و کارواکرول به ترتیب به نسبت ۱ به ۲ [۱۵] با دستگاه هم‌زن برشی شرکت توسعه فناوری مافوق صوت (مدل WTW-DISPER D-8) ساخت ایران (واقع در دانشکده

امروزه تقاضا برای میوه‌هایی با کیفیت و ماندگاری بالا در حال افزایش بوده و استفاده از فناوری روز دنیا و نانو در صنایع غذایی، تولید، فرآوری، و حفظ و نگهداری محصولات نیز رو به گسترش است [۱]. بسته‌بندی مواد غذایی از جمله بسته‌بندی‌های قابل انعطاف، فعال، هوشمند و نانوکامپوزیت‌های پلیمری با هدف افزایش ماندگاری فرآورده‌های مختلف کشاورزی از کاربردهای اصلی فناوری نانو در علوم و صنایع غذایی است [۲]. پژوهشگران، انواع متفاوتی از پلیمرها را به عنوان فیلم پایه برای تولید این نوع بسته‌بندی‌ها بررسی می‌کنند. پلی‌اتیلن با طیف گسترده‌ای از خواص فیزیکی، در بسیاری از موارد کاربرد دارد. دلیل اساسی انطباق آن با کاربردهای گوناگون، در پیکربندی نیمه بلورین آن نهفته است که در کنترل متغیرهای مولکولی و فرایندی موثر است [۳]. پلی‌اتیلن با دانسیته پایین به دلیل انعطاف‌پذیری، شفافیت، پایداری حرارتی، قابلیت بازیافت و قابلیت فرآوری آسان و ارزان به طور گسترده برای بسته‌بندی مواد غذایی استفاده می‌شود [۴].

کاربرد نانوذرات در بسته‌بندی فرآورده‌های غذایی گوناگون می‌تواند گام موثری در جهت کاهش ضایعات و افزایش عمر انباری محصولات گوناگون باشد حضور نانوذراتی چون رس، نقره، دی‌اکسید تیتانیم، و اکسیدروی در نانوکامپوزیت‌های پلیمری سطح ویژه بالایی نسبت به ذرات در اندازه میکرو ایجاد می‌کند و این سطح ویژه بالا موجب بهبود برهم‌کنش بین پلیمر و نانو ذرات شده و خصوصیات بیروزی می‌دهد که از همان ذرات در مقیاس میکرو قابل دریافت نیست [۲].

هالوسیت، یک نانورس لوله‌ای با قطر خارجی ۱۹۰-۳۰ نانومتر و قطر داخلی ۱۰-۱۰۰ نانومتر [۵] با خاصیت ذاتی پرکاربرد در صنعت، سمیت کم، و سازگاری زیستی است [۶] که برای محافظت و انتشار کنترل شده اجزای فعال استفاده می‌شود [۷]. گرایش مصرف‌کنندگان به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در فرآورده‌های غذایی به دلیل اثرات نامطلوب نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت انسان، افزایش یافته و به همین دلیل، کاربرد ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند اسانس‌ها و کیتوزان [۸] مورد توجه است. کارواکرول، یکی از اجزای اصلی اسانس گیاهی در گیاهانی مانند پونه کوهی، آویشن و مرزنجوش بوده که خواص ضد میکروبی و ضد قارچی دارد و در گزارشات مختلف به آن اشاره شده است [۹ و ۱۰]. اسانس‌های گیاهی حاوی کارواکرول در فاز جامد و بخار با

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (Version 9.4) (Statistical Analysis System) صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح اطمینان ۹۹ درصد بررسی شد.

### ۳- نتایج و بحث

به‌منظور ارزیابی اثر ضد قارچی رهایش بخار کارواکرویل موجود در فیلم‌های پلی‌اتیلنی/نانو هالوسیت-کارواکرویل/کیتوزان، آزمایشی به‌صورت غیرمستقیم، روی پنج جدایه قارچ بیماری‌زا صورت گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشانگر تاثیر معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) نانو هالوسیت/کارواکرویل بر قطر کلونی و سرعت رشد هر پنج جدایه قارچ مورد مطالعه طی مدت اندازه‌گیری است (جدول ۱). گزارشات دیگری، خواص ضد میکروبی و ضد قارچی مواد طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی را در فیلم‌های کامپوزیتی تایید می‌کنند [۱۷ و ۱۶] و این در صورتی است که فیلم حاوی کیتوزان به تنهایی و به‌طور مسقیم تاثیری در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا نداشت (جدول ۱). این در صورتی است که از کیتوزان به‌عنوان حامل اسانس‌های گیاهی در تهیه پوشش برای حفظ کیفیت محصولات بهره گرفته می‌شود [۱۸]. در این حالت، کیتوزان از طریق نیروی الکترواستاتیک با سلول میکروب اتصال برقرار می‌کند و با تغییر نفوذپذیری غشاء، باعث نفوذ مواد فعال به درون سلول شده و در نتیجه باعث اختلال در فعالیت طبیعی سلول و مرگ آن‌ها می‌شود [۱۹]. علاوه بر کیتوزان، از نانو هالوسیت به‌عنوان عامل نگهدارنده و آزادکننده کنترل شده عوامل فعال یاد شده است [۲۰]. طی آزمایشاتی مشخص شده است که نانو هالوسیت باعث طولانی شدن مدت تاثیرگذاری شده و تاثیری بر خواص ضد قارچی کارواکرویل ندارد [۲۱]. اسانس‌های گیاهی دارای مکان‌های هدف مشخصی در سلول میکروب برای تاثیرگذاری هستند. غشاء داخلی سیتوپلاسم سلول منطقه اصلی تاثیرگذاری کارواکرویل گزارش شده است [۲۲]. ولی آنزیم‌ها و پروتئین‌های موجود در غشاء نیز ممکن است تحت تاثیر کارواکرویل قرار گیرند [۲۳]. مکانیزم تاثیر کارواکرویل به‌طور کامل مشخص نشده است اما مرگ سلول میکروب می‌تواند بنا به دلایلی چون تغییر ساختار و عملکرد غشاء، تغییر در ساختار اسید نوکلئیک، بهم خوردن تعادل متابولیسم سلولی، و انعقاد سیتوپلاسم و نشت مواد حیاتی سلول اتفاق بیفتد [۲۴]. برخی منابع گزارش کرده‌اند که کارواکرویل و دیگر ترکیبات

کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) در دو مرحله (برای جلوگیری از تجمع نانو هالوسیت) به کارواکرویل اضافه و سپس ترکیب حاصل به فاصله هر دو دقیقه با هم‌زن مخلوط شده و در نهایت کپسوله‌کردن کارواکرویل با نانو هالوسیت در دمای اتاق با دامنه پیوسته ۷۰٪ توسط دستگاه آلترا سونیک پروب شرکت توسعه فناوری مافوق صوت (مدل UHP-400) ساخت ایران (واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس) به مدت نهایی ۲۰ دقیقه انجام پذیرفت [۱۵].

### ۲-۳- تولید فیلم نانو کامپوزیت

پلی‌اتیلن سبک با نسبت‌های مشخص هیبرید نانو هالوسیت/کارواکرویل و کیتوزان با دستگاه اکسترودر دو ماریپچه Brabender (مدل ZSK-25) ناهمسو ساخت کشور آلمان با قطر خارجی ۲۵ میلی‌متر واقع در کارگاه پلاستیک پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران در دمای ۱۵۰ درجه سلسیوس ذوب و مخلوط شد. فیلم نهایی با دستگاه اکسترودر تک ماریپچه (مدل D-47055) ساخت کشور آلمان مجهز به سیستم فیلم دمشی، با ضخامت ۵۰ میکرون تولید گردید [۱۵].

### ۲-۴- خواص ضد قارچی فیلم

برای تعیین میزان بازدارندگی رشد قارچ از طریق فیلم فعال، از روش آزمون غیر مستقیم استفاده شد. برای این منظور، قطعات ۴×۴ میلی‌متر آگار کشت پنج روزه از جدایه‌های قارچ‌های مذکور در مرکز پلیت ۸ سانتی‌متری حاوی محیط کشت پتیتو دکستروز آگار (PDA 1%) قرار داده شد. نمونه‌های فیلم (به‌طور تقریبی ۲۵ میلی‌متر مربع) با چسب دو طرفه به بالای پلیت چسبانده شد و بعد از بستن در پلیت‌ها با پارافیلیم، آن‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی منتقل شدند. قطر کلونی‌های قارچ به‌صورت روزانه به مدت ۱۴۴ ساعت، اندازه‌گیری و سرعت رشد قارچ محاسبه گردید [۱۵].

### ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور بررسی تاثیر حضور نانو هالوسیت/رس/کارواکرویل و کیتوزان در شبکه پلی‌اتیلنی بر رشد پنج گونه قارچ بیماری‌زا، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل درصد‌های مختلف کیتوزان، فاکتور دوم شامل درصد‌های مختلف نانو هالوسیت/رس/کارواکرویل، فاکتور سوم شامل جدایه‌های قارچ و فاکتور چهارم زمان اندازه‌گیری بود. تجزیه و تحلیل

سلول دارد [۲۲]. گروه OH عامل اصلی آشفته‌گی سلول میکروب شناخته شده است. گزارش شده است کارواکرول برای جایگزین کردن H<sup>+</sup> با یون K<sup>+</sup> پیوند برقرار کرده و همین امر باعث حرکت یون‌های بیشتری به خارج سلول شده و کاهش یون K<sup>+</sup> در داخل سلول باعث ایجاد خسارت می‌شود [۲۲]. این احتمال هم وجود دارد ماهیت چربی‌دوستی کارواکرول این امکان را فراهم کند که توسط میسیلیوم قارچ جذب و از این طریق بر رشد قارچ تاثیر منفی بگذارد [۲۶].

فنولی به دلیل خاصیت آبگریز بودنشان با تاثیر روی گروه‌های فسفولیپیدی باعث کاهش سطوح داخلی pH، کاهش پتانسیل الکتروشیمیایی غشاء و در نتیجه کاهش سنتز ATP و افزایش هیدرولیز ATP می‌شود [۲۵]. با مطالعه تغییرات اسیدهای چرب غشاء مشخص شده است کارواکرول باعث افزایش اسیدهای چرب اشباع می‌شود که رابطه نزدیکی با سیالیت غشاء دارد و همین امر تغییر نفوذپذیری غشاء، نشت مواد سیتوپلاسمی و نهایتاً مرگ سلول را به دنبال دارد. مطالعات نشان داده است که نشت یون k<sup>+</sup> نقش تعیین کننده در مرگ

**Table 1** Analysis of variance of colony diameter and growth rate on the five fungal species.

(MS)										Df	Sources Change
<i>Rhizopus Oryzae</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus niger</i>			
Growth rate(%)	Colony diameter (mm)	Growth rate(%)	Colony diameter (mm)	Growth rate(%)	Colony diameter (mm)	Growth rate(%)	Colony diameter (mm)	Growth rate(%)	Colony diameter (mm)		
8568.5 <sup>**</sup>	14200.5 <sup>**</sup>	5342.2 <sup>**</sup>	8173.2 <sup>**</sup>	500.1 <sup>**</sup>	2209 <sup>**</sup>	1023.7 <sup>**</sup>	1343 <sup>**</sup>	15756.7 <sup>**</sup>	2281.56 <sup>**</sup>	3	Time(A)
1697.8 <sup>**</sup>	1243.4 <sup>**</sup>	987.1 <sup>**</sup>	1174.5 <sup>**</sup>	66 <sup>**</sup>	72.7 <sup>**</sup>	95.9 <sup>**</sup>	114.8 <sup>**</sup>	1539.3 <sup>**</sup>	184.34 <sup>**</sup>	2	NCH/carvacrol (B)
25.6 <sup>ns</sup>	18.2 <sup>ns</sup>	6.4 <sup>ns</sup>	6.6 <sup>ns</sup>	0.3 <sup>ns</sup>	0.6 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	0.8 <sup>ns</sup>	7.3 <sup>ns</sup>	0.28 <sup>ns</sup>	2	Chitosan(C)
290.7 <sup>**</sup>	218.8 <sup>**</sup>	186.6 <sup>**</sup>	388.8 <sup>**</sup>	9.3 <sup>**</sup>	19.4 <sup>**</sup>	17.7 <sup>**</sup>	39.2 <sup>**</sup>	260 <sup>**</sup>	57.43 <sup>**</sup>	6	A*B
4.4 <sup>ns</sup>	2.2 <sup>ns</sup>	1.1 <sup>ns</sup>	2.2 <sup>ns</sup>	0.3 <sup>ns</sup>	0.3 <sup>ns</sup>	0.3 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	3.6 <sup>ns</sup>	0.2 <sup>ns</sup>	6	A*C
27.1 <sup>ns</sup>	18.2 <sup>ns</sup>	11.7 <sup>ns</sup>	11.6 <sup>ns</sup>	1.6 <sup>ns</sup>	1.3 <sup>ns</sup>	3.7 <sup>ns</sup>	4.2 <sup>ns</sup>	35.4 <sup>ns</sup>	3.76 <sup>ns</sup>	4	B*C
5.7 <sup>**</sup>	2.7 <sup>**</sup>	1.8 <sup>**</sup>	2.5 <sup>**</sup>	0.4 <sup>**</sup>	0.4 <sup>**</sup>	0.8 <sup>*</sup>	1.7 <sup>**</sup>	7.2 <sup>**</sup>	0.94 <sup>**</sup>	12	A*B*C
0.4	0.1	0.3	0.1	0.2	0.1	0.4	0.1	0.9	0.02	72	Error
2.4	1.4	2.4	1.5	6.6	3.8	6.9	3.4	2.8	1.1		C.V

NS, \*, \*\*, Non-significant and significant at  $P < 0.05$ , and  $P < 0.01$ , respectively.

حاوی ۳ درصد نانوهالوسیت رس/کارواکرول باعث کاهش قطر کلونی و سرعت رشد تا ۵۰ درصد نسبت به فیلم پلی اتیلنی بعد از ۱۴۴ ساعت گردید که در این میان بیشترین (۵۴/۵ درصد) و کمترین (۲۸ درصد) کاهش سرعت رشد به ترتیب مربوط به گونه پنی سلیموم و رایزوپوس اوریزا بود. شکل ۱ نیز این موضوع را تایید می‌کند.

افزایش انشعابات میسیلیومی، چروکیدگی و مجعد شدن میسیلیوم‌ها و کاهش تولید اسپورها توسط برخی پژوهشگران هنگام استفاده از اسانس‌های حاوی کارواکرول به صورت تدخینی گزارش شده است [۲۷]. نتایج مشابهی نیز توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است [۲۸، ۲۱، ۱۵]. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، استفاده از فیلم

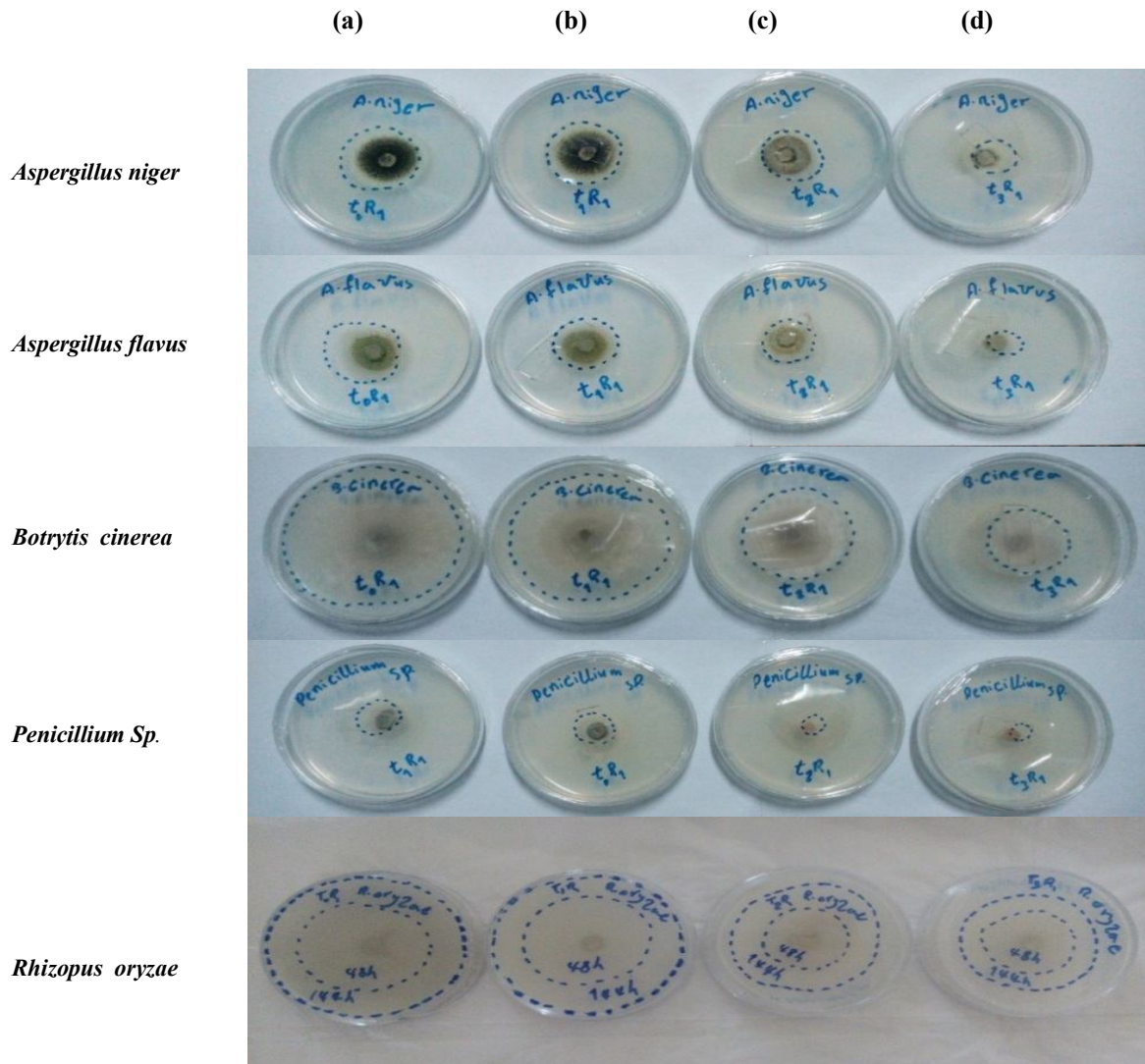
**Table 2** The mean values of effect Nano Clay Halloysite (NCH) /carvacrol and chitosan on the colony diameter and growth rate of five fungi species following 144 h of incubation at 25°C in darkness.

<i>Rhizopus Oryzae</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Penicillium sp.</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus niger</i>		Chitosan	NCH /carvacrol
Growth rate(%)	Colony diameter(mm)	Growth rate(%)	Colony diameter(mm)	Growth rate(%)	Colony diameter(mm)	Growth rate(%)	Colony diameter(mm)	Growth rate(%)	Colony diameter(mm)		
0.490 <sup>a</sup>	70.53 <sup>a</sup>	0.417 <sup>a</sup>	60.23 <sup>a</sup>	0.110 <sup>b</sup>	15.40 <sup>b</sup>	0.173 <sup>a</sup>	25.1 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	0	
0.467 <sup>bc</sup>	67 <sup>b</sup>	0.400 <sup>b</sup>	57.30 <sup>b</sup>	0.097 <sup>c</sup>	14 <sup>b</sup>	0.170 <sup>a</sup>	24.3b	0.2 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	1	0
0.453 <sup>cd</sup>	65.40 <sup>c</sup>	0.380 <sup>c</sup>	55 <sup>c</sup>	0.090 <sup>c</sup>	13.2 <sup>c</sup>	0.163 <sup>bd</sup>	23.5 <sup>c</sup>	0.2b	29 <sup>b</sup>	2	
0.383 <sup>f</sup>	55.34d	0.303 <sup>dh</sup>	43.87 <sup>d</sup>	0.067 <sup>def</sup>	9.45 <sup>d</sup>	0.140 <sup>cd</sup>	20.54 <sup>d</sup>	0.177 <sup>d</sup>	25 <sup>c</sup>	0	
0.370 <sup>de</sup>	53.70e	0.293 <sup>hi</sup>	42.40 <sup>e</sup>	0.060 <sup>de</sup>	9.10 <sup>d</sup>	0.130 <sup>cd</sup>	18.7 <sup>e</sup>	0.16 <sup>f</sup>	23 <sup>c</sup>	1	1.5
0.370 <sup>de</sup>	53e	0.280 <sup>j</sup>	40 <sup>f</sup>	0.060 <sup>de</sup>	8.70 <sup>ef</sup>	0.123 <sup>cd</sup>	17.75 <sup>f</sup>	0.17 <sup>e</sup>	24 <sup>d</sup>	2	
0.353 <sup>hi</sup>	50.56g	0.213 <sup>o</sup>	30.54 <sup>k</sup>	0.050 <sup>h</sup>	7.43 <sup>h</sup>	0.090 <sup>d</sup>	13.21 <sup>k</sup>	0.12 <sup>i</sup>	17 <sup>f</sup>	0	
0.353 <sup>hi</sup>	51f <sup>g</sup>	0.227 <sup>n</sup>	32.40 <sup>j</sup>	0.060 <sup>de</sup>	8.40 <sup>de</sup>	0.103 <sup>gh</sup>	15 <sup>h</sup>	0.13 <sup>h</sup>	18.5 <sup>e</sup>	1	3
0.360 <sup>dh</sup>	51.60f	0.230 <sup>m</sup>	33 <sup>hi</sup>	0.057 <sup>gh</sup>	8 <sup>e</sup>	0.113 <sup>ghi</sup>	16.5 <sup>e</sup>	0.13 <sup>h</sup>	19 <sup>f</sup>	2	

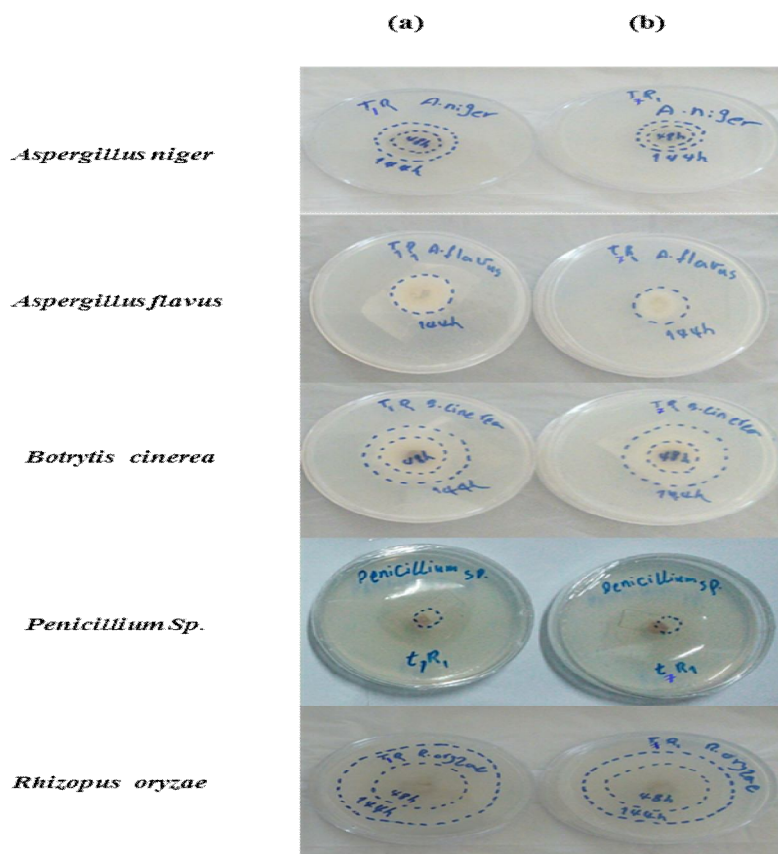
Means in each column with similar letters are not significantly different ( $P < 0.01$ ) using the Least Significant Different (LSD) test.

ارتباط مستقیم با محصول یا عامل بیماری‌زا، در شرایط آزمایشگاهی تأثیری بر رشد عوامل میکروبی نداشته است. شکل ۱، به‌طور خلاصه و جامع، تأثیر نانوهالوسیت‌رس/کارواکرول را در کنترل رشد و توسعه قارچ‌های بیماری‌زا به وضوح نشان می‌دهد. این در صورتی است که کیتوزان در هیچ یک از زمان‌های اندازه‌گیری، تأثیری بر صفات مورد مطالعه نداشت (جدول ۱ و شکل ۲).

همان‌طور که بالاتر ذکر شد، کارایی کارواکرول به‌صورت رهائش در فاز بخار قابل توجه است. در مورد کیتوزان نیز مطالعات قبلی نشان داده است که پوشش‌دهی محصولات با کیتوزان، با تأثیر گذاشتن بر تولید اتیلن، انتقال اکسیژن، کاهش آلودگی میکروبی از طریق برهم‌کنش نیروهای الکترواستاتیک، بهبود خواص آنتی‌اکسیدانتی، و حفظ کلروفیل باعث حفظ کیفیت و افزایش عمر انباری آن‌ها می‌شود [۲۹]. این در صورتی است که کیتوزان در حالت غیرمستقیم، یعنی بدون



**Fig 1** Characteristic images of in vitro headspace assay for different films including (a) without LDPE (b) neat LDPE (c) LDPE/1.5% NCH/carvacrol, and (d) LDPE/3% NCH /carvacrol on the development of *A. niger*, *A. flavus*, *B. cinerea*, *penicillium. Sp* and *R. oryzae* following 144 h of incubation at 25°C in the dark. Fungi colony margins are marked for clarity.



**Fig 2** Characteristic images of in vitro headspace assay for different films including (a) neat LDPE, (b) LDPE /2% chitosan on the development of *A. niger*, *A. flavus*, *B. cinerea*, *penicillium. Sp* and *R. oryzae* following 144 h of incubation at 25<sup>0</sup>C in the dark. Fungi colony margins are marked for clarity.

پنی سلیموم جلوگیری کند. استفاده از نانوذرات هالوسیت در ترکیب فیلم پلی اتیلن سبک/ نانو هالوسیت رس/ کارواکرول و کیتوزان، با حفظ و رهایش تدریجی کارواکرول، قدرت مهارکنندگی کارواکرول را افزایش می دهد. در مقابل، کیتوزان موجود در فیلم نتوانست تاثیر معنی داری بر مهار رشد قارچ های بیماری زا در آزمون غیرمستقیم داشته باشد. بر اساس یافته های این پژوهش، فیلم های نانوکامپوزیتی حاوی ۳ درصد نانو هالوسیت/ کارواکرول بهترین تیمار برای کنترل قارچ های مذکور هستند.

#### ۵- منابع

[1] Rahchamani, M., Hadadkhodaparast, M., and Sedaghat, N. 2015. Effect of edible coating of chitosan and native corm gum on improving quality and increasing shelf life of cherries. Master's Degree in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

#### ۴- نتیجه گیری

با توجه به نگرانی فزاینده عموم مردم و دانشمندان علوم تغذیه در مورد اثرات سوء مواد شیمیایی نگهدارنده، لزوم توجه بیشتر به استفاده از مواد طبیعی برای نگهداری محصولات کشاورزی بیش از پیش احساس می شود. میوه های تازه پس از برداشت به دلیل های مختلف چروکیده شده و درخشش خود را از دست می دهند، و طی مدت نگهداری مستعد فساد میکروبی بوده و مدت ماندگاری آنها کاهش می یابد. از این رو، امروزه کاربرد مواد طبیعی نگهدارنده مانند اسانس های گیاهی و نانورس به عنوان مکمل و مسبب افزایش کارایی اسانس ها برای حفظ کیفیت محصولات تازه، ممانعت از رشد میکروبی، و افزایش مدت ماندگاری آنها پیشنهاد می شود. نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که کارواکرول در صورت استفاده در فاز بخار، قابلیت کنترل رشد عوامل بیماری زا را دارد بطوری که استفاده از کارواکرول به میزان ۲ درصد در فیلم پلی اتیلنی توانست تا ۵۰ درصد از رشد گونه

- Antimicrob. Agents Chemother. 54, 5062–5069.
- [11] Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., and Nerin, C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6939–6946.
- [12] Shin, M.H., Kim, J. H., Choi, H.W., Keum, Y.S, and Chum, S.C. 2014. Effect of Thymol and Linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. *Mycobiology.* 42(3): 262–268.
- [13] Weiss, J., Takhistov, P., and McClement, J. 2006. Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science,* 71: 107-116.
- [14] Rinaudo, M. 2008. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International.* 57(3):397-430.
- [15] Shemesh, R., Krepkera, M., Nitzanc, N., Vaxmanb, A., and Segala, E., 2016. Active packaging containing encapsulated carvacrol for control of postharvest decay. *Postharvest Biology and Technology,* 118: 175-182.
- [16] Cindi, M.D., Taofik, S., Dharini, S., Silvia, B. 2015. Chitosan boehmite-alumina nanocomposite films and thyme oil vapour control brown rot in peaches (*Prunus persica* L.) during postharvest storage. *Crop Protection,* 72: 127-131.
- [17] Pelissari, F.M., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F., Pineda, E.A.G. 2009. Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *J. Agric. Food Chem,* 57: 7499-7504.
- [18] Sozaa, V., Peris, J., Vieraa, E., Coelhosob, I., Duartea, M., and Fernandez, A. 2019. Activity of chitosan-montmorillonite bionanocomposites incorporated with rosemary essential oil: From in vitro assays to application in fresh poultry meat. *Food Hydrocolloids,* 89: 241–252.
- [19] Xing, Y., XU, Q., Li, X., Chen, C., Ma, L., Li, Sh., Che, Z and Lin, H. 2016. Chitosan-Based Coating with Antimicrobial Agents: Preparation, Property, Mechanism, and Application Effectiveness on Fruits and Vegetables. *International Journal of Polymer Science,* Article ID 4851730, 24 pages.
- [20] Lvov, Y., Wang, W., Zhang, L., and Fakhrullin, R. 2015. Halloysite clay
- [2] Mohammed, F.A., Balaji, K., Girilal, M., Kalaichelvan, P.T., and Venkatesan, R. 2009. "Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation, " *Journal Agriculture Food Chemistry,* 57: 6246-6252.
- [3] Peighambardoust, S.H., Dehghani, S., Peighambardoust, S.J. 2012. Preparation and study of physical, mechanical, and antimicrobial properties of lightweight polyethylene nanocomposite films containing nanoparticles Silver, zinc oxide, and copper oxide *Iranian Journal of Biosystems Engineering,* 46(4): 347-354.
- [4] Del Nobile, M., Conte, A., Buonocore, G., Incoronato, A., Massaro, A., and Panza, O. 2009. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering.* 93(1):1-6.
- [5] Amini, F., Moshtaghi, H., and Abasvali, M. 2016. Antibacterial effect of methanolic extract of clover (*Eryngium caeruleum*) on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* in a food model at 4°C. 3rd International Conference on Science and Engineering, Istanbul – Turkey.
- [6] Yah, W.O., Xu, H., Soejima, H., Ma, W., Lvov, Y., Takahara, A., 2012. Biomimetic dopamine derivative for selective polymer modification of halloysite nanotube lumen. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12134–12137.
- [7] Lvov, Y.M., Shchukin, D.G., Mohwald, H., Price, R.R., 2008. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents. *ACS Nano* 2: 814–820.
- [8] Halevas, E., Christiane M., Evanthia, N., Vasileios Varsamis, C., Eleftheriadou, D., Graham, E., Georgios Litsardakis, J., Lazari, D., Ypsilantis, K., and Salifoglo, A. 2017. Chitosan encapsulation of essential oil "cocktails" with welldefined binary Zn(II)- Schiff base species targeting antibacterial medicinal nanotechnology. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 10(6), 1-15.
- [9] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 446-475.
- [10] Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., Rao, R., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway.

- [26] Soyly, E.M., Soyly, S., and Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161: 119-128.
- [27] Vesaltalab, Z., and Gholami, M. 2011. The effect of clove buds and rosemary extracts and essences on control of *Botrytis cinerea* growth. *Iranian Plant production tech*, (11) 2: 1-11.
- [28] Shemesh, R., Krepker, M., Natan. M., Danin-Poleg, Y., Banin, E., and Kashi, Y. 2015. Novel LDPE/halloysite nanotube films with sustained carvacrol release for broad-spectrum antimicrobial activity. *RSC Adv*, 5: 87108-87117.
- [29] Chao, D., Meng, X., Meng, J., Hassan, I., Dai, L., and Ni, Y. 2019. Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 4(1): 11-21.
- nanotubes for loading and sustained release of functional compounds. *Adv. Mater.* n/a-n/a.
- [21] Ramos M., Jimenez A., Peltzer M. 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *J. Food Eng*, 109-513.
- [22] Marinelli, L., Di Stefano, A., and Cacciatore, I. 2018. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents *Phytochem Rev*, 17:903–921.
- [23] Radulovic', N.S., Blagojevic'. P.D., Stojanovic'-Radic' Z.Z., and Stojanovic', N.M. 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem*, 20:932–952.
- [24] Sikkema, J., de Bont, J.A., and Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 59:201-222.
- [25] Ben Arfa, A., Combes, S., and Preziosi-Belloy, L. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiolm* 43:149–154.





## Short Note

## The effect of active film containing nano clay halloysite/carvacrol hybrid and chitosan on the growth of pathogenic fungi

Araghi, H. <sup>1</sup>, Rastegar, S. <sup>2</sup>, Tajeddin, B. <sup>3\*</sup>, Javan-nikkhah, M. <sup>4</sup>,  
Asghari- Sarcheshmeh, M. A. <sup>5</sup>

1. Ph.D. student, post-harvest physiology and technology, Department of Horticultural Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
2. Associate Prof., Department of Horticultural Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
3. Associate Prof., Agricultural Engineering Research Institute (AERI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Associate Prof., Department of Horticultural Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
5. Prof., Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

**Article History:**

Received 2020/ 10/ 07  
Accepted 2021/ 04/ 03

**Keywords:**

Nano clay Halloysite,  
Antifungal properties,  
Chitosan,  
Packaging,  
Essential oil.

**DOI: 10.29252/fsct.18.06.18**

\*Corresponding Author E-Mail:  
[b.tajeddin@areeo.ac.ir](mailto:b.tajeddin@areeo.ac.ir)

Use of nanoparticles in food packaging can be an effective step to reduce waste from pathogens and increase the shelf life of various products. The aim of this study was to investigate the antifungal effect of low-density polyethylene nanocomposite film containing nano clay halloysite/carvacrol hybrid and chitosan on pathogenic fungi including *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinera*, *Penicillium Sp.* and *Rhizopus oryzae*, the main cause of post-harvest rot of agricultural products. In this study, the nanocomposite films based on Low-density polyethylene containing 1.5 & 3% nano clay halloysite/carvacrol and 1 & 2% chitosan were produced by mixing them in a twin-screw extruder following by blowing film machine. The effect of these produced nanocomposites were then evaluated on the growth of five pathogenic fungal species. Based on the results of analysis of variance, it was found that the growth rate of the five studied fungal species was significantly affected by use of Nano clay Halloysite/carvacrol, so that the highest percentage of inhibition was related to the film containing 3% nano clay halloysite/carvacrol. However, the film containing chitosan had no significant effect on the growth of the studied fungi.