

דיווח מפורט לתכנית מחקר מספר 421-0230-14

דוח מסכם לשלוש שנים

פיתוח חומרים בטוחים לאריזות מזון בעלות תכונות אנטימיקרוביאליות בעזרת קישור קוולנטי של מלחי אמוניום רבעוניים

Development of Safe Materials for Antimicrobial Food Packing Using Covalent Linkage of Quaternary Ammonium Salts

הדו"ח מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ופיתוח הכפר ע"י

ילנה פוברנוב-חוקרת ראשית חקר איכות מזון ובטיחותו, מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני משה שמש, וורדה זקין-חקר איכות מזון ובטיחותו, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

Elena Poverenov (elenap@volcani.agri.gov.il), Moshe Shemesh (moshesh@agri.gov.il), Varda Zakin (veredz@agri.gov.il). Food Quality and Safety Department, ARO, The Volcani Center, P.O.B. 6, Bet Dagan 50250.

תקציר

הצגת בעיה. גורמים מיקרוביאליים תוקפים מזון ויש צורך בחומרים מגנים. היום המגמה העולמית היא להימנע מתוספת חומרים אנטימיקרוביאליים למזון. מטרות המחקר שיפור בטיחות והארכת חיי המדף של מזון ארוז בעזרת פיתוח של אריזות אנטימיקרוביאליות פעילות במגע. שיטות עבודה (1) פיתוח תהליכים סינטטיים פשוטים ואוניברסאליים לקישור קוולנטי של חומרים אנטימיקרוביאליים לחומרי אריזה שונים. (2) אפיון של החומרים החדשים בשיטות מתקדמות. (3) בדיקת פעילות החומרים עם חיידקים G+/G-. (4) חשיפת החומרים לתנאי סביבה שונים כדי להבטיח יציבותם. תוצאות עיקריות פתחנו מהלך חד-שלבי שאפשר הענקת תכונות אנטימיקרוביאליות לפולימר אריזה סינטטי PVA, צלולזה זכוכית. בצענו אפיונים לחומרים שקיבלנו, הוכחנו פעילותם נגד 4 סוגי חיידקים ובדקנו יציבותם בתנאי pH וטמפרטורות שונים. בנוסף פיתחנו שיטה למודיפיקציות של חומרי אריזה בעלות קבוצות הלוגן כגון פוליוניל כלוריד PCV. המשכנו עם הרעיון והצלחנו לממש אותו גם על פולימרי פלסטיק שאין להם קבוצות פונקציונליות, כגון פוליאטילן ופוליסטירן. הפולימרים האלו מהווים חומרים הנפוצים ביותר באריזות מזון. פתחנו גישה בטוחה ויעילה לאקטיבציית פני שטח של פוליאטילן ופוליסטירן בעזרת אוזנוליזה. לאחר אקטיבציה הצלחנו לקשור לפולימרים האלו מלח אמוניום רבעוני אנטימיקרוביאלי. החומרים הראו פעילות נגד 3 סוגים של חיידקים ואופיינו במגוון של שיטות ספקטרוסקופיות ומיקרוסקופיות מתקדמות הכוללות XPS, FTIR, AFM, SEM. חומרים חדשים שפתחנו נבדקו גם על מודל מזון והראו פעילות. מסקנות והמלצות. חומרי אריזה אנטימיקרוביאליים פעילי מגע יכולים לתרום לשיפור

בטיחות מיקרוביאלית והארכת חיי מדף של מזון ארוז. בתוכנית זו הצלחנו לפתח גישות שונות למודיפיקציה של מגוון חומרים הרלוונטיים לאריזות מזון. מודיפיקציה של פולימרי פלסטיק לא הובטחה בתוכנית מקורית והיא תוספת רצינית שהופכת את הגישה לכללית יותר ואטרקטיבית לתעשייה. כדי לקדם את היישום, בתוכניות הבאות יש לבחון באופן מעמיק את היכולת של החומרי החדשים שפתחנו להאריך את חיי המדף של מוצרי מזון שונים. אנו מצפים כי הממצאים הנוכחיים יתרמו ליישום של הגישה החדשה והיא תמצא שימוש בהבטחת בטיחות מזון.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. ד"ר ויקטור רודוב, חקר אחסון ואיכות תוצרת חקלאית ומזון, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
2. ד"ר זאב שמילוביץ', המכון להנדסה חקלאית, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
3. פרופ' עוזי רביד, מינהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נווה יער.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר



תאריך:

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר:

- 1) E. Poverenov. (2012) Contact Active Antimicrobial Materials for Food Packaging. Chemical Reaction in Food, Prague, Czech. Lecture.
- 2) E. Poverenov, M. Shemesh, A. Gulino, V. Zakin, R. Granit, (2013). Durable Contact Active Antimicrobial Materials Formed by a One-Step Covalent Modification of Polyvinyl Alcohol, Cellulose and Glass. *Colloids Surf. B.* 112, 356.
- 3). T. Fadida, Y. Kroupitski, U. M. Peiper, S. Sela, E. Poverenov (2014). Antimicrobial Polyethylene and Polystyrene by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. The International Meeting of the Israel Chemical Society, Israel. Poster
- 4) T. Fadida, Y. Kroupitski, U. M. Peiper, S. Sela, E. Poverenov (2014). Air-Ozonolysis to Generate Contact Active Antimicrobial Surfaces: Activation of Polyethylene and Polystyrene Followed by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. *Colloids Surf. B.* 122, 294.
- 5) E. Poverenov. Contact Active Antimicrobial Materials by Covalent Linkage (2015). The International Meeting of the Israel Chemical Society, Israel. Lecture.

מבוא

מיקרואורגניזמים התוקפים תוצרת חקלאית ומזון מעובד גורמים להשחתתו ועשויים לעורר מחלות בבני אדם הצורכים מזון זה. שימור מזון נעשה כיום ע"י הוספת חומרים אנטימיקרוביאליים המעכבים התפתחות מיקרואורגניזמים ומאריכים את חיי המדף של המזון. היום ברור ששימוש נרחב בחומרים משמרים גורם למספר בעיות רציניות כגון נזקי בריאות של הציבור שצורך כמות מרובה של חומרים כימיים, התפתחות של עמידות אצל פתוגנים וזהום הסביבה. לפיכך, כעת המגמה העולמית היא להימנע ככל האפשר מהוספה של חומרים משמרים לתוך המזון ויש צורך בגישות אלטרנטיביות הבטוחות יותר.^{2,1}

שטח הפנים של המזון (או התוצרת) הוא האזור הראשוני והעיקרי בו מתפתחים גורמי הנזק.^{4,3} לפיכך מגע של מזון עם "אריזה מונעת נזק" ימנע התפתחות מיקרואורגניזמים באזור רגיש זה.^{6,5} בשנים אחרונות פותחו חומרים לאריזות מזון שבהן מרכיבים אנטימיקרוביאליים מעורבלים עם חומר האריזה או נכללים במערכות אינקפסולציה שתולות אל תוך מטריצה של האריזות.^{8,7} הביקורת לגישות הללו היא בכך שקשה לשלוט על פעילות של המרכיבים האנטימיקרוביאליים ויש סיכון של שחרור שלהם והכנסתם אל תוך המזון. בפרויקט זה אנחנו הצענו גישה חדשנית לאריזות מזון "מונעות נזק". הגישה מציעה קישור קוולנטי בלתי הפיך של מרכיב האנטימיקרוביאלי לאריזת המזון.

בעקבות הבעיה של שחרור מסיבי של חומרים אנטימיקרוביאליים בשנים אחרונות התחילה להתפתח קונצפציה חדשה של חומרים פעילים במגע - contact active concept.⁹ בתפיסה זו, חומר אנטימיקרוביאלי קשור באופן חזק ובלתי הפיך למשטח בעת שהאתר הפעיל שלו נשאר חשוף ופועל לחיטוי של פתוגנים המתקרבים. לגישה זו יש יתרונות. חומר פעיל לא משתחרר וכתוצאה מכך לא מזהם את המוצר ואת הסביבה. בנוסף לכך החומר הפעיל ממשיך להיות פעיל בצורה קטליטית ולכן נדרשות כמויות מופחתות ממנו - דבר המהווה יתרון אקולוגי עצום. קונצפציה של "חומרים פעילים במגע" זוכה לתשומת לב רבה, אך בשלב זה הגישה הצעירה סובלת מחוסר אוניברסאליות ומורכבות סינתטית. כעת רוב החומרים הפעילים במגע שדווחו התקבלו בתהליך סינטטי רב-שלבי.^{12,11,10} וייחודי לחומר הספציפי^{14,13} ולכן הקונצפט היום הוא בעל אפליקציה בעיקר בתחום רפואי. למען יישום הגישה גם בתחום המזון תהליך של קבלת חומר בסיס לאריזת מזון צריך להיות פשוט ואוניברסאלי המאפשר כדאיות כלכלית ושימוש מורחב.

מלחי אמוניום רבעוניים (Quaternary Ammonium Salts) מהווים חומרים אנטימיקרוביאליים עם ספקטר פעילות מקיף גם כנגד בקטריות וגם כנגד פטריות.¹⁵ למלחי אמוניום רבעוניים יש שימוש נרחב בתחומי ניקוי, מזון, רפואה וקוסמטיקה. עקב פולאריות גבוהה למלחי אמוניום יש ספיגה נמוכה במערכת עיכול והם מופרשים מגוף. לכן הם מורשים ב-FDA ויש בהם שימוש במוצרים שבאים במגע ישירה עם מוצרי מזון ומערכת עיכול.^{17,16}

למשל, benzalkonium chloride ו- cetylpyridinium chloride מלחי אמוניום רבעוניים מהווים חומרים משמרים בטיפות אף, ספריי לגרון, שטיפות פה ומשחות שיניים. למרות שמלחי אמוניום רבעוניים מורשים לשימוש בריכוזים נמוכים היום יש יותר ויותר מודעות לכך שהכנסתם לגוף אינה רצויה ובריכוזים גבוהים הם אפילו רעילים מאוד.¹⁸ לכן שיטה שמצד אחד תאפשר מימוש פעילות אנטימיקרוביאלית של מלחי אמוניום ומצד שני תמנע את השחרור שלהם למזון רצויה מאוד.

במחקר זה אנחנו בצענו קישור קוולנטי של מלחי אמוניום רבעוניים לחומרים שהם לרבנטיים לאריזת המזון. שאפנו לענות על דרישות הכרחיות למימוש של אריזת מזון אנטימיקרוביאליות הפעילות במגע שהן: קישור של מרכיב פעיל בתהליך סינטטי פשוט ואוניברסאלי למגוון של חומרי אריזה, קישור חזק המבטיח בטיחות של האריזה, קישור שמשאיר אתר פעיל פתוח ומאפשר פעילות אנטימיקרוביאלית של האריזה.

מטרות המחקר

מטרתו הכללית של המחקר היא שיפור של בטיחות והארכת חיי המדף של מזון ארוז בעזרת פיתוח של אריזות אנטימיקרוביאליות פעילות במגע.

מטרות המפורטות הן כדלקמן:

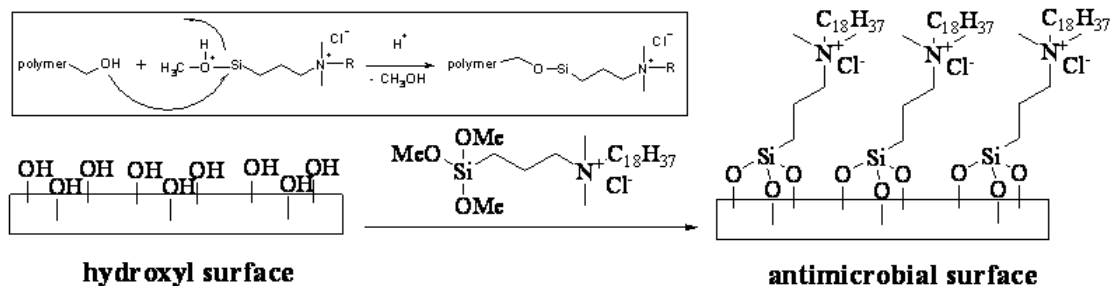
- 1) לפתח שיטות קישור של חומר פעיל בתהליך סינטטי פשוט (עדיף חד שלבי).
- 2) לפתח שיטות קישור אוניברסאליות של חומר פעיל למגוון של חומרי אריזה.
- 3) לאפיין חומרי אריזה חדשים שנקבל בשיטות כימיות הכוללות אפיונים ספקטראליים.
- 4) לבחון יציבות הקישור של מלחי אמוניום בתנאים שונים של טמפרטורה ו- pH כדי להבטיח בטיחות האריזה.
- 5) לבחון פעילות אנטימיקרוביאלית של חומרי אריזה *in vitro* ולוודא שפעילות אנטימיקרוביאלית של מלח אמוניום נשמרה גם לאחר קישורו לחומר אריזה.
- 6) לבחון יכולת של חומרי האריזה החדשים להאריך את חיי המדף של מוצרי מזון.

פירוט עקרי הניסויים

קישור של מלחי אמוניום רבעוניים לחומרי אריזה בעלי קבוצות הידרוקסיליות

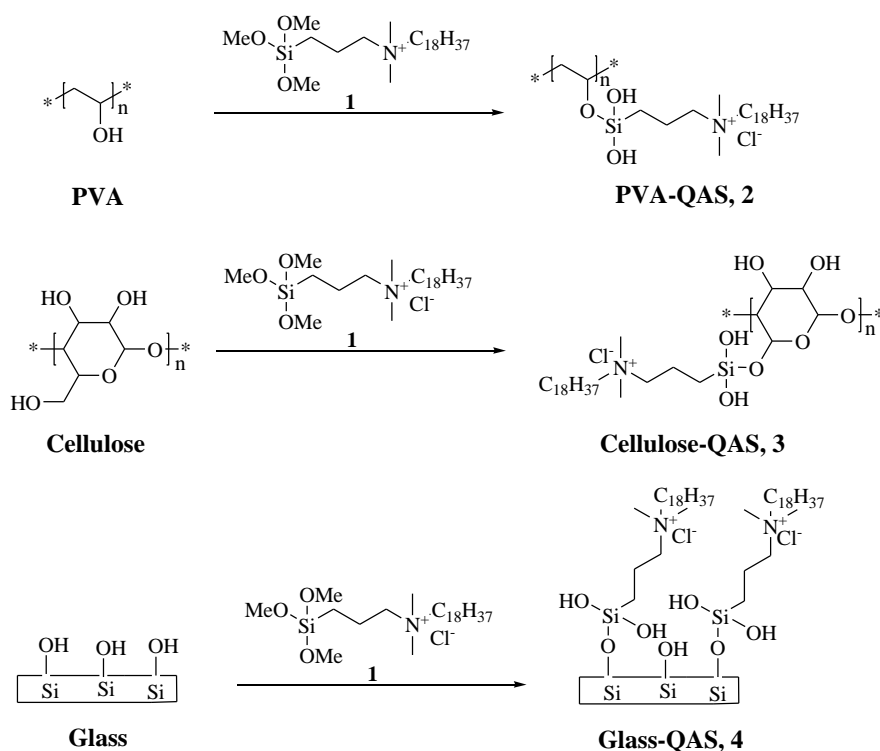
הצלחנו לפתח גישה אוניברסלית חד-שלבית לקישור של מלחי אמוניום רבעוניים לחומרי אריזה בעלי קבוצות הידרוקסיליות.

העבודה פורסמה בעיתון מדעי Colloids and Surfaces B, Biointerfaces (IF 4.2).¹⁹ השתמשנו ב trimethoxysilylpropyl (octadecyldimethyl) ammonium chloride. QAS 1. מלח אמוניום רבעוני בעל קבוצת $\text{Si}(\text{OMe})_3$ שניתנת להתקפה על ידי קבוצות הידרוקסיליות של חומר אריזה לקבלת קשר קוולנטי משולש חזק Si-O (איור 1).



איור 1. יצירת קשר קוולנטי משולש בין מלח אמוניום רבעוני וחומר אריזה.

הצלחנו להפעיל את הגישה על 3 סוגים שונים של חומרים רלוונטיים לאריזות מזון הכוללים (2) PVA (פוליוניל אלכוהול) פולימר אריזה סינטטי נפוץ, (3) צלולזה- חומר בסיס לאריזות נייר ובד ו-(4) זכוכית- חומר אריזה נפוץ מאוד במיוחד למזון נוזלי (איור 2).

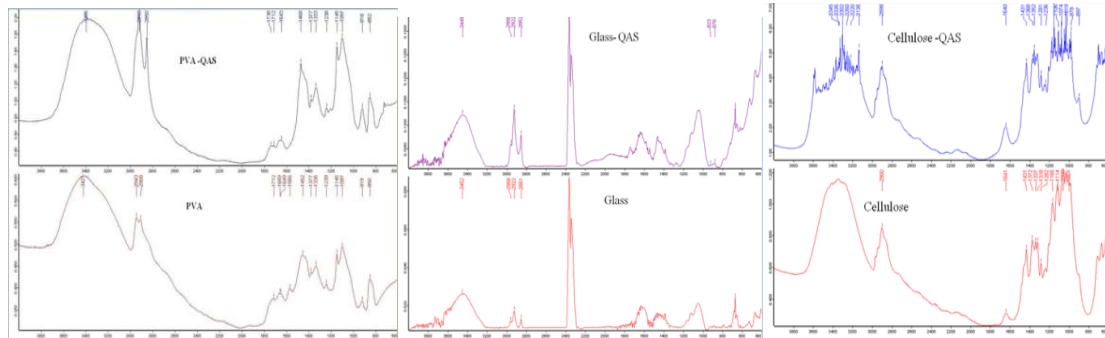


איור 2. סינתזה חד-שלבית המביאה למגוון חומרי אריזה אנטימיקרוביאליים פעילים במגע.

התגובות עם PVA וצלולזה התרחשו בסביבה מימית בטמפרטורת החדר תוך כדי ערבוב במשך 48 שעות בנוכחות כמות אקווימולרית של QAS 1 (לפי חישוב של יחס ליחידת מונומר). הוספנו גם כמות קטליטית של חומצה אצטית כדי להקל על התקפה נוקלאופילית (pH = 4). התגובה עם זכוכית התרחשה בחימום של 110 °C בממס אורגני טולואן במשך 8 ימים (אלו התנאים המופעלים בתהליך הסילילציה, תהליך עיבוד זכוכית ידוע שעקרונות סינטטיים שלו דומים לתגובה שלנו). אנליזה אלמנטארית (C, H, N analysis) הוכיחה קישור של קבוצות שכוללות אטומי חנקן.

אפיון ב-FTIR

לאחר שטיפות רבות שמטרתם הייתה להתפטר מחומר אנטימיקרוביאלי שאינו קשור באופן קוולנטי חומרים שהוכנו אופיינו ב-FTIR. הספקטראות הראו יצירת קשר Si-O-C חדש (פיק ב 918 cm^{-1} עבור PVA-QAS ופיק ב 923 cm^{-1} עבור glass-QAS). ב cellulose-QAS באזור הזה יש פיקים רבים של הפולימר עצמו. בנוסף לפיק החדש יחס בין קבוצות CH ו-OH השתנה לטובת קבוצות CH שמעיד על קישור של שרשראות אלקאליות (C_{18} of QAS) לקבוצות הידרוקסיליות שהיו על פני השטח של החומרים שעברו שינוי (איור 3).

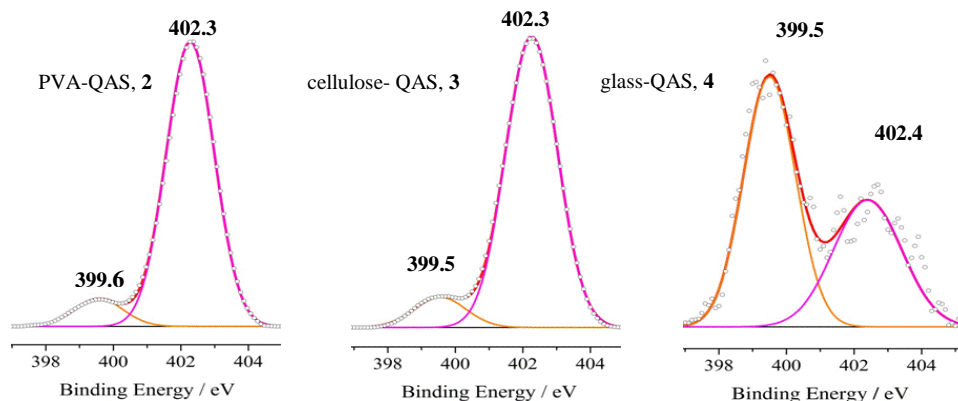


איור 3. FTIR ספקטראות של החומרים החדשים שהכנו והחומרי מוצא שלהם.

XPS) X-ray photoelectron spectroscopy

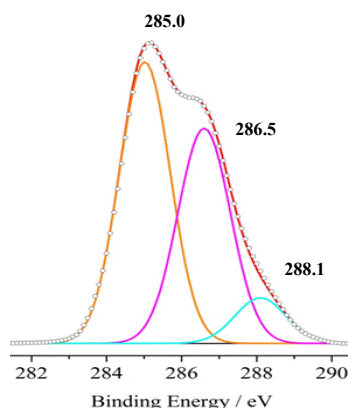
X-ray photoelectron spectroscopy היא טכניקה מתקדמת מיועדת לאפיון מעמיק של פני שטח. היא יכולה לתת זיהוי של אלמנטים וקבוצות פונקציונליות ומצבי חמצון. בפרויקט זה בצענו אפיון של חומרים אנטימיקרוביאליים פעילים במגע שהכנו.

איור 4 מראה high-resolution N1s XP spectrum עבור החומרים החדשים שסינטזנו. פיקים באזור $402.3\text{-}402.4 \text{ eV}$ שייכים לאמין רבעוני בעל פעילות אנטימיקרוביאלית, פיקים באזור $399.5\text{-}399.6 \text{ eV}$ שייכים לאמין ניוטראלי חסר פעילות אנטימיקרוביאלית. ניתן לראות שחומרים שונים נותנים יחסים שונים בין האמין האנטימיקרוביאלי והאמין הלא פעיל. ב-PVA וצלולזה שעברו מודיפיקציה שלנו רוב האמינים שנמצאים על פני שטח הם אמינים פעילים (92.6% ו-78.6%). לעומת זאת על הפני שטח של זכוכית שעברה מודיפיקציה יש אחוז נמוך יחסית של האמין הפעיל 44.0%. ישנה קורלציה בין אחוז של האמין הפעיל שקבענו בעזרת XPS והפעילות אנטימיקרוביאלית של אותם חומרים (ראה בהמשך).



איור 4. XPS של N 1s. קן מנוקד שייך לפרופיל ניסיוני, קן רצוף מתאר סכום של Gaussians.

בעזרת מדידת אנרגית קשירה באזור C1s ניתן לחשב יחס של קשרי C-C (285.0 eV), קשרי C-O and C-N (286.5-286.6 eV) וקשרי O-C-O (288.1 eV). היחס מלמד על כך ששלום קבוצות OH מגיבות עם QAS אחת ומוכיחים את הפרופיל של הקשור המשולש שהצענו (איור 5).



איור 5. XPS של C 1s של Cellulose-QAS.

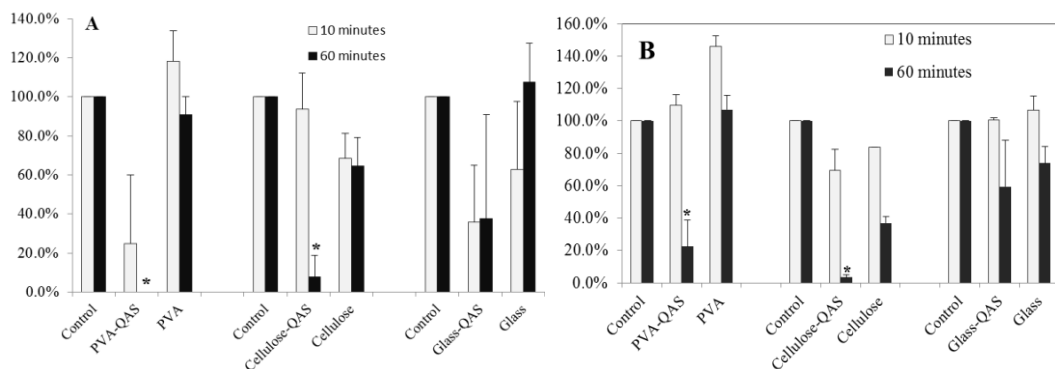
קביעת צפיפות של האתרים הפעילים

השתמשנו בפלורסצין, סמן של מלחי אמוניום רבעוניים, כדי לקבוע את הצפיפות על החומר הפעיל. ל-40 מ"ג של חומר אריזה הוספו 2 מ"ל של תמיסה מימית של fluorescein⁻ Na⁺ (1%). לאחר שעתיים ב-30°C החומר המטופל נשטף עם מים כדי להוריד את הפלורסצין שלא נקשר באופן קוולנטי. החומר המטופל קיבל צבע אדום-צהוב המעיד על קישור של פלורסצין.

כדי לקבל מידע כמותי, פלורסצין שנקשר, נותק עם עודף של תמיסה מימית 2% של cetyltrimethylammonium chloride (ב-48 h ב-60°C), מלח אמוניום רבעוני אחר המתחרה לקישור. פזה נוזלית שבה נכלל פלורסצין שהתנתק נאספה, ולה הוספו 300 μl של 0.1 M phosphate buffer. בליעה של פלורסצין נמדדה ב-500 nm. ריכוז של פלורסצין חושב לפי המשוואה $A = \epsilon Cl$ (איפה ש A – בליעה הנמדדת, C-ריכוז של פלורסצין, l – אורך של תא המדידה 1 cm, ϵ – מקדם בליעה). מקדם בליעה לפלורסצין $69 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, הושב מעקומת כיוול. הריכוז הגבוה ביותר של פלורסצין, 4.9 mM נמצא עבור PVA-QAS. ריכוז של פלורסצין עבור cellulose-QAS היה גם ד"י גבוה 3.4 mM. ריכוז של פלורסצין עבור glass-QAS היה הרבה יותר נמוך 0.08 mM שמעיד על צפיפות נמוכה יותר של החומר הפעיל. הבדלים בצפיפות של האתרים הפעילים עבור חומרים מתאימים לנתוני XPS ומתאימים להבדלים בעוצמה של פעילות אנטימיקרוביאלית של החומרים (ראה בהמשך).

פעילות אנטימיקרוביאלית

פעילות אנטימיקרוביאלית של החומרים שהכנו נבדקה על חיידק גרם שלילי *E. coli*, *P. aeruginosa*. ועל חיידק גרם חיובי *B. cereus*, *A. acidoterrestris*. החיידקי *E. coli* *P. aeruginosa* ו-*B. cereus* גודלו על מצע LB, *A. acidoterrestris* גודל על מצע PDB ב-37°C/230rpm. התרבית נמהלה בבופר PBS על מנת להגיע לעכירות של $OD_{600} = 0.0005$. לאחר אינקובציה של 10 ו-60 דקות עם החומרים הבאים: PVA-QAS, cellulose-QAS, ו-glass-QAS התרביות נמהלו במיהולים עשרוניים לאנליזת Colony Forming Units (CFU). תרחיף חיידקים ללא הוספת החומרים שימש כביקורת לכמות החיידקים. PVA, cellulose, glass, ללא חומר פעיל, שימש כביקורת נוספת לאי-פגיעה בחיידקים ע"י חומר נשא עצמו. ניתן לראות ש-PVA-QA וגם cellulose-QAS מראים פעילות גבוהה יותר בהשוואה ל-glass-QAS. תוצאה זו מתאימה לצפיפות של אתרים הפעילים שמדדנו ומצאנו כי על פני שטח של PVA-QAS ו-cellulose-QAS ישנם יותר אתרים אנטימיקרוביאליים מאשר על פני שטח של glass-QAS. באיור 6 הוצגה השרדות של חיידקי *B. cereus* ו-*E. coli* הבאים במגע עם חומרים שונים (כמות חיידקים בדגם ביקורת הוגדרה כ-100%). ניתן לראות שלאחר 60 דקות PVA-QAS קוטל בצורה אבסולוטית את חיידקי *B. cereus* ו-80% מחיידקי *E. coli*. לאחר 60 דקות cellulose-QAS קוטל 90% מחיידקי *B. cereus* ו-95% של חיידקי *E. coli*. לאחר 60 דקות glass-QAS קוטל 60% מחיידקי *B. cereus* ו-40% של חיידקי *E. coli*.

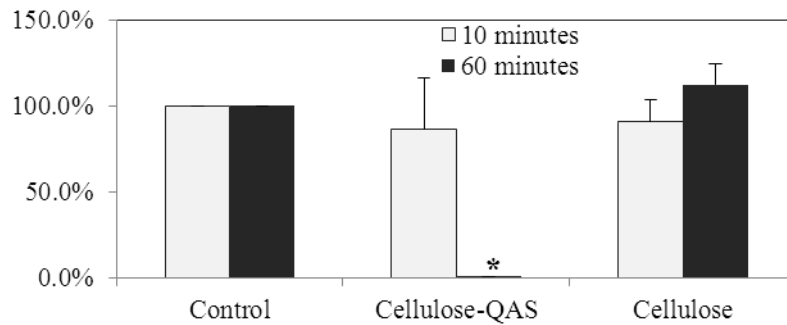


איור 6. הישרדות של חיידקי *Bacillus cereus* ATCC 11778 (A) ו-*E. coli* DH5α (B)

לאחר טיפול ע"י חומרים שהוכנו לעומת הביקורות. התוצאות מייצגות ערכים ממוצעים וסטיית תקן שהתקבלו על בסיס שתי חזרות ביולוגיות שהתבצעו בדופליקטים. * מסמל עיכוב משמעותי בחיות החיידקים.

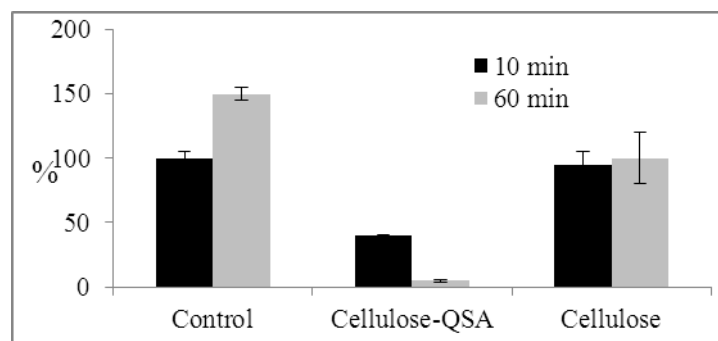
cellulose-QAS הראה תוצאות הטובות ביותר על חיידק גרם שלילי *E. coli* ולכן בדקנו את פעילות על חיידק גרם שלילי נוסף, *P. aeruginosa*, שמהווה בעיה קשה בתעשיית המזון וגורם למחלות אדם. נמצא ש cellulose-QAS גורם לקטילה דרסטית של החיידק. חשוב לציין ש cellulose שלא עבר מודיפיקציה לא מראה פעילות אנטימיקרוביאלית (איור

7). גם זמן המגע הוא קריטי לקטילה. ניתן לראות שלאחר 10 דקות רק 20% של חיידקים נקטלו. לעומת זאת לאחר 60 דקות שחיידקים היו במגע עם cellulose-QAS רובם נקטלו.



איור 7. הישרדות של חיידקי *P. aeruginosa* לאחר טיפול ע"י חומרים שהוכנו לעומת הביקורות. התוצאות מייצגות ערכים ממוצעים וסטיית תקן שהתקבלו על בסיס שתי חזרות ביולוגיות שהתבצעו בדופליקטים. * מסמל עיכוב משמעותי בחיות החיידקים.

בדקנו גם חיידק *A. acidoterrestris* שמהווה בעיה קשה בתעשיות המיצים (איור 8). לאחר 10 דקות 60% של חיידקים נקטלו ולאחר 60 דקות מגע עם cellulose-QAS 95% נקטלו.



איור 8. הישרדות של חיידקי *A. acidoterrestris* לאחר טיפול ע"י חומרים שהוכנו לעומת הביקורות. התוצאות מייצגות ערכים ממוצעים וסטיית תקן שהתקבלו על בסיס שתי חזרות ביולוגיות שהתבצעו בדופליקטים.

בדיקת יציבותם של החומרים החדשים

יציבותם של החומרים האנטימיקרוביאליים נבדקה בתנאים שונים של pH וטמפרטורה (טבלה 1). שחרור של המרכיב הפעיל נבדק בעזרת בדיקה של פעילות אנטימיקרוביאלית של התמיסה כשהיא הופרדה מהחומר המוצק. החומרים נשארו יציבים ולא נצפה שחרור של המרכיב האנטימיקרוביאלי בכל הטמפרטורות (25°C, 50°C ו-90 °C) ב pH של 5.8 (~pH של מים בברז) וגם ב pH של 3.6 (~pH של מיצים רבים ומוצרי חלב כגון יוגורטים וכדומה). ב-pH יותר קיצוני של 1.2 (חומצי מאוד) ושל 10.2 (בסיסי) החומרים נשארו יציבים ולא נצפה שחרור של מרכיב אנטימיקרוביאלי בטמפרטורות של 25°C ו-50°C. השילוב של טמפרטורה גבוהה של 90 °C עם pH- קיצוניים אכן גרם לניתוק הקשר ושחרור של החומר

הפעיל. הדבר היה חזוי כי בתנאים חומציים או בסיסיים מאוד ובטמפרטורה גבוהה מתרחש תהליך של הידרוליזה, שבירה של קשרים בעזרת מולקולות מים.

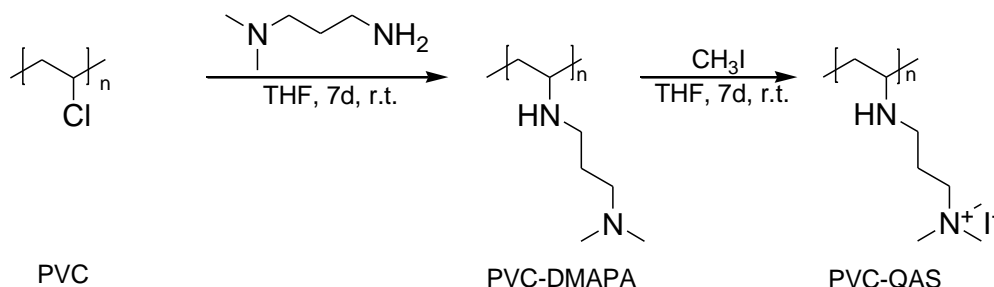
טבלה 1. שחרור של חומר פעיל בתנאים שונים של pH וטמפרטורה.

דוגמה	נמצא QSA	דוגמה	נמצא QSA	דוגמה	נמצא QSA
Cell -QSA, pH 5.8, t = 25C	no	PVA -QSA, pH 5.8, t = 25C	no	Glass -QSA, pH 5.8, t = 25C	no
Cell -QSA, pH 5.8, t = 50C	no	PVA -QSA, pH 5.8, t = 50C	no	Glass -QSA, pH 5.8, t = 50C	no
Cell -QSA, pH 5.8, t = 90C	no	PVA -QSA, pH 5.8, t = 90C	no	Glass -QSA, pH 5.8, t = 90C	no
Cell -QSA, pH 3.6, t = 25C	no	PVA -QSA, pH 3.6, t = 25C	no	Glass -QSA, pH 3.6, t = 25C	no
Cell -QSA, pH 3.6, t = 50C	no	PVA -QSA, pH 3.6, t = 50C	no	Glass -QSA, pH 3.6, t = 50C	no
Cell -QSA, pH 3.6, t = 90C	no	PVA -QSA, pH 3.6, t = 90C	yes	Glass -TSA, pH 3.6, t = 90C	no
Cell -QSA, pH 1.2, t = 25C	no	PVA -QSA, pH 1.2, t = 25C	no	Glass -QSA, pH 1.2, t = 25C	no
Cell -QSA, pH 1.2, t = 50C	no	PVA -QSA, pH 1.2, t = 50C	no	Glass -TSA, pH 1.2, t = 50C	no
Cell -QSA, pH 1.2, t = 90C	yes	PVA -QSA, pH 1.2, t = 90C	yes	Glass -QSA, pH 1.2, t = 90C	no
Cell -QSA, pH 10.2, t = 25C	no	PVA -QSA, pH 10.2, t = 25C	no	Glass -QSA, pH 10.2, t = 25C	no
Cell -QSA, pH 10.2, t = 50C	no	PVA -QSA, pH 10.2, t = 50C	no	Glass -QSA, pH 10.2, t = 50C	no
Cell -QSA, pH 10.2, t = 90C	yes	PVA -QSA, pH 10.2, t = 90C	yes	Glass -QSA, pH 10.2, t = 90C	no

יצירת מלחי אמוניום רבעוניים על PVC polyvinyl chloride

פוליויניל כלוריד מהווה פולימר בעל קבוצה פונקציונלית ממשפחת הלוגנים. היה חשוב לנו באופן עקרוני להראות כי ניתן לעשות מודיפיקציות ולקבל מלחי אמוניום רבעוניים גם על הפולימרים מהמשפחה הזו. לאחר מספר רב של ניסיונות מצאנו תהליך שהביא למודיפיקציה הרצויה של פוליויניל כלוריד PVC עם קבוצות מלח אמוניום רבעוני (איור 9). התהליך הינו דו-שלבי וכולל תחילה תגובה של PVC המקורי עם dimethylaminopropyl amine (DMAPA). קבוצת הכלוריד של הפולימר מגיבה בשלב זה עם קבוצת האמינו של DMAPA וכך נוצר חומר הביניים PVC-DMAPA הנושא קבוצות של אמין שלישוני. לאחר ניקוי חומר

הביניים על ידי מיצוי שאריות של DMAPA אשר לא הגיבו, מתרחשת תגובה עם יודומתאן (CH₃I) לקבלת התוצר הסופי PVC-QAS. שלב זה הינו מתילציה של קבוצות האמין השלישוניות אשר נוצרו בשלב הקודם.



איור 9. סינטזה של נגזרות ה-PVC

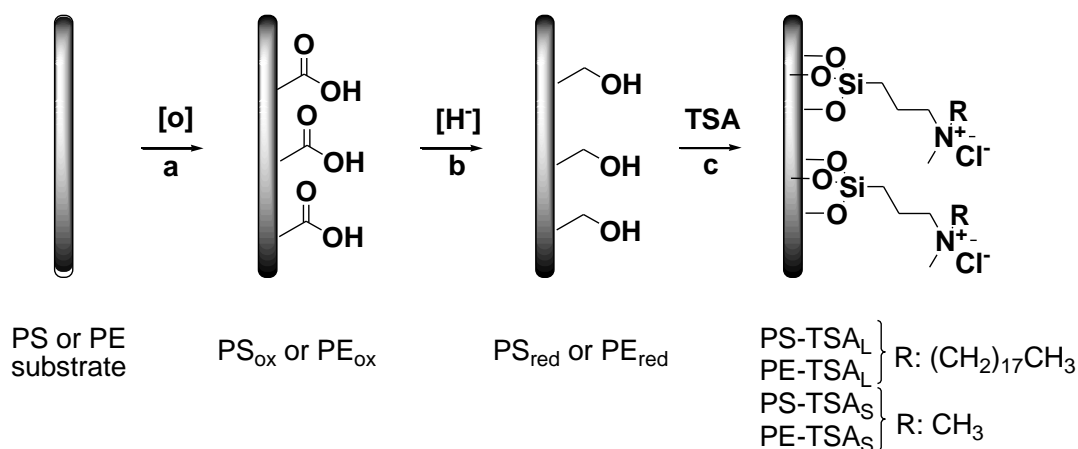
בחיפוש אחר תנאי תגובה אופטימליים על מנת להגדיל את כמות קבוצות המלח אמוניום בוצעו מספר ניסיונות. נבדקו ממסים, זמני תגובה, וטמפרטורות שונות ונעשה מעקב אחר תכולת החנקן בתוצרים ע"י אנליזת יסודות של פחמן, חנקן מימן וחמצן (טבלה 2). בעת השימוש בממסים אשר לא ממסים את הפולימר PVC, כגון מתאנול (MeOH), מים (H₂O), אתאנול (EtOH) ואצטוניטריל (MeCN) לא נמצאו כלל אחוזי החנקן בתוצרים (PVC-DMAPA₁ עד PVC-DMAPA₅) גם כאשר טמפרטורות התגובה הועלו. רק כאשר התגובה בוצעה במדיום הומוגני בעת השימוש בטטרהידרופוראן (THF) נמדד החנקן בעזרת אנליזת היסודות, אשר הצביע על יצירה של נגזרות ה-PVC בעלות אמינים שלישוניים. התנאים בהם ניצולת יצירת אמינים שלישוניים על גבי הפולימר הייתה גבוהה ביותר, היו התנאים של התגובה אשר נמשכה 7 ימים (מס' 7).

טבלה 2. אנליזת היסודות של נגזרות ה-PVC כתלות בתנאי תגובה שונים

	שם הדוגמא	ימים	°C	ממס	חנקן (N)	פחמן (C)	מימן (H)	חמצן (O)
1	PVC				0	37.88	4.85	0.67
2	PVC-DMAPA ₁	4	25	MeOH	0	36.05	4.89	0.13
3	PVC-DMAPA ₂	4	70	H ₂ O	0	37.16	5.01	0.55
4	PVC-DMAPA ₃	4	25	EtOH	0	39.19	5.21	1.98
5	PVC-DMAPA ₄	4	25	MeCN	0	37.94	4.85	0.30
6	PVC-DMAPA ₅	4	reflux	MeCN	0	36.94	5.04	0.22
7	PVC-DMAPA ₆	3	25	THF	0.11	40.07	5.13	1.91
8	PVC-DMAPA ₇	3	reflux	THF	0.40	41.08	4.88	0.66
9	PVC-DMAPA	7	25	THF	1.01	40.70	5.12	1.90
10	PVC-QAS	7	25	-	0.99	37.69	5.13	1.67

מודיפיקציות של פולימרי אריזה אינרטיים פוליאתילן ופוליסטירן

כדי לבצע קישור קוולנטית של מרכיב אנטימיקרוביאלי יש צורך בקבוצות פונקציונליות על חומר אריזה. תנאי זה אינו מתקיים בחומרי אריזה הנפוצים ביותר כגון פוליאתילן, פוליפרופילן ופוליסטירן. פולימרי פלסטיק הלו הם חסרי קבוצות פונקציונליות. הצלחנו להתגבר על בעיה הזו באמצעות שיטת אקטיבציה אוזונוליזה. העבודה פורסמה בעיתון מדעי Colloids and Surfaces B, Biointerfaces (IF 4.2).²⁰ השתמשנו בחמצון באמצעות אוזון כדי ליצור קבוצות פונקציונליות על פני שטח של הפולימרים. במחקר שלנו עבדנו בשיתוף פעולה עם אורי פייפר, חוקר גמלאי ממכון להנדסה חקלאית. אורי המציא אוזונטור שעובד ללא בלון חמצן אלא משתמש בחמצן שיש באוויר ליצירת אוזון. בעזרת אוזונטור של אורי הצלחנו לבצע "אוזונוליזה באוויר". אוזונוליזה כזו היא גם בטיחותית יותר וגם חסכונית כי אין צורך בבלון חמצן. לאחר אוזונוליזה קיבלנו קבוצות קרבוקסיליות על פני השטח של פוליאתילן ופוליסטירן. את הקבוצות הקרבוקסיליות חיזרנו להידרוקסילים ואלהם קישרנו מלח אמוניום רבעוני (איור 10). בעבודה הזו קישרנו שני סוגים של מלח אמוניום עם שרשרת ארוכה C_{18} ($TSA_L=TSA_{Long}$) ועם שרשרת קצרה C_1 ($TSA_S=TSA_{short}$) כדי לבדוק השפעה של אורך השרשרת על הפעילות האנטימיקרוביאלית של החומרים שנקבל.



איור 10. סינטזה של פוליאתילן (PE) ופוליסטירן (PS) אנטימיקרוביאליים.

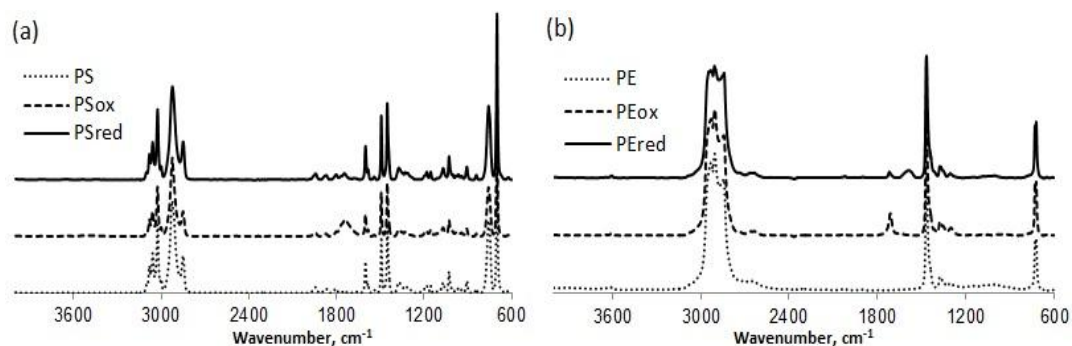
מודיפיקציות פני שטח יכולים לשנות הידרופיליות/הידרופוביות של החומרים. אכן ניתן לראות על פי מדידות של זווית מגע עם מים כי לאחר חימצון פני השטח של הפולימרים, הם נהיו הידרופיליים. תגובת החיזור המשכיכה עם מגמה הידרופילית אך לאחר קישור של מלח אמוניום רבעוני, גם פוליאתילן וגם פוליסטירן חוזרים להיות הידרופוביים. האפקט הזה יותר ברור לאחר קישור של מלח אמוניום TSA_{Long} כיוון שיש לו שרשרת אליפתית ארוכה C_{18} . זאת אומרת לאחר סיום מודיפיקציה התכונות של הפני שטח נשארים כמו במקור (טבלה 3).

טבלה 3. אנליזה של זווית מגע עם מים (במעלות) עבור פוליאתילן ופוליסטירן לאחר שלבים שונים של מודיפיקציה

Material	water contact angle, degrees	Material	water contact angle, degrees
PS	82.4±1.8	PE	91.2±1.8
PS _{ox}	29.6±2.4	PE _{ox}	37.6±2.4
PS _{red}	49.0±0.3	PE _{red}	55.4±1.5
PS-TSA _L	72.3±2.1	PE-TSA _L	79.1±2.5

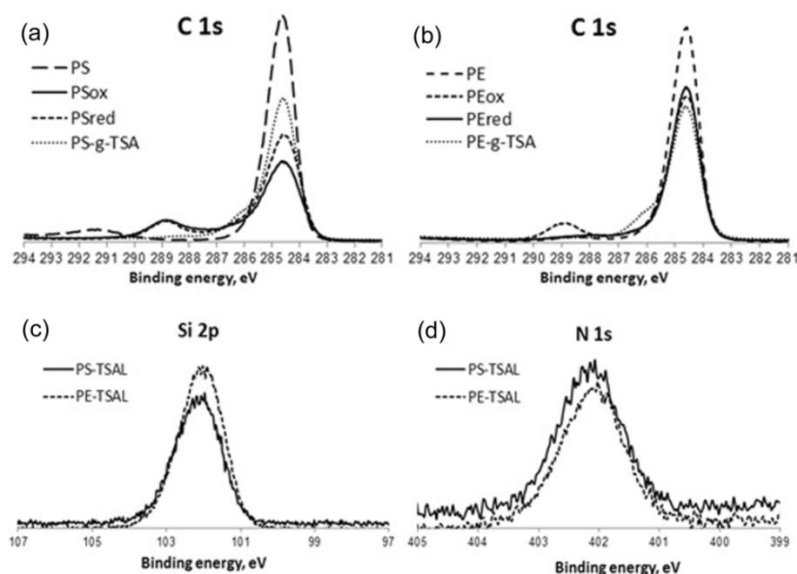
אפיון ספקטרוסקופי

ניתן לעכב לאחר מודיפיקציה של פני שטח של יריעות שקופות בעזרת FTIR. לאחר חמצון הספקטראות הראו יצירת קבוצות קרבוקסיליות שנעלמות בשלב החיזור (איור 11).

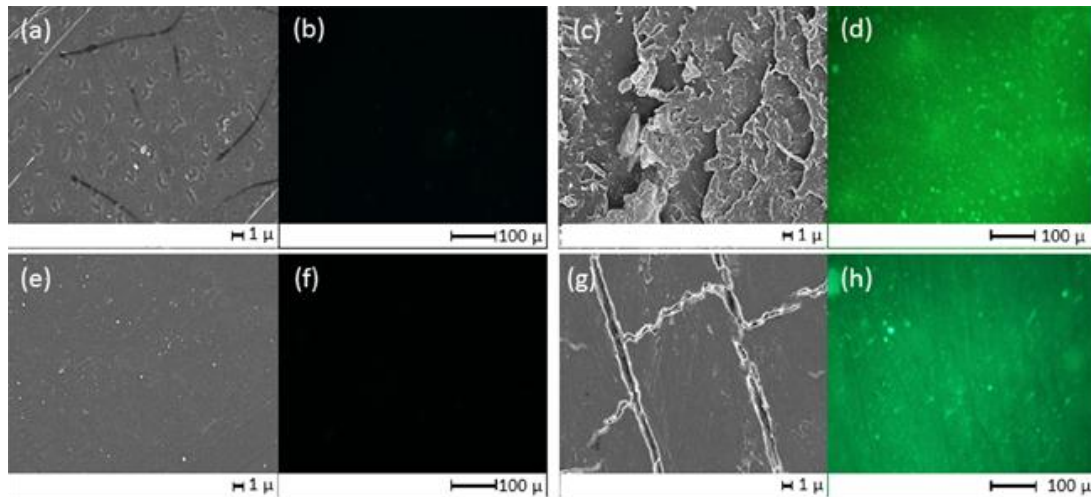


איור 11. FTIR ספקטראות של PS, PE, PS_{ox}, PE_{ox}, PS_{red} and PE_{red}.

היריעות שהכנו אופיינו גם באמצעות XPS. איור 12 מראה high-resolution XP spectrum עבור החומרים מודיפיקציה בכול השלבים. פיקים באזור 288-289 eV שייכים ל C-O שמופעים על פני שטח של פולימרים לאחר אקטיבציה ופיקים באזור 402 - 403 eV שייכים לאמין רבעוני ממלח האמונים אנטימיקרוביאלי.



איור 12. high-resolution XPS. אזור (a,b) C 1s, אזור (c) Si 2p, אזור (d) N 1s. הוכחו קישור של שכבה פעילה גם באמצעות מיקרוסקופיה (איור 13). ניתן לראות שינוי של פני שטח במיקרוסקופ אלקטרוני סורק. כדי להוכיח שמדובר אכן על מלח אמוניום רבעוני סימנו את המלחים האלו עם פלורסצין (ריאגנט ידוע ביכולת שלו להיקשר למלח אמוניום רבעוני) ובדקנו את פילמים במיקרוסקופ פלורוסנטי. ניתן לראות בצורה ברורה שיש ציפוי פלורוסנטי לאחר מודיפיקציה לעומת הפולימר המקורי שאין לו פלורוסנציה.



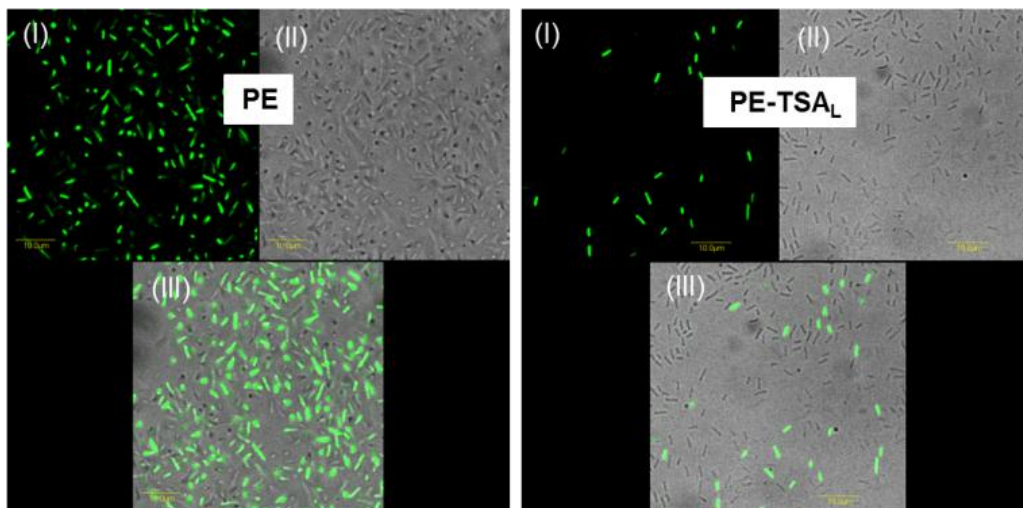
איור 13. תמונות של מיקרוסקופ אלקטרוני סורק SEM ומיקרוסקופ פלורוסנטי של יריעות .PS (a, b); PS-TSA_L (c, d); PE (e, f); and PE-TSA_L (g, h)

נבדקה פעילות אנטימיקרוביאלית של פוליטיירן ופוליאיתילן בעלי מלח אמוניום רבעוני עם שרשרת ארוכה וקצרה PS-TSA_L, PS-TSA_S and PE-TSA_L, PE-TSA_S (טבלה 4). השרדות של שלושה חיידקים *E. coli*, *S. enterica* and *B. subtilis* נבדקה לאחר מגע של 30 דקות עם היריעות שהכנו. ניתן לראות שחומרים שלפני שטח שלהם קשור מלח אמוניום רבעוני עם שרשרת ארוכה גורמים לירידה משמעותית ביותר (עד לוג 5) בכמות חיידקים. לעומת זאת חומרים שלפני השטח שלהם קשור מלח אמוניום רבעוני עם שרשרת קצרה, ברוב המקרים אינם גורמים לירידה משמעותית בכמות חיידקים.

טבלה 4. השרדות של חיידקים לאחר מגע של 30 min at 25°C עם פוליאיתילן ופוליטיירן.

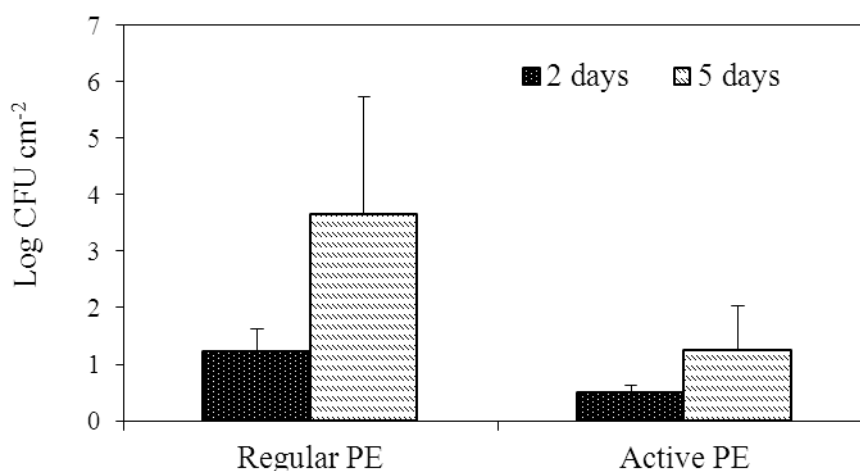
Material	<u>Log CFU/ml reduction</u>		
	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>B. subtilis</i>
PS	1.58±0.11 ^a	0.40±0.03 ^a	1.56±0.2 ^a
PS-TSA _L	6.58±0.18 ^b	2.55±0.85 ^b	3.37±0.36 ^b
PS-TSA _S	1.99±0.09 ^a	0.83±0.05 ^a	1.68±0.20 ^a
PE	1.4±0.07 ^{a1}	0.78±0.22 ^{a1}	1.11±0.13 ^{a1}
PE-TSA _L	3.1±0.24 ^{b1}	3.03±0.95 ^{b1}	2.65±0.09 ^{b1}
PE-TSA _S	1.75±0.10 ^{a1}	0.26±0.10 ^{a1}	1.25±0.11 ^{a1}

לויזואליזציה של פעילות אנטימיקרוביאלית במגע הוספנו ליריעות חיידקי *E. coli* המסומנים בחלבון פלורוסנטי GFP ובדקנו את החיידקים על מיקרוסקופ קונפוקאלי. ניתן לראות שכמות חיידקים חיים יורדת בצורה דרמטית לאחר מגע של 30 דקות עם PE-TSA_L (איור 14).



איור 14. תמונות של מיקרוסקופ קונפוקאלי של GFP-tagged *E. coli* לאחר מגע של 30 דקות עם יריעה. (I) אור פלורוסנטי, (II) אור רגיל, (III) חפיפה של שתי תמונות.

פעילות אנטימיקרוביאלית במגע של פילמים נבדקה על מודל מזון, מלון חתוך. חתיכות מלון הוצמדו לפילמים של PE, PE-TSA_L, ומלון ללא עטיפה כביקורת. הזריעה של דוגמאות מיצוי המלון לספירות הרכב מיקרוביאלי בוצעה ע"ג מצע מזון PCA - (Plate Count Agar), מצע כללי עשיר המתאים לרוב החיידקים. כל העבודה בוצעה באווירה סטרילית במנדף ביולוגי. ספירת הרכב מיקרוביאלי כללי הוארכו ב-0, 2, ו-5 ימים של אחסון ב 10 °C (איור 15). ניתן לראות כי ל PE-TSA_L יש השפעה אנטימיקרוביאלית מובהקת.



איור 15. התפתחות כללית של מיקרואורגניזמים על מלון חתוך באחסון ב 10 °C.

דין

למען יישום הגישה "חומרים אנטימיקרוביאליים פעילי מגע" בתעשיית מזון, תהליך יצירת אריזות אנטימיקרוביאליות צריך להיות פשוט ואוניברסאלי כדי לאפשר כדאיות כלכלית ושימוש מורחב. במחקר זה אנחנו שאפנו לענות על דרישות האלו. פיתחנו מהלך סינתטי מבוסס על סילילציה שאפשר להעניק תכונות אנטימיקרוביאליות למגוון של חומרים רלוונטיים לאריזות מזון בתגובה חד-שלבית. כך בצענו מודיפיקציה לפולימר סינתטי-PVA, לפולימר טבעי-צלולוזה, ולזכוכית. הגורם המשותף בחומרים האלו הוא נוכחות של קבוצות הידרוקסיליות (OH). בצענו אפיון מועמק של החומרים שהכנו, הגדרנו צפיפות אתרים פעילים על פני שטח שלהם והוכחנו פעילות אנטימיקרוביאלית שלהם נגד מגוון של חיידקים הרלוונטיים למזון (גרם חיובי וגרם שלילי). מצאנו קורלציה בין צפיפות של האתרים הפעילים ופעילות אנטימיקרוביאלית. גם כן בדקנו יציבות של קישור וראינו שמרכיב אנטימיקרוביאלי, מלח אמוניום רבעוני, אינו משתחרר בתנאים הרלוונטיים לתעשיית מזון (מגוון של ערכי pH וטמפרטורות). שבירת קשר Si-O נצפה רק בשילוב של טמפרטורה גבוהה 90°C עם pH קיצוני (10.2 או 1.2). קשה לדמיין תנאים כאלו כשמדובר על אחסון של מזון ארוז.

לאחר הוכחה של קישור מוצלח של מלח אמוניום רבעוני לחומרים בעלי קבוצות OH בתהליך סילילציה, עברנו לפולימרי אריזה פלסטיים. לחומרי אריזה הנפוצים כגון פוליאיתילן, פוליפרופילן ופוליסטירן אין קבוצות פונקציונליות שמאפשרות את הקישור. פתחנו תהליך לאקטיבציה של החומרים האלו שהביא להופעת שכבהת OH על פני השטח שלהם. קבוצות OH אפשרו קישור יציב של מלח אמוניום רבעוני בתגובת סילילציה שתוארה קודם. התהליך האקטיבציה שפתחנו מבוסס על שיטה ירוקה וחסכונית בשם אוזונוליזה באוויר. פתחנו את התהליך בשיתוף פעולה עם אורי פיפר, חוקר מהנדסה חקלאית שהמציא אוזונטור אוויר. בצענו מודיפיקציות לפוליאיתילן ופוליסטירן, אפיינו את החומרים והוכחנו פעילות אנטימיקרוביאלית שלהם. מצאנו שיש חשיבות לאורך השרשרת האליפטית על מלח אמוניום רבעוני. פולימרים שקשרו אליהם מלח אמוניום עם שרשרת ארוכה הראו פעילות חזקה (ירדה עד ללוג 5), למרות זאת מלחי אמוניום עם שרשרת קצרה לא הראו פעילות.

גישה נוספת שפיתחנו מאפשרת לבצע מודיפיקציות לחומרי אריזה ששייכים למשפחה אחרת בעלת קבוצות הלוגן כגון פוליוניל כלוריד (PVC). לאחר מספר ניסויים הצלחנו למצוא מהלך סינתטי ותנאים אשר אפשרו הכנסה של מלח אמוניום רבעוני לפני שטח של PVC. לגישת "חומרים אנטימיקרוביאליים פעילי מגע" ישנו מספר יתרונות חשובים. כאשר מרכיב אנטימיקרוביאלי קשור לפני שטח של אריזה הוא לא יכול להשתחרר ובכך ניתן להימנע מהכנסתו אל תוך המזון. הדבר תורם להשגת מטרה "מזון נקי מחומר משמרים". בנוסף כאשר מרכיב אנטימיקרוביאלי קשור לאריזה הוא לא מתכלה לאחר מפגש עם חיידקים וממשיך לפעול. כך ניתן להקטין כמות של מרכיבים אנטימיקרוביאליים הנדרשת.

לסיכום, חומרי אריזה "אנטימיקרוביאליים פעילי מגע" יכולים להיות שיטה יעילה ובטוחה ולתרום לשיפור בטיחות מיקרוביאלית והארכת חיי מדף של מזון ארוז. במחקר הנוכחי התמקדנו בפיתוח גישות למודיפיקציה של חומרים הרלוונטיים לתעשיית מזון. בשלב הבא יהיה צורך לבדוק באופן מעמיק את ההשפעה של חומרי אריזה שפתחנו על מוצרי מזון שונים. מודיפיקציה של פולימרי פלסטיק לא הובטחה בתוכנית מקורית והיא תוספת רצינית שהופכת את הגישה לכללית יותר ואטרקטיבית לתעשייה. אנו מצפים כי הממצאים הנוכחיים יתרמו ליישום של הגישה החדשה והיא תמצא שימוש בהבטחת בטיחות מזון.

תודות

תודתנו הגדולה נתונה למדען הראשי של משרד החקלאות על תמיכה תקציבית שאפשרה ביצוע של המחקר הנוכחי. ברצוננו להודות לכול השותפים שלנו למחקר פרופ' שלמה סלע, פרופ' אנטוניו גוליניו, ד"ר טטיינה בנדיקוב, ד"ר ויקטור רודוב. כמו כן, ברצוננו להודות לצוות של מהנדסי מחקר, טכנאים וסטודנטים שביצעו את העבודה: ד"ר טניה פדידה, ד"ר יוליה קרופיצסקי, ד"ר יוגן חסקין, הדר ארנון, רועי רוטנברג, גב' רינה גרניט, גב' בתיה חורב, וד"ר יעקב וינקור. תודה מיוחדת לד"ר מיכאיל בוריסובר וגב' נדיה בוחובסקי אשר עזרו במדידות FTIR ושיתפו בניסיונם העשיר.

רשימה מלאה של הפרסומים המדעיים

- 1) E. Poverenov. (2012) Contact Active Antimicrobial Materials for Food Packaging. Chemical Reaction in Food, Prague, Czech. Lecture.
- 2) E. Poverenov, M. Shemesh. (2012). Contact Active Antimicrobial Materials by Covalent Linkage of Quaternary Ammonium Salts. CIPA. Israel. Poster
- 3) E. Poverenov, M. Shemesh, A. Gulino, V. Zakin, R. Granit, (2013). Durable Contact Active Antimicrobial Materials Formed by a One-Step Covalent Modification of Polyvinyl Alcohol, Cellulose and Glass. *Colloids Surf. B.* 112, 356.
- 4). T. Fadida, Y. Kroupitski, U. M. Peiper, S. Sela, E. Poverenov (2014). Antimicrobial Polyethylene and Polystyrene by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. The Meeting of the Israel Chemical Society, Israel. Poster
- 5) T. Fadida, Y. Kroupitski, U. M. Peiper, S. Sela, E. Poverenov (2014). Air-Ozonolysis to Generate Contact Active Antimicrobial Surfaces: Activation of Polyethylene and Polystyrene Followed by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. *Colloids Surf. B.* 122, 294.
- 6) E. Poverenov. Contact Active Antimicrobial Materials by Covalent Linkage (2015). The Meeting of the Israel Chemical Society, Israel. Lecture.

- ¹ Jamuna, B. A., Ravishankar, R. V. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. *Compreh. Rev. Food Chem.*, **2011**, *10*, 184-194.
- ² Baquero F., Coque T. M., de la Cruz F. Ecology and Evolution as Targets: the Need for Novel Eco-Evo Drugs and Strategies To Fight Antibiotic Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, *55*, 3649-3660.
- ³ Campos C. A., Gerschenson L. N., Flores, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.*, **2011**, *4*, 849.
- ⁴ Sharma, M., Anand, S. K. Bacterial biofilm on food contact surfaces: A review. *J. Food. Sci. Technol.* **2002**, *39*, 573-593.
- ⁵ Lo'pez-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Mun'oz, P., Lagar'o'n, J. M., Catala', R., Gavara, R. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Rev. Int.* **2004**, *20*, 357-387.
- ⁶ Cooksey, K. Antimicrobial food packaging materials. *Add. Polym.* **2001**, *8*, 6-10.
- ⁷ Sanchez-Garcia, M. D., Lopez-Rubio, A., Lagaron, J. M. Natural micro and nanobiocomposites with enhanced barrier properties and novel functionalities for food biopackaging applications. *Trends Food Sci. Tech.* **2010**, *21*, 528-536
- ⁸ Gaysinsky, S., Davidson, P. M., McClements, D. J., Weiss, J. Formulation and Characterization of Phytophenol-Carrying Antimicrobial Microemulsions. *Food Biophysics*, **2008**, *3*, 54-65.
- ⁹ Banerjee, I., Pangule, R. C., Kane, R.S. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 690-718
- ¹⁰ Charnley, M., Textor, M., Acikgoz, C. Designed polymer structures with antifouling-antimicrobial properties. *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 329-334
- ¹¹ Madkour, A. E., Dabkowski, J. M., Nu'sslein, K., Tew, G. N. Fast Disinfecting Antimicrobial Surfaces. *Langmuir* **2009**, *25*, 1060-1067.
- ¹² Waschinski, C. J., Zimmermann, J., Salz, U., Hutzler, R., Sadowski, G., Tiller, J.C. Design of Contact-Active Antimicrobial Acrylate-Based Materials Using Biocidal Macromers. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 104-108.
- ¹³ Lienkamp, K., Madkour, A. E., Musante, A., Nelson, C. F., Nu'sslein, K., Tew, J. N. Antimicrobial Polymers Prepared by ROMP with Unprecedented Selectivity: A Molecular Construction Kit Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9836-9843.
- ¹⁴ Pinar K., Wood, K., Ohman, D., Wynne, K. J. Highly Effective Contact Antimicrobial Surfaces via Polymer. Surface Modifiers. *Langmuir* **2007**, *23*, 4719.
- ¹⁵ Abedon, S. T. *Specific Antimicrobials*, outline of lecture, **2008**.
- ¹⁶ Velanquez, L.C., Barbini, N. B., Escudero, M. E. Estrada, C. L., Guzman, A. M. S. Evaluation of chlorine, benzalkoniumchloride and lactic acid as sanitizers for reducing Escherichia coli O157:H7 and Yersinia enterocolitica on fresh vegetables. *Food Control*, **2009**, *20*, 262-268.
- ¹⁷ Fu, E., McCue, K., Boesenberg, D. Chemical disinfection of hard surfaces-Household, industrial and Institutional Settings. *Handbook of Cleaning/Decontamination of Surfaces*, **2007**, 573-592
- ¹⁸ Geier D. A., Jordan, S. K., Geier M. R. The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics. *Med. Sci. Mon.* **2010**, *16*, SR21-SR27.
- ¹⁹ Poverenov, E., Shemesh, M., Gulino, A., Zakin, V., Granit, R. Durable Contact Active Antimicrobial Materials Formed by a One-Step Covalent Modification of Polyvinyl Alcohol, Cellulose and Glass. *Colloids Surf. B.* **2013**, *112*, 356
- ²⁰ Fadida, T., Kroupitski, Y., Peiper, U. M., Bendikov, T., Sela, S., Poverenov, E. Air-Ozonolysis to Generate Contact Active Antimicrobial Surfaces: Activation of Polyethylene and Polystyrene Followed by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. *Colloids Surf. B.* **2014**, *122*, 294.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת). שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר. הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
שיפור בטיחות והארכת חיי המדף של מזון ארוז בעזרת פיתוח של אריזות אנטימיקרוביאליות פעילות במגע
מטרות המפורטות - (1) פתוח שיטות קישור של חומר פעיל בתהליך סינטטי פשוט מתאים למגוון של חומרים, אריזה (2) אפיון חומרי אריזה חדשים שנקבל, (3) הבחנת יציבות של הקישור בתנאים שונים של טמפרטורה ו-pH, (4) הבחנת פעילות אנטימיקרוביאלית של חומרים, (5) הבחנת השפעה של האריזות על מוצרי מזון
עיקרי התוצאות.
א) פתחנו מהלך חד-שלבי להענקת תכונות אנטימיקרוביאליות לחומרים בעלי קבוצות OH כגון PVA, צלולוזה איפיונו את חומרים שקיבלנו, הוכחנו פעילותם נגד 4 סוגים של חיידקים ובדקנו יציבותם ב pH וטמפרטורות שונים.
ב) פיתחנו שיטה למודיפיקציות של חומרי אריזה בעלות קבוצות הלוגן כגון פוליוניל כלוריד PCV.
ג) הצלחנו לפתח שיטת מודיפיקציה גם לפולימרי פלסטיק שאין להם קבוצות פונקציונליות, כגון פוליאיתילן ופוליסטירן הפולימרים האלו נפוצים ביותר באריזות מזון. פתחנו גישה יעילה ובטוחה לאקטיבציית פני שטח שלהם - אוזונוליזה. החומרים הראו פעילות נגד 3 סוגים של חיידקים ואופיינו במגוון של שיטות ספקטרוסקופיות ומיקרוסקופיות מתקדמות
הכוללות XPS, FTIR, AFM, SEM. חומרים חדשים שפתחנו נבדקו גם על מודל מזון, מלון חתוך, והראו הקטנה משמעותית (2-3 סדרי גודל) בהרכב מיקרוביאלי של הפרי
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
הצלחנו לבצע מודיפיקציה של מגוון חומרים הרלוונטיים לאריזות מזון. מודיפיקציה של פולימרי פלסטיק לא הובטחה בתוכנית מקורית והיא תוספת רצינית שהופכת את הגישה לכללית יותר ואטרקטיבית לתעשייה. בתוכניות הבאות יש לבחון באופן מעמיק את היכולת של החומרים החדשים שפתחנו לשפר בטיחות ולהאריך חיי המדף של מוצרי מזון
אנו מצפים כי הממצאים הנוכחיים יתרמו לשיפור בטיחות מיקרוביאלית של מזון.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות
הצלחנו להתגבר על בעיות שנוצרו במחקר.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי
פורסמו 2 מאמרים (ראה למטה). בנוסף הצגנו את העבודה בכנסים בינלאומיים כשני פוסטרים ושתי הרצאות מדעיות
1) E. Poverenov, M. Shemesh, A. Gulino, V. Zakin, R. Granit, (2013). Durable Contact Active Antimicrobial Materials Formed by a One-Step Covalent Modification of Polyvinyl Alcohol, Cellulose and Glass. <i>Colloids Surf. B.</i> 112, 356.
2) T. Fadida, Y. Kroupitski, U. M. Peiper, S. Sela, E. Poverenov (2014). Air-Ozonolysis to Generate Contact Active Antimicrobial Surfaces: Activation of Polyethylene and Polystyrene Followed by Covalent Graft of Quaternary Ammonium Salts. <i>Colloids Surf. B.</i> 122, 294.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
← ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) כן
← חסוי – לא לפרסום: יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? *
כן. כדי לבחון באופן מעמיק את השפעות של החומרים החדשים שפתחנו על מוצרי מזון ולשפר את יעילות שלהם

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים