

تولید میکروالیاف پروتئینی زئین با استفاده از فرآیند الکتروریسی

محمد امین میری^۱، محمد باقر حبیبی نجفی^{۲*}، جبرائیل موفق^۳، مسعود نجف نجفی^۴،
بهروز قرآنی^۵، آرش کوچکی^۶

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات هدفمند رسانی دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

۵- استادیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

۶- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۱۱)

چکیده

میکروالیاف زیست تخریب پذیر و خوراکی زئین با استفاده از حلال اسید استیک تهیه شد. با تغییر غلظت محلول زئین، ولتاژ الکتروریسی، فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده و سرعت جریان محلول میتوان میکروالیاف بدون مهره و یکنواخت تولید نمود. غلظت محلول زئین در سه سطح ۱۰، ۱۵ و ۲۰ cm و سرعت ۳۰ و ۲۶، ۲۲ و ولتاژ فرآیند الکتروریسی در سه سطح ۳۰ kV، ۲۰، ۱۰، فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده در سه سطح ۲۰، ۱۵ و ۱۰ و سرعت جریان در سه سطح ۱۲، ۸ و ۴ مطالعه شدند. تأثیر پارامترها بر الکتروریسی محلول زئین در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) بررسی و به روش سطح پاسخ (RSM) مدل سازی و تجزیه و تحلیل شدند. بر اساس نتایج این پژوهش، غلظت زئین تأثیر معنی داری ($P < 0.0001$) بر مورفولوژی و قطر الیاف دارد. بطوریکه با افزایش غلظت محلول زئین، الیاف با مورفولوژی فاقد مهره و یکنواخت تولید شد و قطر الیاف نیز افزایش یافت. همچنین، ولتاژ تأثیر معنی داری ($P < 0.0001$) بر قطر الیاف داشت. بطوریکه با افزایش ولتاژ، قطر الیاف نیز افزایش یافت. سرعت جریان و فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده تأثیر معنی داری بر قطر الیاف نداشت. در این پژوهش، تأثیر غلظت محلول و پارامترهای فرآیندی بر مورفولوژی الیاف حاصل بررسی گردید. الیاف حاصل از زئین را میتوان در صنایع غذایی برای مصارف مختلف به ویژه بسته بندی و انکپسولاسیون استفاده نمود.

کلید واژگان: الکتروریسی، زئین، میکروالیاف، مورفولوژی.

۱- مقدمه

در طول دو دهه اخیر، کاربرد پلی‌مرهای جدید زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان حامل‌های دارو در بدن انسان توجه زیادی را به خود معطوف نموده است [۲۱]. این موضوع به دلیل انتظار زیان صفر یا حداقلی برای سیستم بیولوژیکی فرد تحت درمان و نیز عدم نیاز به برداشتن پس از جراحی می‌باشد. سایر ویژگی‌های مهم پلی‌مرها یا مواد مورد استفاده برای حامل دارو یا غذا داروها از این قرارند که آنها می‌توانند کارایی انتقال دارو را با پاسخ مستقیم به محرک‌های فیزیولوژیکی یا خارجی بهبود بخشند، می‌توانند تأمین خاطر بیمار را افزایش دهند، غیرسمی هستند، و نیز قیمت مقرون به صرفه دارند [۳، ۱، ۴]. مشکلات شیوه سنتی انتقال دارو یا غذا دارو عبارتند از کارایی بارگذاری پایین و آزادسازی ناگهانی ماده کپسوله‌شده در ابتدای امر. سایر مزایای فیلم‌های الیافی الکترورسی شده بر فیلم‌های مرسوم قالب‌ریزی شده در حالت مایع طبیعت بسیار متخلخل فیلم‌های الیافی است؛ این فیلم‌ها سطح بسیار بیشتری را دارا هستند و در نتیجه به مولکول‌های فعال اجازه میدهند تا بسیار آزادانه‌تر از ماتریکس به بیرون انتشار پیدا کنند [۵، ۶، ۷]. نمونه‌هایی از کاربردهای بالقوه فیلم‌های میکروالیافی در بخش‌های غذایی نیز عبارتند از حامل‌های مواد مغذی و سایر ترکیبات فعال، موادی محافظ برای ترکیبات فعال کپسوله شده طی فرآوری غذا، و محیط جداسازی زیستی برای ارتقای ایمنی غذا [۸، ۹، ۱۰]. لویز-روبیو و لاگرون (۲۰۱۲) از الکترورسی به عنوان تکنولوژی جدید ریزپوشانی برای تولید کپسولهایی از جنس پروتئین آب پنیر در اندازه‌های میکرو و نانو استفاده نمودند. آنها کارایی ریزپوشانی را با استفاده از ریزپوشانی بتاکاروتن مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که الکترورسی قابلیت تولید کپسولهایی با ماهیت پروتئینی بدون استفاده از حرارت بالا را دارد. این کپسولها قادر به پایدار نمودن افزودنیهای فراسودمند مانند بتاکاروتن بودند. همچنین، آنها گزارش کردند که کارایی ریزپوشانی با این روش بسیار بالا است به طوری که بتاکاروتن را در مقابل اکسیداسیون ناشی از نور محافظت نمود [۱۱]. لی و همکاران (۲۰۰۹) از الیاف حاصل از زئین به عنوان حاملهایی برای پایدار نمودن اپی گالوکاتچین گالات استفاده نمودند. اپی گالوکاتچین گالات، یک پلی فنول گیاهی میباشد که عمدتاً در چای یافت میشود. این ترکیب دارای ویژگیهای

آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی است اما در شرایط قلیایی و طی فرایند حرارتی ناپایدار است [۹]. البرزی (۲۰۱۲) از الیاف ریسیده شده آلزینات سدیم- پکتین- اکسید پلی اتیلن برای ریزپوشانی اسید فولیک استفاده نمود. مطالعه وی نشان داد که الیاف ریسیده شده آلزینات- پکتین- اکسید پلی اتیلن برای حفاظت اسید فولیک در محصولات غذایی مانند نوشیدنیهای اسیدی مناسب میباشد [۱۲]. وانگسا سولاک و همکاران (۲۰۱۰) از مخلوط استات سلولز و آلومین تخم مرغ برای تولید نانوالیاف خوراکی به روش الکترورسی استفاده نمودند. آنها توانستند با موفقیت الیاف خوراکی از مخلوط این دو ترکیب تولید نمایند و چنین نتیجه گرفتند که میتوان با تنظیم ترکیب محلول و نیز افزودن سورفکتانت به محلول از پلیمرهای خوراکی نانوالیاف تولید نمود [۱۳]. ژو و لیم (۲۰۰۹) آنزیم گلوکز اکسیداز را در الیاف حاصل از الکترورسی پلی لاکتیک اسید تثبیت نمودند تا بدین ترتیب سیستم لاکتوپراکسیداز شیر را فعال نماید [۱۴].

الکترورسی تکنیکی ساده برای ایجاد الیاف فوق‌ریز به شکل شبکه‌ای بی‌بافت است. قطر الیاف الکترورسی شده بسته به خصوصیات محلول پلی‌مر و شرایط فرآوری، از کمتر از میکرومتر تا نانومتر متغیر است [۱۵ و ۱۶]. در فرآیند تشکیل الیاف، شکل نیم‌کره‌ای یک قطره از محلول پلی‌مری با بار الکتروستاتیکی در نوک یک لوله موئین تغییر می‌کند تا نهایتاً به محض اعمال میدان الکتریکی در بالای لوله موئین و یک نقطه رسانای دریافت‌کننده، به صورت مخروطی موسوم به مخروط تیلور

درمی‌آید. زمانی که میدان الکتریکی اعمال شده از یک میزان شاخص بالاتر رود، جریانی از محلول پلی‌مری دارای بار الکتروستاتیکی (یعنی فواره باردار) از نوک نازل بیرون می‌زند [۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸]. این فواره باردار در هنگام انتقال به نقطه جمع‌آوری یا دریافت جریان، (به خاطر نیروهای الکتریکی ناشی از برهم‌کنش بارهای اضافی درون فواره با میدان الکتریکی و دافعه کولنی یا کولومبی بارهای متقابل در فواره) طویل می‌شود و همزمان حلال تبخیر شده، الیاف را به صورت شبکه‌ای غیربافته روی نقطه دریافت باقی می‌گذارد.

الیاف الکترورسی شده به دلیل داشتن قطر کمتر از میکرون و نسبت زیاد سطح به حجم، تمایل دارند که برهم‌کنشی قوی‌تر

را دارد که در اثر تیمار با فرمالدئید یک فرآورده ذاتاً خنثی را به وجود می‌آورد [۲۳]. بنابراین یک پوشش زئینی می‌تواند به صورت عایقی کارآمد نسبت به اکسیژن، لیپید و رطوبت عمل کند. همچنین کاربرد زئین به عنوان الیاف بررسی شده است [۲۱]. در این رابطه، تکنولوژی الکترورسی می‌تواند مزایای چشمگیر دیگری از نظر حذف حلال و در تطبیق‌پذیری و کنترل روی فرآورده داشته باشد و همچنین منجر به تولید مواد جدید فیبری با خواص منحصر به فرد شود [۲۴].

در رابطه با اطلاعات پیشین در مورد الکترورسی زئین، مقالاتی در منابع وجود دارند که گزارش کرده‌اند این پروتئین می‌تواند از محلول اتانول الکترورسی شود تا الیاف نرمی به دست آید [۲۵ و ۲۶]. اما در رابطه با الکترورسی زئین از محلول اسید استیک تنها یک مقاله در منابع وجود دارد [۲۷] و به همین دلیل نیاز به انجام تحقیقات بیشتری در جنبه‌های مختلف آن به نظر ضروری می‌رسد.

میوشیو همکاران (۲۰۰۵) در اولین بررسی خود گزارش نمودند که یک ولتاژ بحرانی حدود ۸ کیلوولت برای الکترورسی محلول‌های زئین لازم است. غلظت وزنی پلی‌مر از ۱۸ تا ۲۵ درصد و اختلاف ولتاژ بین ۱۵ تا ۳۰ کیلوولت متغیر بود. ایشان الیافی با مقطع عرضی کم یعنی تا ۷۰۰ نانومتر تولید نمودند [۲۵]. پس از آن یائو و همکاران (۲۰۰۷) شرح دادند که چگونه برخی متغیرهای الکترورسی را می‌توان تغییر داد تا شبکه زئینی تولید شود و چگونه با افزودن یک ماده ایجادکننده اتصال عرضی، قدرت کششی بافت حاصل از الیاف الکترورسی شده را می‌توان افزایش داد. ماده ایجادکننده اتصال عرضی که در تحقیق استفاده شد، هگزامتیلن دی‌ایزوسیانات بود. قطر الیاف ساخته شده با تغییر شرایط مختلف از ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر متغیر بود و نانوذرات و شبکه میکرو الیافی شبه‌نوار، بسته به شرایط مورد استفاده برای الکترورسی سیستم‌ها قابل مشاهده بودند [۲۶].

هدف از این تحقیق، تولید میکرو الیاف پروتئین زئین از محلول اسید استیک می‌باشد. همچنین تأثیر غلظت پروتئین و پارامترهای فرایند الکترورسی با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)^۱ و طرح مرکب مرکزی بر مورفولوژی و قطر میکرو الیاف حاصل مورد مطالعه قرار گرفت.

با محیط اطراف خود داشته باشند و این ویژگی آنها را به موادی ایده‌آل برای سنسورها، رهایش کنترل شده و تثبیت آنزیم‌ها مبدل ساخته است. از آنجا که طی الکترورسی گرما حذف می‌شود و فرآیند نسبتاً ساده است، الیاف الکترورسی شده می‌تواند به عنوان حامل‌های نوین و ابتکاری برای انتقال ترکیبات زیست‌فعال درون غذاها و انکپسولاسیون ترکیبات حساس عمل کنند [۹ و ۱۹].

زئین نوعی پرولامین یا همان پروتئین ذخیره‌ای اصلی در ذرت است که حدود ۴۵ تا ۵۰ درصد محتوای پروتئینی ذرت را تشکیل می‌دهد. این ماده نخستین بار در سال ۱۸۹۷ به دلیل حلالیت در محلول‌های آبی الکلی شناسایی شد [۲۰]. تخمین زده می‌شود که تولید زئین از آرد گلوتن ذرت و نیز به عنوان فرآورده جانبی آسیاب مرطوب دانه‌های ذرت، حدود ۵۰۰ تن در سال باشد [۲۱]. آرد گلوتن ذرت حدود ۷۰ درصد وزنی (بر اساس وزن خشک) پروتئین دارد، که زئین تقریباً ۶۰ درصد وزنی این پروتئین را تشکیل می‌دهد، لذا زئین اصلی‌ترین پروتئین ذخیره‌ای یافت شده در دانه‌های ذرت است. زئین ذرت پتانسیل خوبی برای صنایع غذاهای ویژه، دارو و پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر دارد [۲۲]. به دلیل حضور آمینواسیدهای غیرقطبی همچون لوسین، پرولین، و آلانین، زئین یکی از آب‌گریزترین پروتئین‌ها می‌باشد و بنابراین در صنایع غذایی به عنوان یک ماده پوشش‌دهنده در شکلات‌ها، برنج، خشکبار و آجیل مورد استفاده قرار گرفته است [۲۰]. این ماده زیستی یک پلی‌مر کاملاً بی‌شکل است که می‌تواند در حضور نرم‌کننده‌های دارای نقطه جوش بالا، مثل تری‌اتیلن‌گلیکول، گلیسرول و اولئیک اسید، به عنوان یک ماده ترموپلاستیک فرآوری شود [۲۳]. زئین از ترکیبات رایجی است که در ساخت پلاستیک‌ها، پوشش‌های کاغذ، چسب‌ها، جایگزین‌های لاک، تخته‌های لمینت و فیلم‌های جامد چاپ رنگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین از آن در صنعت دارو برای پوشش کپسول‌ها، ایجاد حفاظت، آزادسازی کنترل شده و پنهان کردن طعم‌ها و بوها استفاده شده است [۲۱]. همچنین کاربرد زئین به عنوان یک ماده ساختاری در مصارف بسته‌بندی به دلیل ویژگی‌های فیلم‌سازی آن مورد بررسی قرار گرفته است [۲۱ و ۲۲]. مخصوصاً اینکه زئین فیلم‌ها یا پوشش‌هایی سخت، براق، ضدخش، و ضد روغن ایجاد می‌کند که به حملات میکروبی مقاوم هستند. این پلی‌مر زیستی همچنین این قابلیت

1. Response surface methodology
2. Central composite design

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد اولیه

زئین ذرت (گرید Z3625) از شرکت سیگما-آلدریج (مادرید، اسپانیا) خریداری گردید و به محض دریافت بدون تخلیص بیشتر مورد استفاده قرار گرفت. اسید استیک گلاسیال با خلوص ۹۹/۷ درصد از شرکت ملکولا (انگلستان) تأمین شد.

۲-۲- تهیه محلول الکترورسی

محلول لازم برای تولید میکروالیاف از طریق حل کردن پودر زئین در مقادیر مختلف در اسید استیک گلاسیال در دمای محیط با استفاده از دستگاه ورتکس به منظور حل شدن کامل پروتئین، تهیه شد. بطوریکه غلظتهای (w/v) ۲۲، ۲۶ و ۳۰ درصد محلول زئین برای تولید میکروالیاف حاصل گردید.

۲-۳- اندازه گیری ویسکوزیته

جهت اندازه گیری ویسکوزیته محلولهای پلی مری از ویسکومتر چرخشی مدل Brookfield RV DVIII Ultra (ساخت شرکت بروکفیلد، کشور آمریکا) استفاده شد. اندازه گیریهای فوق در دمای اتاق (۲۵ °C) با استفاده از اسپیندل مدل SC4-31 در محدوده سرعت برش S^{-1} ۸۰-۱ صورت گرفت.

۲-۴- فرایند الکترورسی

از دستگاه الکترورسی مجهز به یک منبع انرژی با ولتاژ بالا در دامنه ۰ تا ۳۵ کیلوولت ساخت شرکت فناوران نانو مقیاس مدل ES1000 تک محوره (تهران، ایران) استفاده شد. آند دستگاه به یک سوزن فولادی ضدزنگ با قطر ۰/۹ میلی متر متصل بود که این سوزن از طریق یک سیم PTFE (پلی تترافلورواتیلن) به محلولهای بیوپلیمری که درون سرنگهای پلاستیکی ۵ میلی لیتری نگهداری می شدند، ارتباط می یافت. سرنگ در وضعیت افقی روی یک پمپ سرنگ دارای کنترل دیجیتالی قرار می گرفت، طوری که سوزن مستقیماً به شکل عمودی و رو به قسمت جمع کننده بود. سوزن به الکتروود ناشر دارای قطبیت مثبت و منبع انرژی ولتاژ بالا متصل می شد. از مخروط تیلوریک فواره از محلول پلی مری با بار مثبت شکل گرفت که در فاصله هوایی جابجا می شد و در روی جمع کننده می نشست. میکروالیاف بر روی ورق فویل

آلومینیومی که به غلتک مورد استفاده به عنوان جمع کننده وصل می شد، تجمع می یافتند. تمام آزمایشات الکترورسی در دمای اتاق انجام گرفت و زمان انجام هر آزمایش ۳۰ دقیقه بود.

۲-۵- تهیه لایه میکروالیاف

محلول مورد استفاده برای الکترورسی از انحلال پودر زئین در محلول اسید استیک گلاسیال به دست آمد. محلولهای تهیه شده برای الکترورسی در مقادیر مختلف سرعت جریان، ولتاژ و فواصل نوک سوزن تا جمع کننده. سرعت جریان به نحوی تنظیم شد تا بین مقادیر ۴، ۸ و ۱۲ میلی لیتر بر ساعت تغییر کند. همچنین میکروالیاف زئینی در ولتاژهای مختلف ۱۰، ۲۰ و ۳۰ کیلوولت تولید شدند. فواصل بین نوک سوزن تا جمع کننده نیز از ۱۰، ۱۵ و ۲۰ سانتی متر متغیر بودند. میکروالیاف الکترورسی شده به مدت یک شب در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد خشک شدند تا بعد با میکروسکوپ الکترونی (SEM) مشاهده شوند و یا بررسی بیشتری روی آنها انجام شود.

۲-۶- میکروسکوپ الکترونی پوشی

مورفولوژی الیاف الکترورسی شده پس از بمباران اتمی با مخلوط طلا و پالادیوم در خلأ، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM، مدل Hitachi S-4100) بررسی شد. تمام بررسیهای SEM در ولتاژ ۸/۰ کیلوولت انجام شدند. قطر الیاف الکترورسی با استفاده از نرم افزار Image J1.43 از روی میکروگرافهای SEM در بزرگنمایی واقعی شان با اندازه گیری ۵۰ مقطع از هر تصویر تعیین شد.

۲-۷- طرح آماری

چهار متغیر اصلی عبارت بودند از غلظت محلول زئین (X_1)، ولتاژ اعمال شده (X_2)، سرعت تغذیه محلول (X_3)، و فاصله بین نوک سوزن تا جمع کننده (X_4). این متغیرها با سه دامنه مختلف ۱-، ۰ و ۱+ کدگذاری شدند. جدول ۱ سطوح کدگذاری شده پارامترهای الکترورسی را نشان می دهد. میانگین قطر الیاف (برحسب میکرومتر) و مساحت سطح ویژه به عنوان پاسخ انتخاب شد. پاسخها و آنالیز واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی با استفاده از نرم افزار آماری Design Expert version 7 (شرکت State-Ease، دانشکده ایالتی پنسیلوانیا، ایالات متحده) تحلیل شدند.

Table 1 Actual and coded values of the variables based on central composite design for electrospun zein fibers

| Coded values | Actual Values | | | |
|--------------|-------------------------------|----------------------|--|------------------|
| | Polymer concentration (% w/v) | Applied voltage (kV) | Distance between needle tip and collector (cm) | Flow rate (ml/h) |
| -1 | 22 | 10 | 10 | 4 |
| 0 | 26 | 20 | 15 | 8 |
| +1 | 30 | 30 | 20 | 12 |

پلیمری در محلول بیشتر میشود، بارهای الکتریکی قرار گرفته روی جت الکتروریسی قادرند کشش کاملی به محلول وارد آورند و در نهایت الیاف پیوسته تشکیل میگردند و با افزایش ویسکوزیته قطر الیاف افزایش خواهد یافت [۹ و ۲۸]. شکل ۲ نشان دهنده این است که موثرترین متغیر در اندازه قطر الیاف، غلظت پلیمر میباشد [۲۰ و ۲۶]. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است با افزایش غلظت پلیمر، قطر الیاف افزایش مییابد. این امر ممکن است ناشی از مقاومت بیشتر محلول در برابر کشش توسط بارهای قرار گرفته روی فواره باشد [۲۸]. به غیر از الیاف دارای مهره و عاری از مهره، الکتروریسی قادر به تولید الیاف با مورفولوژیهای مختلف همچون متخلخل، لوله ای، طنابی شکل، شاخهای، ماریچ و توخالی میباشد. شکل ۱ نشان میدهد که ساختارهای لوله ای شکل الیاف از محلولهای زئین با غلظت % w/v ۳۰ و ۲۶ تولید میگردند (شکل ۱ E, F).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مورفولوژی الیاف: تأثیر غلظت محلول

همانطور که از جدول ۲ و شکل ۱ مشخص میگردد با افزایش غلظت پروتئین، ویسکوزیته افزایش یافته و فرآیند از حالت پاشش الکتریکی به الکتروریسی تبدیل شده است [۲۵، ۲۶ و ۲۷]. در یک ویسکوزیته کم، معمولاً الیاف قرار گرفته روی صفحه جمع کننده دارای مهره می باشند. وقتی که میزان ویسکوزیته افزایش یابد، یک تغییر جزئی در شکل مهره ها به وجود میآید یعنی آنها از شکل کروی به مخروطی تبدیل شده، در نهایت به شکل یک لیف یکنواخت در میآیند [۱۹ و ۲۸]. در یک میزان ویسکوزیته کمتر، مقدار ملکولهای حلال بیشتر بوده و میزان درهم آمیختگی زنجیرها کمتر است، در نهایت مهره ها در میان الیاف تشکیل میشوند. زمانی که ویسکوزیته افزایش مییابد بدان معنی که میزان درهم آمیختگی زنجیره های

Table 2. Viscosity, average fiber diameter, and electrospun fiber morphology of zein at various concentrations at a constant applied voltage of 20 kV, flow rate of 8 ml/h and distance between needle tip and collector of 15 cm

| Morphology | Average fiber diameter (μm) | Viscosity (m pa.s) | Concentration (w/v %) |
|------------------------|--|--------------------|-----------------------|
| Beads | - | 18.39 | 10 |
| Beads | - | 50.65 | 15 |
| Beads | - | 117.27 | 20 |
| Fibers and small beads | 0.393 | 247 | 22 |
| Fibers free of beads | 0.660 | 492.28 | 26 |
| Fibers free of beads | 1.258 | 888.28 | 30 |
| - | - | 1.8 | Viscosity of solvent |

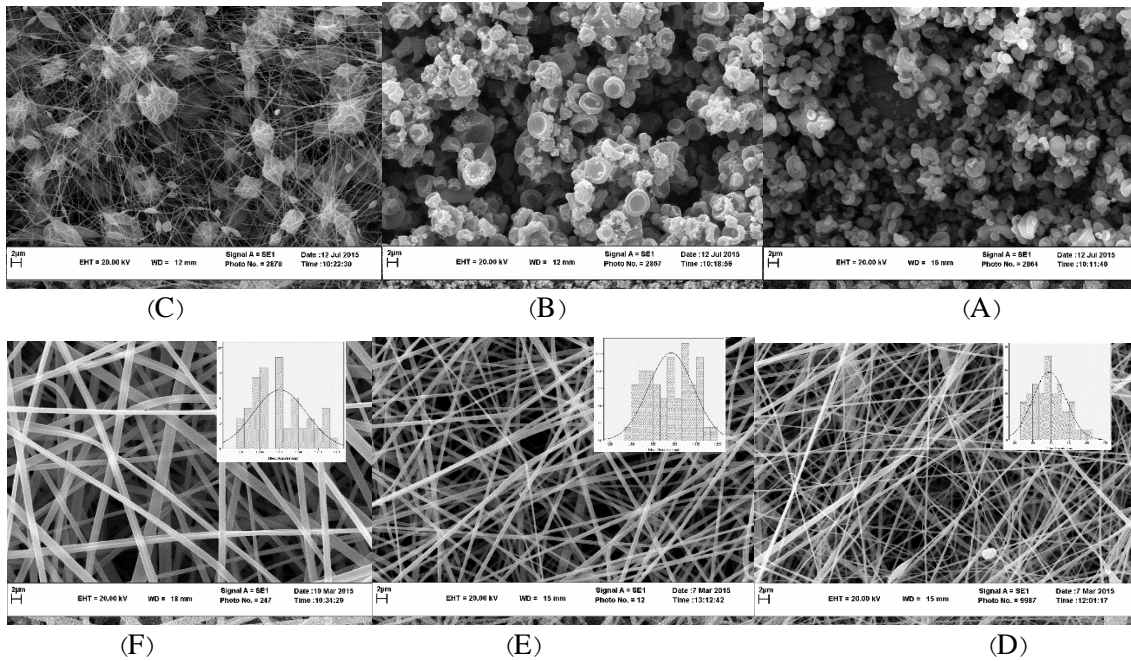


Figure 1 SEM images of zein fibers electrospun at a constant applied voltage of 20 kV, flow rate of 8 ml/h, and distance between needle tip and collector of 15 cm and at various zein concentrations: (a) 10 w/v %, (b) 15 w/v %, (c) 20 w/v %, (d) 22 w/v %, (e) 26 w/v %, (f) 30 w/v % .

و سرعت جریان محلول قطر الیاف افزایش میابد و با افزایش فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده، قطر کاهش میابد [۲۰]. شکل ۳ تأثیر ولتاژ (۱۰-۳۰ kV) را بر قطر الیاف زئین نشان می دهد. غلظت محلول زئین در مقدار ۲۶ w/v % ثابت می باشد و الکتروریسی در سرعت ثابت ۸ ml/h و فاصله ۱۵ cm بین نوک سوزن و جمع کننده انجام گرفت. همانطور که در شکل مشاهده می گردد با افزایش ولتاژ، میانگین قطر الیاف به تدریج افزایش میابد که این نتایج مشابه با نتایج تحقیقات [۹، ۲۹، ۲۰ و ۳۰] می باشد که علت آن را شاید بتوان این طور بیان نمود که با افزایش ولتاژ، شتاب فواره نیز افزایش میابد که این امر موجب کاهش زمان پرواز جت میشود، الیاف زمان کمتری برای کشش پیدا میکنند و سریعتر بر روی جمع کننده جمع میگردند، در نتیجه قطر الیاف افزایش میابد. [۲۸].

شکل ۴ تأثیر سرعت جریان محلول را بر میانگین قطر الیاف نشان می دهد (۴-۱۲ ml/h). غلظت محلول زئین در مقدار ۲۶ w/v % ثابت و فرآیند الکتروریسی در ولتاژ ۲۰ kV و فاصله ۱۵ cm بین نوک سوزن و جمع کننده انجام گرفت. همانطور که در شکل مشاهده می گردد، تغییر سرعت جریان تأثیر معنی داری بر میانگین قطر الیاف زئین ندارد که مطابق با نتایج [۳۱ و ۳۲] می باشد.

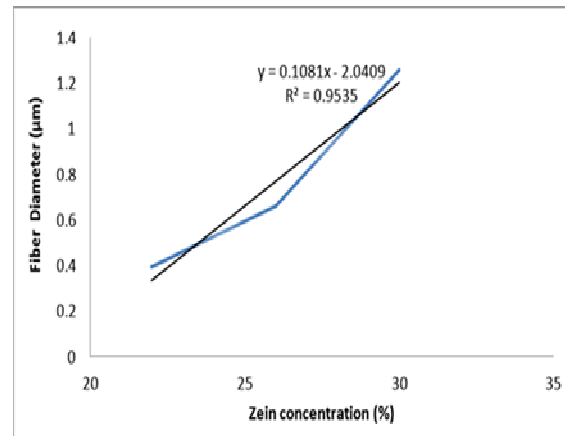


Figure 2 Effect of zein concentration (w/v %) on diameter (μm) of zein fibers electrospun at a constant applied voltage of 20 kV, flow rate of 8 ml/h and distance between needle tip and collector of 15 cm.

۳-۲- مورفولوژی الیاف الکتروریسی: تأثیر

پارامترهای فرآیندی

اثر پارامترهای فرآیندی (ولتاژ، سرعت محلول و فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده) بر قطر الیاف در شکلهای ۵-۳ آورده شده است. در تحقیق مشابهی که توسط ترس گینر همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، نتیجه گرفتند که پارامترهای فرآیند تأثیر معنی داری بر مورفولوژی الیاف زئین ندارد. اما با افزایش ولتاژ

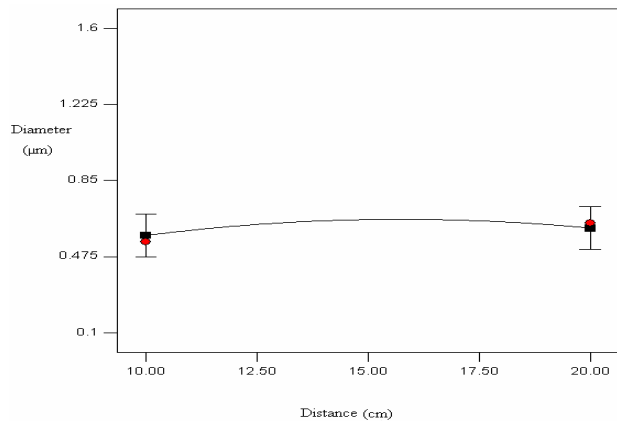


Figure 5 Influence of Distance between needle tip and collector (cm) on fiber diameter (μm) in electrospinning at a constant zein solution concentration of 26 w/v %, voltage of 20 kV and flow rate of 8 ml/h.

۳-۳- مدل سازی

برای آنالیز رگرسیون، همه ۳۰ نقطه مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۳) و ضرایب پارامترها، احتمال معنی دار بودن (P -value) و معادله درجه دوم بدست آمد (جدول ۴). جدول ۴ نشان میدهد که ضرایب خطی مانند غلظت و ولتاژ (X_1, X_2) تاثیر معنیداری بر میانگین قطر الیاف دارد ($P < 0.0001$). ضرایب درجه دوم این دو پارامتر (X_1^2, X_2^2) و متقابل آنها ($X_1 X_2$) تاثیر معنیداری بر میانگین قطر الیاف دارد ($P < 0.05$). در حالیکه اثرات خطی، متقابل و ضرایب درجه دوم سایر پارامترها تاثیر معنی داری ندارند. مدلی که میتوان برای این ۴ متغیر بر اساس روش پاسخ سطح پیشنهاد داد به شرح ذیل است:

$$Y = 1.19 + 0.85 X_1 + 0.23 X_2 + 0.1 X_1 X_2 + 0.21 X_1^2 - 0.11 X_2^2$$

Y عبارت است از میانگین قطر الیاف (μm)، X_1 غلظت محلول زئین (w/v) و X_2 ولتاژ اعمال شده (kV).

معادله فوق نشان دهنده این است که غلظت محلول و ولتاژ رابطه مستقیم با میانگین قطر الیاف دارد. بنابراین، افزایش غلظت محلول و ولتاژ منجر به افزایش میانگین قطر الیاف میگردد. همچنین، معادله فوق بیانگر این است که غلظت محلول بیشترین تاثیر را در فرآیند الکترورسی دارد زیرا بالاترین ضریب را در معادله دارد (۰/۴). این نتیجه مطابق با نتایج سایر محققین است که پیشنهاد دادند پارامترهای محلول،

شکل ۵ تاثیر فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده (۲۰ cm - ۱۰) را بر میانگین قطر الیاف زئین نمایش میدهد. غلظت محلول زئین در مقدار % ۲۶w/v ثابت میباشد و فرآیند الکترورسی در ولتاژ ۲۰ kV و سرعت جریان ۸ ml/h انجام گرفت. فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده تاثیر معنی داری بر میانگین قطر الیاف ندارد اما همانطور که در شکل مشاهده میگردد میانگین قطر الیاف با افزایش فاصله، افزایش مییابد و این امر ممکن است به دلیل کاهش شدت میدان الکتریکی باشد که منجر به کشش کمتر الیاف میگردد [۲۸].

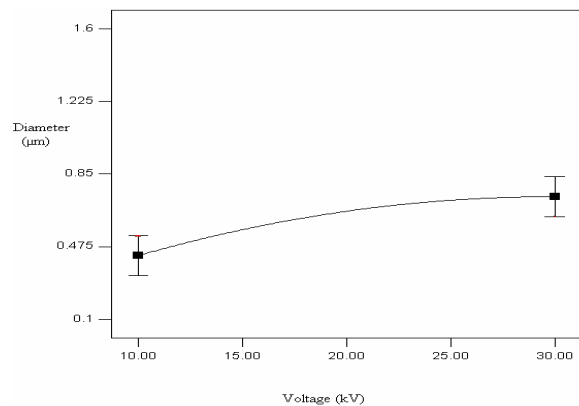


Figure 3 Influence of applied voltage (kV) on fiber diameter (μm) in electrospinning at a constant zein solution concentration of 26 w/v %, flow rate of 8 ml/h and distance between needle tip and collector of 15 cm.

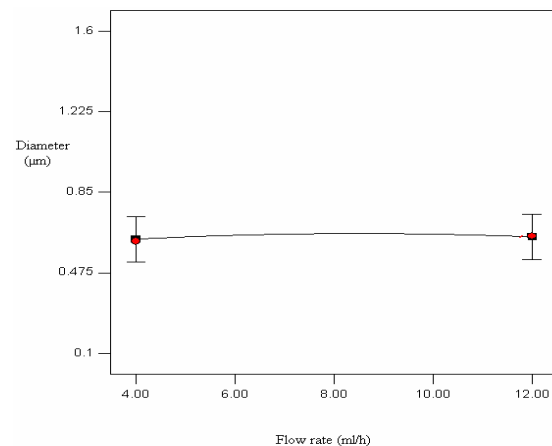


Figure 4 Influence of Flow rate (ml/h) on fiber diameter (μm) in electrospinning at a constant zein solution concentration of 26 w/v %, voltage of 20 kV and distance between needle tip and collector of 15 cm.

وسیله این مدل توضیح داد. در جدول ۴ نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) برای این مدل آورده شده است و معنی دار بودن اثرات خطی، درجه دوم و متقابل ضرایب مدل رگرسیون برای پاسخ در سطوح ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ بررسی گردید.

به ویژه ویسکوزیته و غلظت بیشترین تأثیر را بر فرآیند الکترورسی پلی اورتان و پلی لاکتیک-پلی گلیکولید در مقایسه با پارامترهای فرآیند دارد [۳۳]. خوب برازش شدن مدل بوسیله R^2 ارزیابی میشود که نشان دهنده ضریب تبیین است. R^2 بدست آمده برابر با ۰/۹۳۹۵ میباشد که نشان میدهد ۹۳/۹۵٪ تمامی متغیرها را میتوان به

Table 3 Central composite design for the variables and experimental response

| Run | Polymer concentration (X_1) | Applied voltage (X_2) | Distance between needle tip and collector (X_3) | Flow rate (X_4) | Response Average fiber diameter (μm) |
|-----|---------------------------------|---------------------------|---|---------------------|---|
| 1 | +1 | -1 | -1 | -1 | 0.8 |
| 2 | +1 | +1 | +1 | -1 | 1.211 |
| 3 | -1 | +1 | +1 | +1 | 0.356 |
| 4 | +1 | -1 | +1 | -1 | 0.922 |
| 5 | +1 | -1 | +1 | +1 | 0.738 |
| 6 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0.541 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.56 |
| 8 | -1 | +1 | -1 | -1 | 0.343 |
| 9 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0.614 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.69 |
| 11 | -1 | -1 | -1 | +1 | 0.149 |
| 12 | +1 | -1 | -1 | +1 | 0.824 |
| 13 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0.549 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0.646 |
| 15 | +1 | 0 | 0 | 0 | 1.258 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.715 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 |
| 18 | +1 | +1 | -1 | +1 | 1.142 |
| 19 | 0 | 0 | +1 | 0 | 0.639 |
| 20 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0.252 |
| 21 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0.306 |
| 22 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0.393 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.71 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0.621 |
| 25 | +1 | +1 | -1 | -1 | 1.322 |
| 26 | -1 | -1 | +1 | -1 | 0.179 |
| 27 | -1 | +1 | -1 | +1 | 0.421 |
| 28 | +1 | +1 | +1 | +1 | 1.6 |
| 29 | -1 | -1 | +1 | +1 | 0.174 |
| 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.589 |

Table 4 Analysis of variance results for fiber diameter (μm)

| p-value | F-Value | Mean of Squares (MS) | Degree of Freedom (DF) | Sum of Squares (SS) | Source |
|---------|---------|----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| <0.0001 | 74.6 | 0.70 | 5 | 3.51 | Mean |
| <0.0001 | 40.06 | 0.38 | 1 | 0.38 | Concentration- X_1 |
| <0.0001 | 49.54 | 0.47 | 1 | 0.47 | Voltage- X_2 |
| 0.023 | 11.57 | 0.11 | 1 | 0.11 | X_1X_2 |
| 0.0148 | 6.90 | 0.065 | 1 | 0.065 | X_1^2 |
| 0.0444 | 4.50 | 0.042 | 1 | 0.042 | X_2^2 |
| - | - | 9.398 | 24 | 0.23 | Residual |
| 0.1799 | 2.31 | 0.011 | 19 | 0.20 | Lack of Fit |
| - | - | 4.613 | 5 | 0.023 | Pure error |
| - | - | - | 29 | 3.73 | Total |

۳-۵- نمودار سطح پاسخ قطر الیاف

شکل ۷ بیانگر سطح پاسخ سه بعدی میانگین قطر الیاف به عنوان تابعی از غلظت و ولتاژ در فاصله ثابت ۱۵cm و سرعت جریان ۸ ml/h می باشد. تصویر سه بعدی سطح پاسخ نشان میدهد که قطر الیاف نسبت به غلظت و ولتاژ تغییرات دارد. بطوریکه با افزایش غلظت، قطر الیاف افزایش مییابد که ممکن است ناشی از مقاومت بیشتر محلول در برابر کشش توسط بارهای قرار گرفته روی فواره باشد [۲۸]. با افزایش ولتاژ قطر الیاف نیز افزایش یافته که با افزایش ولتاژ، شتاب فواره نیز افزایش می یابد که این امر موجب کاهش زمان پرواز جت میشود، الیاف زمان کمتری برای کشش پیدا میکنند و سریعتر بر روی جمع کننده جمع میگردند، در نتیجه قطر الیاف افزایش می یابد [۲۸].

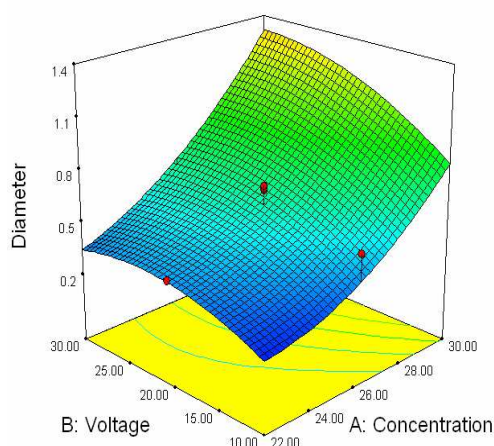


Figure 7 Response surface of fiber diameter (μm) showing the effect of solution concentration (w/v %) and applied voltage (kV).

۳-۶- تفسیر پلات باقی مانده ها

علاوه بر ضرایب مدل رگرسیون، صحت مدل را میتوان با آنالیز پلات باقیمانده هاتعیین نمود. باقیمانده ها عناصری از متغیر هستند که نمیتوان با مدل توضیح داد و معمولاً دارای توزیع نرمال هستند [۲۹]. پلات احتمال نرمال بودن^۱ یک روش گرافیکی مناسب برای تعیین نرمال بودن باقی مانده ها میباشد. امکان تهیه پلات باقی مانده ها به منظور بررسی توزیع نرمال توسط نرم افزار Design Expert وجود دارد (شکل ۶). شکل ۶ پلات احتمال نرمال بودن باقی مانده ها را نشان میدهد و بیانگر این است که باقی مانده ها به طور منطقی بر خط مستقیم برازش شده که نشان دهنده توزیع نرمال باقی مانده های می باشد.

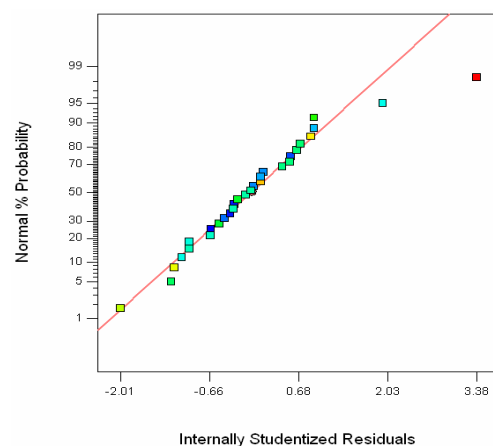


Figure 6 The probability of normality for residuals

1. Residual plot
2. Normal probability plot

- [8]Kriegel, C., Arrechi, A., Kit, K.M., McClements, D.J., Weiss, J., 2008. Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (8), 775–797.
- [9]Li, Y., Lim, L.T., Kakuda, Y., 2009. Electrospun zein fibers as carriers to stabilize (-)-epigallocatechingallate. *Journal of Food Science* 74 (3), C233–C240.
- [10]Sozer, N., Kokini, J.L., 2009. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology* 27 (2), 82–89.
- [11]Lopez-Rubio, A., & Lgaron, J. M. 2012. Whey protein capsules obtained through electrospinning for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 200-206.
- [12]Alborzi, S. 2012. Encapsulation of Folic Acid in Sodium Alginate-Pectin-Poly (Ethylene Oxide) Electrospun Fibers to Increase Its Stability. Ph.D. Thesis, Food Science and Technology. The University of Guelph.
- [13]Wongsasulak, S., Patapeejumruswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T. 2010. Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *Journal of Food Engineering*, 98, 370-376.
- [14]Zhou, Y. & Lim, L. T. 2009. Activation of Lactoperoxidase System in Milk by Glucose Oxidase Immobilized in Electrospun Polylactide Microfibers. *Journal of Food Science*, 74(2) 170-176.
- [15]Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J.D., Hirvonen, J.K., Beck Tan, N.C., 2001a. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 42 (19), 8163–8170.
- [16]Sill, T.J., von Recum, A., 2008. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29 (13), 1989–2006.
- [17]Yarin, A.L., Koombhongse, S., Reneker, D.H., 2001. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* 90 (9), 4836–4846.
- [18]Reneker, D.H., Chun, I., 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7 (3), 216–223.
- [19]Ghorani, B., Tucker, N. 2015. Review: Fundamentals of electrospinning as a novel

۴- نتیجه گیری

نتایج نشان داد که غلظت زئین تأثیر معنی داری ($P < 0.0001$) بر مورفولوژی و قطر الیاف داشت بطوریکه در غلظتهای ۳۰w/v و ۲۶ الیاف فاقد مهره و یکنواخت با میانگین قطر $1/250 \mu\text{m}$ و $0/66$ به ترتیب تولید شدند. ولتاژ الکترورسی تأثیر معنی داری ($P < 0.0001$) بر قطر الیاف داشت بطوریکه با افزایش ولتاژ قطر الیاف نیز افزایش یافت. همچنین، اثر متقابل بین غلظت زئین و ولتاژ تأثیر معنی داری ($P < 0.05$) بر قطر الیاف داشت. اما، فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده و سرعت جریان تأثیر معنی داری بر قطر الیاف نداشت. در نهایت اینکه با تغییر غلظت محلول زئین، ولتاژ الکترورسی، سرعت جریان و فاصله بین نوک سوزن و جمع کننده میتوان میکرو الیاف بدون مهره و یکنواخت تولید نمود.

۵- منابع

- [1]Karp, J.M., Langer, R., 2007. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology* 18 (5), 454–459.
- [2]Ranganath, S.H., Wang, C.H., 2008. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials* 29 (20), 2996–3003.
- [3]Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L., 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering* 83 (1), 31–40.
- [4]Uchegbu, F.I., Schätzlein, G.A., 2006. *Polymer in Drug Delivery*. CRC Press, Taylor & Francis Group, FL.
- [5]Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49 (26), 5603–5621.
- [6]Kenawy, E.R., Abdel-Hay, F.I., El-Newehy, M.H., Wnek, G.E., 2009. Processing of polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. *Materials Chemistry and Physics* 113 (1), 296–302.
- [7]Zong, X.H., Kim, K., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S., Chu, B., 2002. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 43 (16), 4403–4412.

- zeinnanofibers mats. *Journal of Applied Polymer Science*, 103, 380–385.
- [27]Selling, G.W., Biswas, A., Patel, A., Walls, D., Dunalp, C., Wei, Y. 2007. Impact of Solvent on Electrospinning of Zein and Analysis of Resulting Fibers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 208, 1002-1010.
- [28]Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Lim, T.-C., & Ma, Z. 2005. An introduction to electrospinning and nanofibers. Singapore: World Scientific Publishing Company, Inc.
- [29]Neo, Y. P. 2013. Electrospinning as a novel encapsulation method for food applications. Ph.D. Thesis, Food Science and Technology. The University of Auckland.
- [30]Wang, Y., Chen, L. 2012. Electrospinning of Prolamin Proteins in Acetic Acid: The Effects of Protein Conformation and Aggregation in Solution. *Macromolecular Materials and Engineering*, 297, 902–913.
- [31]Beachley, V., & Wen, X. (2009). Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 663-668.
- [32]Tan, S. H., Inai, R., Kotaki, M., & Ramakrishna, S. 2005. Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process. *Polymer*, 46, 6128-6134.
- [33]Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E., & Erman, B. 2002. Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer*, 43, 3303-3309.
- delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227-240.
- [20]Torres-Giner, S., Gimenez, E., & Lagaron, J. M. 2008. Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 22, 601–614.
- [21]Shukla, R., & Cheryan, M. 2001. Zein: The industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13, 171–192.
- [22]Corradini, E. A., Souto de Medeiros, E., Carvalho, A. J. F., Curvelo, A. A. S., & Mattoso, L. H. C. 2006. Mechanical and morphological characterization of starch/zein blends plasticized with glycerol. *Journal of Applied Polymer Science*, 101, 4133–4139.
- [23]Lawton, J. W. 2002. Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry*, 79, 1–18.
- [24]Lagaron, J. M., Gimenez, E., Sanchez-Garcia, M. A., Ocio, M. J., & Fendler, A. (2006). Second generation nanocomposites: A must in passive and active packaging and biopackaging applications. The 15th IAPRI World conference in packaging, October, Tokio, Japan, 2006.
- [25]Miyoshi, T., Toyohara, K., & Minematsu, H. 2005. Preparation of ultrafine fibrous zein membranes via electrospinning. *Polymer International*, 54, 1187–1190.
- [26]Yao, C., Li, X., & Song, T. 2007. Electrospinning and crosslinking of

Production of zein protein microfiber by electrospinning

Miri, M. A. ¹, Habibi Najafi, M. B. ^{2*}, Movaffagh, J. ³, Najaf Najafi, M. ⁴, Ghorani, B. ⁵, Koocheki, A. ⁶

1. Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3. Targeted Drug Delivery Research Center, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Assistant Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources center, Mashhad, Iran
5. Assistant Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran
6. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: 2016/01/26 Accepted: 2016/04/30)

Biodegradable edible zein microfibers were prepared using acetic acid as solvent. Uniform and bead-free zein fibers could be obtained by changing the solution concentration, the electrospinning voltage, the solution feed rate and the distance between needle tip and collector. The solution concentration at three levels: 22, 26 and 30 w/v %, the electrospinning voltage at three levels: 10, 20 and 30 kV, the solution feed rate at three levels: 4, 8 and 12 ml/h and the distance between needle tip and collector at three levels: 10, 15 and 20 cm were studied. Central composite design (CCD) was utilized to study the effect of electrospinning parameters of zein solution and the data were analyzed using response surface methodology (RSM). According to results of this research, the solution concentration had significant influence ($P < 0.0001$) on morphology and diameter of fibers. By increasing the solution concentration, uniform and bead-free fibers were obtained. As the solution concentration was increased, the fiber diameters were also increased. Furthermore, the electrospinning voltage had significant effect ($P < 0.0001$) on fiber diameters. By increasing the electrospinning voltage, fiber diameters increased. The solution feed rate and the distance between needle tip and collector hadn't significant influence on fiber diameters. In this research, effect of the solution concentration and processing parameters on zein fiber morphology were studied. Zein microfibers could be used in food industry in different uses like packaging and encapsulation.

Key words: Electrospinning, Zein, Microfiber, Morphology.

* Corresponding Author E-Mail address: habibi@um.ac.ir