



سنتر و بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ضد میکروبی بیونانو کامپوزیت‌های بر پایه بیوپلیمر کربوکسی متیل کیتوسان-نانورس مونت موریلونیت در حضور نانوذرات اکسید تیتانیم

حسین انور<sup>۱</sup>، حسین شیخ‌لویی بناب<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.

۲- استادیار گروه شیمی و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

در این پژوهش، بیونانو کامپوزیت ضد میکروبی بر پایه بیوپلیمر کربوکسی متیل کیتوسان-نانورس مونت موریلونیت در حضور نانوذرات اکسید تیتانیم سنتز شد. بررسی تصاویر مورفولوژی سطح شکست با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان دهنده سطح زبر و ناهمگن بیونانو کامپوزیت‌ها در مقایسه با کربوکسی متیل کیتوسان خالص می‌باشد. نتایج آزمون پراش پرتو X نشان داد که نحوه پخش نانورس در حضور نانوذرات اکسید تیتانیم از ورقه‌ای کامل به ورقه‌ای بین‌لایه‌ای تغییر نموده است. افزودن نانوذرات اکسید تیتانیم باعث افزایش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) کدورت در نانوکامپوزیت‌ها شد. تأثیر نانوذره اکسید تیتانیم بر کاهش مقدار باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بیش از مقدار باکتری گرم منفی اشرشیاکلی است و با افزایش درصد نانوذره اکسید تیتانیم کارایی آن در حذف کلونی‌های هر دو باکتری بیشتر می‌شود. میزان انحلال‌پذیری در آب و نفوذپذیری نسبت به بخار در فیلم‌های بیونانو کامپوزیتی با افزایش درصد وزنی نانوذرات اکسید تیتانیم کاهش بیشتری یافت. استحکام کششی فیلم‌های حاوی نانوذرات اکسید تیتانیم بیشتر از استحکام کششی فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص می‌باشد که از نظر آماری معنی‌دار است ( $p < 0.05$ ). این تحقیق پتانسیل بالای بیونانو کامپوزیت را در جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا به اثبات رساند و نشان داد که می‌توان از چنین بسته‌بندی‌هایی برای افزایش عمر نگهداری مواد غذایی سود برد.

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۲۵

کلمات کلیدی:

فیلم فعال، کربوکسی متیل کیتوسان، مونت موریلونیت، دی اکسید تیتانیم، خواص ضد میکروبی.

DOI: 10.52547/fsct.18.03.24

\* مسئول مکاتبات:

H.Sheikhloie@Iau-maragheh.ac.ir

## ۱- مقدمه

پیشرفت چشم‌گیر صنایع پتروشیمی و فناوری‌های مربوط به تولید پلیمرهای سنتزی، موجب کاربرد گسترده مواد پلاستیکی در بسته‌بندی شده است به طوری که بیش از ۴۲ درصد از کل مواد پلاستیکی جهان در بخش بسته‌بندی استفاده شده و بسته‌بندی مواد غذایی با به‌کارگیری حدود ۴۷ درصد از مواد پلاستیکی صنعت بسته‌بندی، بزرگترین بازار مصرف مواد پلاستیکی است. بسته‌بندی‌های پلاستیکی ویژگی‌های مطلوب مورد نظر در بسته‌بندی مواد غذایی مانند خواص مکانیکی مناسب و نفوذپذیری کم در مقابل رطوبت را دارا می‌باشند [۱]. از طرفی تجزیه مواد پلاستیکی سنتزی در طبیعت فرآیندی بسیار کند است که در نتیجه سبب ایجاد مشکلات زیست محیطی می‌شود [۲]. از دیگر معایب این بسته‌بندی‌ها، مهاجرت برخی از ترکیبات مورد استفاده در فرمولاسیون<sup>۱</sup> آن‌ها به درون ماده غذایی می‌باشد که سبب ایجاد طعم بد، افت ایمنی بهداشتی و صدمه به سلامت مصرف‌کنندگان می‌شود [۳]. بنابراین در سال‌های اخیر یافتن جایگزین‌های مناسب زیست‌تخریب پذیر برای پلاستیک‌های سنتزی، توجه پژوهش‌گران را به خود معطوف نموده است. فیلم‌های زیست تخریب پذیر انتخاب مناسبی برای این امر هستند. کیتوسان که عمدتاً از استیل‌زدایی کیتین که از استخوان سخت پوستان مشتق می‌شوند، به دست می‌آید، یکی از مهم‌ترین پلی‌مرهای طبیعی مورد استفاده در بسته‌بندی‌های زیستی است که دارای خواص با ارزشی به‌عنوان بیومتریال<sup>۲</sup> یا ماده زیستی دارد چرا که کیتوسان زیست‌سازگار، زیست‌تجزیه‌پذیر، غیرسمی و نیز دارای خواص ضد میکروبی است [۴، ۵]. خاصیت ضد میکروبی کیتوسان ناشی از گروه‌های آمینی با بار مثبت است. این گروه‌ها با غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها که دارای بار منفی است واکنش می‌دهند. این واکنش منجر به نشت اجزاء پروتئینی و سایر اجزاء درون سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌شود [۶]. با توجه به حلالیت ضعیف کیتوسان، کربوکسی‌متیل‌کیتوسان که مشتق شده از کیتوسان است، محلول در آب بوده و توجه زیادی را به خود جلب کرده است. کربوکسی‌متیل‌کیتوسان نه تنها دارای حلالیت خوب در آب است. بلکه دارای خواص شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی منحصر به فرد مانند ویسکوزیته بالا،

3. Hydrodynamic  
4. Hydrogels  
5. Toughness  
6. Aspect ratio  
7. Food and Drug Administration  
8. Codex Alimentarius  
9. Young's Modulus

1. Formulation  
2. Biomaterial

حجم هیدرودینامیکی<sup>۳</sup> بالا، مسمومیت کم، سازگاری زیستی و توانایی خوب برای تشکیل فیلم‌ها، الیاف‌ها و هیدروژل‌ها<sup>۴</sup> است [۷، ۸].

تولید نانوکامپوزیت‌های زیست پلیمری حاوی پرکننده‌های دارای ابعاد نانومتری، یکی از جدیدترین روش‌های بهبود خواص کاربردی فیلم‌های زیست پلیمری می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که استفاده از نانو پرکننده‌ها، موجب بهبود ویژگی‌هایی مانند بازدارندگی در مقابل گازها، مقاومت حرارتی، سختی و چقرمگی<sup>۵</sup> شده است [۹، ۱۰]. متداول‌ترین سیلیکات لایه‌ای مورد استفاده در تولید نانو کامپوزیت‌های زیست پلیمری، مونت‌موریلونیت می‌باشد. مونت‌موریلونیت (MMT) نانو ماده‌ای زیست سازگار، دارای قیمت پایین و فرایندپذیر است. با توجه به اندازه ضخامت (۱ نانومتر) و طول (۲۰ نانومتر تا چندین میکرومتر)؛ مولکول مونت‌موریلونیت دارای نسبت منظر<sup>۶</sup> ۱۰۰۰-۵۰ و سطح مخصوص  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  می‌باشد و به دلیل داشتن گروه‌های عاملی آب دوست، تمایل زیادی به ترکیب با کربوکسی‌متیل‌کیتوسان دارد. بهبود ویژگی‌های کاربردی فیلم‌های زیست پلیمری توسط نانو ذرات فلزی از جمله تیتانیوم دی‌اکسید ( $\text{TiO}_2$ ) در سال‌های اخیر، مورد توجه قرار گرفته است [۱۱، ۱۲، ۱۳]. نانو ذرات  $\text{TiO}_2$  غیرسمی و دارای فعالیت ضد میکروبی علیه انواع میکروارگانیسم‌ها هستند و در صنعت مواد غذایی به عنوان یک افزودنی در نظر گرفته می‌شوند. کاربرد  $\text{TiO}_2$  در مواد غذایی و سطوح در تماس مستقیم با آن توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA)<sup>۷</sup>، اتحادیه اروپا و استاندارد کدکس<sup>۸</sup> تایید شده است [۱۳]. روی سطح نانو ذره  $\text{TiO}_2$  گروه‌های دارای بار مثبت وجود دارد، بنابراین این نانو ذره ماهیت قطبی دارد و با بیوپلیمرهای طبیعی سازگار است. زلفی و همکاران [۱۴] نیز گزارش نمودند که با افزودن ۵-۱ درصد وزنی  $\text{TiO}_2$  به فیلم زیست پلیمری کفیران- ایزوله پروتئین آب پنیر میزان رطوبت، جذب رطوبت، حلالیت در آب و نفوذپذیری نسبت به بخار آب به طور معنی داری کاهش می‌یابد. آن‌ها مشاهده نمودند که با افزایش غلظت نانوذرات مقاومت به کشش و مدول یانگ<sup>۹</sup>

گلیسرول، ایزوپروپیل الکل، استون، اسید استیک و سدیم هیدروکسید همگی با بالاترین درجه خلوص از شرکت Merck آلمان تهیه شدند و بدون نیاز به خالص سازی اولیه، همان گونه که خریداری شده بودند، مصرف گردیدند. باکتری اشرشیاکلی و باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

برای مطالعه مورفولوژی سطح هیدروژل نانوکامپوزیت سنتز شده، از روش میکروسکوپ الکترونی (SEM) با مدل Vega Tescan- استفاده شد. ساختار نانوکامپوزیت های سنتزی با دستگاه XRD با مدل Siemens D-500 با طول موج  $\lambda=1.54\text{\AA}$  (Cu-K $\alpha$ ) در لوله ولتاژ 35KV و جریان 30 mA بررسی گردید. برای بررسی استحکام مکانیکی از دستگاه Texture Analyzer یونیورسال ۲۰ کیلو نیوتنی شرکت Shoj تایوان با قابلیت انجام تست های کشش، خمش، فشار و چسبندگی استفاده شد. میزان شفافیت فیلم ها نیز توسط اسپکتروفتومتر دو شعاعی مدل UV-1700 ساخت کشور ژاپن اندازه گیری شده است.

## ۲-۲- باکتری های مورد استفاده و روش

### نگهداری آنها

باکتری های مورد استفاده جهت تهیه نانوکامپوزیت شامل <sup>۳</sup> S. aureus و <sup>۴</sup> E.coli بودند. باکتری ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. هنگام تهیه کشت مایع از باکتری ها یک لوپ پر هر نمونه باکتری برداشته شده و در شرایط کاملاً سترون در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع BHI<sup>۵</sup> کشت داده شد. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱۴۰-۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت در آون گرمخانه گذاری شد. در نهایت عمل رقیق کردن کشت ها با استفاده از آب مقطر استریل تا رسیدن به جمعیت میکروبی مورد نیاز برای کشت سطحی صورت گرفت.

### ۲-۳- سنتز نانوبیوکامپوزیت

#### ۲-۳-۱- آماده سازی کربوکسی متیل کیتوسان محلول

##### در آب

برای کربوکسی متیله کردن کیتوسان روش آزمایشی به شرح زیر انجام شده است؛ حجم خاصی از محلول سدیم هیدروکسید

کاهش و افزایش طول تا نقطه شکست افزایش می یابد. نتایج مشابهی توسط Li و همکاران، Zhou و همکاران [۱۲،۱۳] درباره اثر نانو ذرات Tio<sub>2</sub> بر خواص فیلم پروتئین آب پنیر گزارش شده است. اگر چه تأثیر هر یک از نانو مواد (مونت موریلونیت و دی اکسید تیتانیم) به تنهایی بر خواص ساختاری، مکانیکی و بازاریابی فیلم ها مورد بررسی قرار گرفته است، اما تاکنون گزارش چاپ شده ای درباره استفاده هم زمان آنها به عنوان پرکننده در یک فیلم زیست پلیمری و به ویژه کربوکسی متیل کیتوسان ارائه نشده است. تنها پژوهش صورت گرفته تقریباً مشابه در مورد ارزیابی خصوصیات کاربردی فیلم های زیست نانو کامپوزیتی نشاسته حاوی مونت موریلونیت و تیتانیوم دی اکسید بوده است. لازم به ذکر است که بیشتر اثر مخلوط نانو ذرات مونت موریلونیت و Tio<sub>2</sub> بر خواص نوری (رنگ، کدورت، و عبور پرتوهای فرابنفش)، حرارتی (دمای انتقال شیشه ای و ذوب)، مورفولوژی<sup>۱</sup> و توپوگرافی<sup>۲</sup> سطح فیلم ها و پیوندهای شیمیایی بین نانو ذرات و نشاسته مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۵]. هدف اصلی مطالعه حاضر تهیه فیلم های نانوکامپوزیتی سازگار با محیط زیست با استفاده از کربوکسی متیل کیتوسان، ماده معدنی نانورس مونت موریلونیت و نانوذره تیتانیم دی اکسید برای آزمایش اثر ترکیبی آنها بر فعالیت ضد میکروبی و بررسی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی بود. مشخصات فیلم های نانوکامپوزیتی با استفاده از دستگاه SEM و XRD تعیین شدند. استحکام مکانیکی، انحلال پذیری فیلم ها در آب، جذب اشعه فرابنفش، میزان نفوذ پذیری نسبت به بخار آب و همچنین فعالیت ضد میکروبی فیلم های بیونانوکامپوزیت مورد بحث و بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد و دستگاه ها

کیتوسان از شرکت Sigma Aldrich آمریکا، خاک رس مونت موریلونیت (MMT-Na<sup>+</sup>) از شرکت Southern clay و نانوذرات اکسید تیتانیم از شرکت Evonik GmbH و Degussa با میانگین اندازه نانوذرات ۲۱ نانومتر خریداری شدند. مواد دیگر مورد استفاده در آزمایشگاه از جمله

3. *Staphylococcus aureus*  
4. *Escherichia coli*  
5. Brain Heart Infusion

1. Morphology  
2. Topography

فیلمی جهت برقراری شارش الکترون‌ها از سطح، رسانا می‌شود.

#### ۲-۴-۲- آزمون پراش پرتو ایکس (XRD)

برای بررسی ساختار نانوکامپوزیت‌های سنتزی از آزمون پراش اشعه ایکس استفاده گردید. ژنراتور تولید اشعه ایکس در KV ۳۵ و جریان ۳۰ mA تنظیم شد و نمونه‌ها در معرض پرتو ایکس با طول موج ۱/۵۴ قرار گرفتند. تشعشعات باتایشی از نمونه، در دمای محیط و در محدوده  $2\theta = 10^\circ - 40^\circ$  برای نمونه‌های حاوی نانورس و  $2\theta = 10^\circ - 40^\circ$  برای نمونه‌های حاوی  $TiO_2$  جمع‌آوری و نمودار مربوط به شدت بازتابش آن‌ها رسم گردید. اندازه گام‌ها ۰/۰۲ درجه و سرعت انجام آزمون ۱ درجه در دقیقه بود. پس از رسم منحنی‌ها و تشخیص پیک پراش، برای تعیین فاصله بین لایه‌ها از قانون براگ استفاده شد.

#### ۲-۴-۳- آنالیز استحکام مکانیکی نمونه‌های فیلمی

نمونه‌ها برای این آزمایش یکی طبق استاندارد ASTM D638 به صورت نوارهای باریکی به طول ۶۰ میلی‌متر و عرض ۲۰ میلی‌متر بریده شده و ضخامت هر نمونه بریده شده توسط ریزسنج  $120 \pm 5 \mu m$  اندازه‌گیری شده است. پارامترهای میزان رطوبت نسبی  $50 \pm 5$  درصد، دمای اتاق  $25^\circ C$ ، طول مقیاس ۴۰ میلی‌متر و سرعت کشش حدود  $5 \text{ mm.min}^{-1}$  برای انجام تست‌های استحکام کششی فیلم‌ها در نظر گرفته شده است. برای داشتن تکرارپذیری در انجام تست‌های استحکام مکانیکی، تست‌های کشش برای سه نمونه یکسان از یک نوع فیلم انجام شده و متوسط مقادیر به دست آمده گزارش شده است.

#### ۲-۴-۴- آنالیز اندازه‌گیری میزان انحلال‌پذیری

##### نمونه‌های فیلمی در آب

حلالیت در آب عبارت است از درصد ماده خشک فیلم که پس از ۲۴ ساعت غوطه‌وری در آب مقطر به حالت محلول در می‌آید. ابتدا نمونه‌هایی به ابعاد  $20 \times 20$  میلی‌متر تهیه نموده، سپس برای رسیدن به وزن خشک اولیه به مدت ۲۴ ساعت در  $105^\circ C$  قرار گرفتند. وزن خشک اولیه نمونه‌ها را تعیین کرده و بعد هر قطعه از آن‌ها را در داخل ظرف درب دار حاوی ۵۰ ml آب مقطر غوطه‌ور شده و در حالی که به صورت مقطعی در دمای  $25^\circ C$  همزده می‌شد، به مدت ۲۴ ساعت در  $105^\circ C$  قرار داده تا به وزن ثابت برسد با توزین مجدد نمونه‌ها وزن خشک نهایی به دست می‌آید درصد کل ماده حل

(۳۰ درصد وزنی/حجمی) به ۱۶ گرم کیتوسان معلق در ایزوپروپیل الکل اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تحت هم‌زدن باقی ماند. به این مخلوط ۳۴ گرم مونوکلرواستیک اسید اضافه شد و محتوای فلاسک به مدت ۳ ساعت در معرض هم‌زدن پیوسته قرار گرفت. در انتها، قلیایی اضافی با استفاده از استیک اسید خنثی شده و با اضافه کردن استون، کیتوسان رسوب داده است. سرانجام، کیتوسان اصلاح شده فیلتر شده و پنج مرتبه با ایزوپروپیل الکل/آب (۳۰:۷۰) شسته شده و در  $60^\circ C$  خشک شده است. محصول نهایی محلول در آب بود [۱۶].

#### ۲-۳-۲- تهیه نانویوکامپوزیت

ابتدا به‌طور جداگانه سوسپانسیون‌های اولیه ۱ درصد نانورس مونت‌موریلونیت و ۱ درصد  $TiO_2$  در آب به روش وزنی / حجمی تهیه شدند. سپس سوسپانسیون‌ها توسط همزن مغناطیسی با سرعت ۸۰۰ rpm به مدت ۶ ساعت همزده شدند و ۶۰ دقیقه داخل حمام آبی دستگاه اولتراسوند قرار گرفتند. ۳ گرم کربوکسی متیل کیتوسان به ۲۵۰ ml آب مقطر افزوده شده و به مدت ۱۰ دقیقه همزده شده است تا کربوکسی متیل کیتوسان بطور کامل در آب حل شود. سپس مقدار مناسبی از سوسپانسیون مادر نانورس (درصد‌های مختلف ۳ و ۵ درصد وزنی / وزنی کربوکسی متیل کیتوسان) و سوسپانسیون مادر  $TiO_2$  (۵/۰، ۱ و ۲ درصد وزنی / وزنی کربوکسی متیل کیتوسان) و آب مقطر به‌صورت قطره قطره و همراه با هم‌زدن اضافه گردید. از پمپ خلأ جهت خروج حباب‌های هوا استفاده شد. ۲ ml گلیسرول (۵۰ درصد وزن کربوکسی متیل کیتوسان) به‌عنوان نرم‌کننده به ژل اضافه و به مدت ۶۰ ثانیه با سرعت ۵۰۰ rpm توسط همزن مغناطیسی همزده شد. مقدار مناسبی گرم از ژل داخل پتری‌دیش پلی استایرنی با قطر ۱۰ cm ریخته شد. پتری‌دیش‌ها به مدت ۱۵ ساعت در  $45^\circ C$  قرار گرفتند و سپس فیلم خشک شده به آرامی از سطح آن‌ها جدا گردید.

#### ۲-۴-۲- روش‌های تعیین مشخصات فیلم‌های

##### نانویوکامپوزیتی تهیه شده

#### ۲-۴-۱- آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی سطح شکست نمونه‌های فیلمی تهیه شده ابتدا نمونه‌ها در نیتروژن مایع ترد شده و دچار شکست می‌شوند. سپس با استفاده از بخارات طلا، سطح نمونه‌های

طبق رابطه زیر به دست آمد. به دلیل وجود سولفات پتاسیم در داخل ویال، فشار بخار داخل ویال صفر در نظر گرفته می‌شود. فشار بخار خارج فیلم نیز از حاصل ضرب رطوبت نسبی (R.H.) داخل دسیکاتور (۰.۹۷) و فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ بدست آمد. از حاصل ضرب WVTR و ضخامت فیلم نیز میزان نفوذپذیری فیلم به بخار آب به دست آمد. این آزمون در مورد هر کدام از نمونه‌ها سه بار تکرار شد [۱۷].

$$WVP = \frac{WVRT \times X}{P(R_2 - R_1)}$$

X: ضخامت فیلم (m). P: فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ (۳۱۶۹ پاسکال). R<sub>2</sub>: رطوبت نسبی در دسیکاتور (۰.۹۷). R<sub>1</sub>: رطوبت نسبی در داخل ویال (۰).

#### ۲-۴-۷- بررسی فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های فیلم

برای تعیین فعالیت ضد میکروبی بیونانوکامپوزیت‌ها از روش شمارش میکروبی (روش کشت سطحی) استفاده شد. برای این منظور آزمایشات بر روی دو میکرواورگانیزم *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب به عنوان نماینده باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت انجام گرفته است. ابتدا میکرواورگانیزم‌های تهیه شده، در محیط کشت تریپتیک سوی برات<sup>۱</sup> استریل و خنک (۳۰ گرم در یک لیتر آب مقطر) کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شد تا به میکرواورگانیزم‌ها به تعداد اولیه مطلوب برسند (تعداد اولیه باکتری *اشرشیاکلی* برابر  $10^9 \times 1/76$  و تعداد اولیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*  $10^8 \times 5/18$  بوده است). فیلم‌های تولید شده بصورت قطعاتی به مساحت  $4 \text{ cm}^2$  و با ضخامت یکسان  $120 \pm 5 \mu\text{m}$  بریده شده و با الکل ۷۰٪ هر دو سمت آن کاملاً تمیز شده و ۱۰ دقیقه در هوای آزاد قرار گرفتند تا الکل باقی مانده احتمالی تبخیر شود. از هر نمونه دو قطعه مربعی شکل تهیه شد. قطعات تهیه شده با کمک پنس استریل در داخل فالكون‌های ۱۵ ml استریل قرار گرفته و با کمک پیپت در یک فالكون ۱۰ سی‌سی از محیط کشت حاوی باکتری *اشرشیاکلی* و در فالكون دیگر ۱۰ سی‌سی از محیط کشت حاوی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* اضافه شد. فالكون‌های حاوی فیلم و میکرواورگانیزم‌ها به مدت ۲۴ ساعت

شده<sup>۱</sup> (%TSM) از معادله زیر به دست می‌آید.

$$\%TSM =$$

$100 \times \text{وزن خشک اولیه} / (\text{وزن خشک نهایی} - \text{وزن خشک اولیه})$

#### ۲-۴-۵- میزان کدورت نمونه‌های فیلمی

برای سنجش میزان کدورت نیز از دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده گردید و میزان کدورت از طریق رابطه زیر محاسبه گردید.

کدورت فیلم =

ضخامت فیلم / میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر

#### ۲-۴-۶- آنالیز اندازه‌گیری میزان نفوذپذیری

##### نمونه‌های فیلمی نسبت به بخار آب

برای اندازه‌گیری میزان نفوذپذیری بخار آب از روش ASTM E96 استفاده شده است. برای این کار از ویال‌هایی به قطر ۱/۵ سانتی مترو ارتفاع ۴/۵ سانتی متر استفاده شد. ۳ گرم سولفات کلسیم در داخل ویال‌ها ریخته شده و قطعه‌ای از فیلم مورد آزمون بریده شده و روی دهانه ویال قرار داده می‌شود. ویال‌ها با تمام محتویاتش توزین شده و درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع سولفات پتاسیم قرار گرفته شده‌اند. جهت اطمینان از حفظ حالت اشباع، اجازه داده می‌شود که مقداری رسوب سولفات پتاسیم در کف دسیکاتور ایجاد شود. سولفات پتاسیم اشباع در دمای ۲۵ °C، رطوبت نسبی ۹۷ درصد ایجاد می‌کند. دسیکاتور درون انکوباتور قرار گرفته و به مدت ۷ روز، هر چند ساعت یک بار، وزن ویال‌ها اندازه‌گیری شد. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم‌ها، از روی افزایش وزن ویال‌ها تعیین می‌شود. منحنی افزایش وزن ویال‌ها با گذشت زمان رسم شده و پس از انجام رگرسیون خطی، شیب خط محاسبه گردید. از تقسیم شیب خط مربوط به هر ویال به سطح فیلم که در معرض انتقال بخار آب قرار داشته است، آهنگ انتقال بخار آب مطابق رابطه زیر به دست آمد.

$$j = WVTR = \frac{\Delta W}{tA}$$

j: شار بخار آب در عرض فیلم که آهنگ انتقال بخار آب (WVTR) نیز نامیده می‌شود.  $\Delta W$ : میزان بخار آب عبور کرده از فیلم (شیب منحنی). t: مدت زمان انتقال بخار آب. A: مساحت سطح فیلم

از تقسیم WVTR به اختلاف فشار بخار در دو طرف فیلم، میزان نفوذپذیری نمونه‌های فیلمی نسبت به بخار آب (WVP)

در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد.

برای شمارش تعداد کلنی‌های تشکیل شده در واحد میلی لیتر (cfu/ml) رقت‌هایی تا  $10^6$  یا  $10^7$  رقت با کمک سرم فیزیولوژی (۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) تهیه شد. روش تهیه این رقت‌ها به این صورت است که در  $10^6$  لوله آزمایش ۹ سی سی سرم فیزیولوژی استریل ریخته شد و با کمک نمونه گیر  $1000$  میکرولیتر از محلول داخل هر فالكون حاوی فیلم و میکرواورگانیزم بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، ۱ سی سی برداشته و به لوله اول اضافه شد. این عمل از لوله اول تا لوله ششم تکرار شد و در هر بار برای اختلاط کامل، لوله‌ها با هم‌زن به طور کامل یکنواخت شدند. برای اطمینان از رقت تهیه شده و کاهش خطای آزمایش، از دو رقت نهایی به صورت پخش روی سطح محیط کشت اختصاصی کشت داده شد، به این صورت که برای باکتری اشرشیاکلی محیط کشت واپولت ردبایل دکستروز آگار ( $39/5$  گرم در یک لیتر آب مقطر) و برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس محیط مانیتول سالت آگار ( $111$  گرم در یک لیتر آب) برای هر نمونه ۴ پلیت (دو پلیت برای لوله پنجم و دو پلیت برای لوله ششم) تهیه شد. سپس با کمک نمونه‌گیر  $100$  میکرو لیتر،  $0/1$  سی سی از محلول میکروبی حاوی فیلم برداشته و روی محیط مربوط ریخته و با سیم پخش‌کن به‌طور یکنواخت روی محیط، کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرمخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت تعداد کلنی‌های تشکیل شده شمارش و در رقت مربوطه ضرب شد. برای مثال تعداد شمارش شده از لوله پنجم در  $10^0$  و سپس در  $10^1$  (مربوط به مقدار  $0/1$  سی سی پخش شده روی محیط کشت) و در کل به  $10^6$  ضرب شده و تعداد واقعی ثبت شد. در این تحقیق آزمایش‌های میکروبی در دو تکرار (دو رقت ۵ و دو رقت ۶) انجام گرفته است. در نهایت از تعداد مربوط به دو رقت متوالی (۵ و ۶) میانگین تهیه شده و برای آنالیزهای آماری مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸].

## ۲-۴-۸- تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ گروه شامل سطوح صفر،  $0/5$ ، ۱ و ۲ درصد وزنی دی اکسید تیتانیوم و با ۳ تکرار انجام گردید. تحلیل و ارزیابی آنالیز واریانس یک طرفه

(ANOVA) با استفاده از مدل خطی نرم افزاری SPSS در سطح احتمال ۵ درصد ( $p < 0/05$ ) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

برای بررسی مورفولوژی سطح شکست تازه نمونه‌های فیلم نانوبیوکامپوزیتی سنتز شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده گردید و تصاویر ریزساختار نمونه‌های نانوبیوکامپوزیتی تحت آنالیز در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۱ (a) به طور آشکار نشان دهنده مورفولوژی سطح شکست بسیار صاف و همگن در سطح شکست کربوکسی متیل کیتوسان خالص می‌باشد که نشان از ساختار کریستالی بسیار منظم ماتریس بیوپلیمری آن است. شکل ۱ (b) مربوط به سطح شکست فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی کربوکسی متیل کیتوسان-مونت‌موریلونیت حاوی دی اکسید تیتانیوم به مقدار ۱ درصد وزنی می‌باشد. سطح مورفولوژی فیلم نانوبیوکامپوزیتی نسبت به کربوکسی متیل کیتوسان خالص زبرتر و ناهمگن‌تر است و این می‌تواند ناشی از اثر توده‌ای شدن برخی از نانوذرات در تهیه نانوبیوکامپوزیت تهیه شده باشد. به‌طوری‌که محققانی مانند Emamifar و همکاران، Seo و همکاران و Zapata و همکاران [۱۹،۲۰،۲۱] به این نتیجه رسیدند که افزودن نانوذرات از یک مقادیر خاص به بعد موجب پخش نشدن مناسب آن‌ها و حتی موجب کاهش خاصیت ضد میکروبی فیلم نیز خواهد شد که این می‌تواند ناشی از آگلومریزاسیون و در واقع کاهش به نسبت حجم کلی نانوذرات باشد. در پژوهشی مشابه Li و همکاران [۲۲] با استفاده از همزن اولتراسونیک از میزان توده‌ای شدن نانوذرات کاستند و با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان دادند که با کاهش توده‌ای شدن، مورفولوژی سطح شکست نیز همگن‌تر شد.



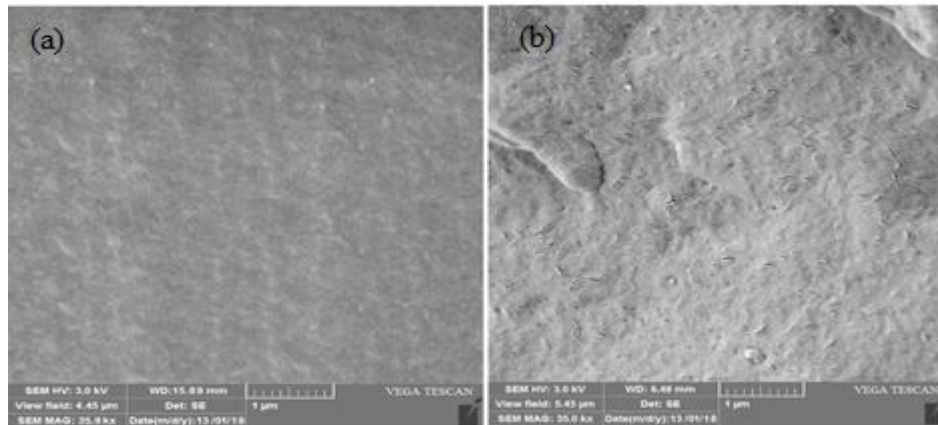


Fig 1 SEM image of nanobiocomposite film (a) without  $\text{TiO}_2$  and (b) in the presence of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles

### ۲-۳- پراش پرتو ایکس

مطالعه نتایج پراش پرتو X امکان شناخت نوع ساختارهای ورقه‌ای و بین لایه‌ای ذرات نانورس، نحوه توزیع صفحات و میزان توده‌ای شدن نانوذرات  $\text{TiO}_2$ ، اندازه بلورها و آنالیز چگونگی شرکت آن‌ها در ساختار ماتریس نانوکامپوزیت‌های پلیمری را فراهم می‌کند. دو حالت متفاوت از اختلاط نانورس و پلیمر در فیلم نانوکامپوزیتی وجود دارد: ۱- توزیع به صورت بین لایه‌ای (Intercalation)، که در این حالت زنجیرهای پلیمر به فضای بین لایه‌های نانورس نفوذ می‌کنند، اما لایه‌های نانورس آرایش طبیعی خود را حفظ کرده و فقط فاصله این صفحات از هم افزایش می‌یابد. ۲- توزیع به صورت ورقه‌ای (Exfoliation)، که در این حالت لایه‌های نانورس کاملاً از هم جدا شده و در جهات مختلف در ماتریس پلیمری پراکنده می‌شوند.

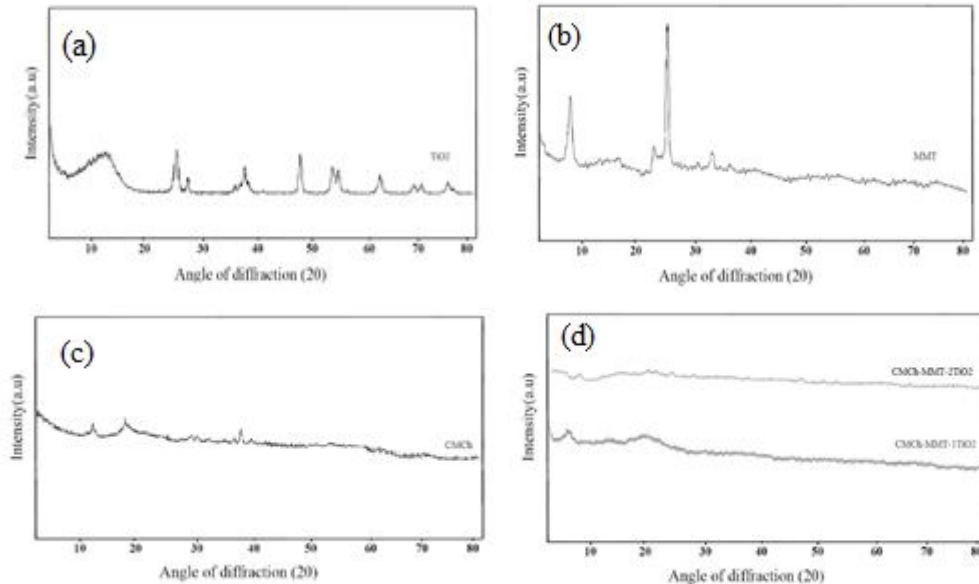
مطالعات نشان داده است که خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کاربردی نانوکامپوزیت‌ها، بستگی زیادی به نحوه توزیع نانورس در ماتریس پلیمر دارد. ساختار ورقه‌ای بهترین نوع اختلاط محسوب می‌شود، زیرا در این حالت، همگنی و یکنواختی سیستم بالا بوده و احتمال توده‌ای شدن نانولایه‌ها کاهش می‌یابد. همچنین، به دلیل افزایش احتمال ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین صفحات نانورس و زنجیرهای بیوپلیمر ویژگی مکانیکی فیلم‌ها تقویت می‌گردد. در ساختار ورقه‌ای تعداد لایه‌هایی که به‌عنوان مانع در مقابل نفوذ مولکول‌های گازی و بخار آب عمل می‌نمایند، افزایش یافته و به این ترتیب خصوصیت بازدارندگی فیلم‌ها نیز بهبود می‌یابد. منحنی پراش پرتو X پودر  $\text{TiO}_2$ ، MMT، فیلم کربوکسی متیل سلولز و فیلم‌های زیست نانوکامپوزیت دارای نانورس و سطوح مختلف

$\text{TiO}_2$  در شکل ۲ آورده شده است.

الگوی پراش پرتو ایکس فیلم‌های نانوکامپوزیتی کربوکسی متیل سلولز-مونت موریلونیت حاوی  $\text{TiO}_2$  فاقد هرگونه پیک مشخص مربوط به  $\text{TiO}_2$ ، MMT، CMCh است. نانوذرات  $\text{TiO}_2$  نیز بدون ایجاد توده در ماتریس زیست‌کامپوزیت پخش شدند بنابراین، به نظر می‌رسد که صفحات نانورس به‌طور کامل و با ایجاد ساختار ورقه‌ای در ماتریس پلیمری توزیع و زنجیرهای کربوکسی متیل سلولز و لایه‌های نانورس به خوبی در هم پخش شده‌اند. افزودن نانوذره  $\text{TiO}_2$  به فیلم CMCh-MMT موجب ظهور پیک در ناحیه  $2\theta = 8-14^\circ$  شده است. فیلم سه جزئی حاوی ۱ درصد  $\text{TiO}_2$  دارای پیک پراش در زاویه  $2\theta = 9.5^\circ$  بود. با افزایش سطح نانوذرات  $\text{TiO}_2$  به ۲ درصد، زاویه پراش پرتو ایکس تغییر نموده و افزایش می‌یابد. در این حالت، نفوذ زنجیرهای CMCh به داخل فضای نانورس به‌طور کامل صورت نگرفته است، بنابراین، می‌توان احتمال داد که غلظت زیاد نانورس و حضور نانوذرات  $\text{TiO}_2$  موجب تغییر مورفولوژی پخش MMT از ورقه‌ای کامل در فیلم CMCh-MMT به ورقه‌ای بین لایه‌ای در فیلم‌های سه‌جزئی  $\text{CMCh-MMT-TiO}_2$  شده است. بروز این پدیده به فروریزش صفحات نانورس روی هم و انبوه شدن جزئی آنها در حضور  $\text{TiO}_2$  نسبت داده می‌شود. دلیل این امر، تأثیر نیروی تراکمی توده‌های نانوذرات  $\text{TiO}_2$  بر لایه‌های نانورس می‌باشد. دلیل قابل ذکر دیگر، وجود برهم‌کنش‌های احتمالی بین نانورس MMT و نانوذرات  $\text{TiO}_2$  می‌باشد که در نهایت موجب توده و انبوه شدن صفحات MMT شده است. نتایج مشابهی توسط Yin و همکاران [۲۳] در خصوص تولید نانوکامپوزیت PET حاوی

ماتریس نانوپلیمری پخش شده‌اند، با افزایش غلظت  $TiO_2$ ، تمایل نانوذرات به تجمع و توده‌ای شدن افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی توسط اولیایی و همکاران [۲۵]، Maji و Deka [۲۶] گزارش شده است.

مخلوط MMT و  $SiO_2-TiO_2$  مشاهده گردید. Qu و همکاران [۲۴] نیز گزارش مشابهی درباره استفاده همزمان نانورس و کربن سیاه در پلیمر لاستیک طبیعی ارائه نموده‌اند. مطابق شکل ۲ (a)، نانوذرات فلزی  $TiO_2$  به خوبی در



**Fig 2** X-ray diffraction pattern for (a) pure  $TiO_2$  nanoparticles, (b) montmorillonite nanoclay, (c) pure carboxymethyl chitosan and (d) nanobiocomposite with different percentages of  $TiO_2$  nanoparticles

( $p < 0.05$ ). در ضمن با افزایش درصد نانوذرات اکسید تیتانیم استحکام کششی بیشتر می‌شود. این امر احتمالاً به علت ایجاد پیوندهای هیدروژنی قوی بین زنجیرهای کربوکسی متیل کیتوسان و نانوذرات اکسیدتیتانیم و هم چنین پر کردن فضاهای خالی بین زنجیرها، نیروی لازم برای کشیدن افزایش یافته و در نتیجه میزان کرنش فیلم کاهش می‌یابد.

شکل ۴ نشان می‌دهد که درصد کرنش تا نقطه شکست<sup>۲</sup> فیلم‌های حاوی نانوذرات اکسیدتیتانیم بیشتر از فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص می‌باشد. در کل نتایج آنالیز مکانیکی حاکی از آن است که فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی حاوی نانوذرات نسبت به فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص خواص مکانیکی بهتری را در کاربردهای بسته‌بندی از خود نشان می‌دهند [۲۷]. استحکام فیزیکی فیلم می‌تواند در تعیین فیلم ضد میکروبی مناسب برای بسته‌بندی مواد غذایی با اشکال متفاوت و لبه‌های تیز یا شرایط حمل و نقل دشوار کمک کند [۲۸]. نتایج این تحقیق با مطالعات پیغمبردوست و همکاران [۲۹]، پورنصیر و همکاران [۳۰] هم‌خوانی دارد.

### ۳-۳- استحکام مکانیکی نمونه‌های فیلم

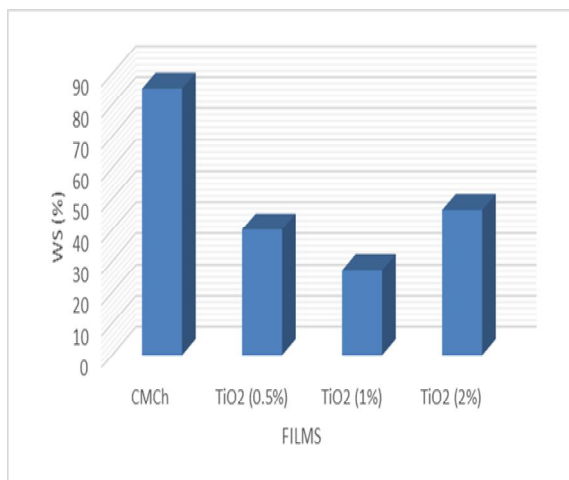
آنالیز تعیین میزان استحکام کشش نهایی<sup>۱</sup> و ازدیاد طول فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی حاوی نانوذره اکسیدتیتانیم در چهار سطح (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد وزنی) در دمای محیط اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. بسته به میزان برهم‌کنش‌های بین سطحی میان نانوذرات پرکننده و ماتریس، نحوه پخش نانوذرات در داخل ماتریس و در نتیجه میزان پر شدن فضاهای خالی، مقادیر متفاوتی از میزان استحکام کششی در فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی قابل مشاهده است. مقاومت مکانیکی فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص تا تنش حدود ۳/۶ مگاپاسکال می‌باشد، بنابراین میزان استحکام کششی فیلم‌های تهیه شده برای بسته‌بندی مواد غذایی باید بیشتر از ۳/۶ مگاپاسکال باشد که نتایج به دست آمده در این تحقیق بیشتر از مقدار ذکر شده است. همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد، استحکام کششی فیلم حاوی نانوذرات اکسیدتیتانیم بیشتر از استحکام کششی فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص می‌باشد که از نظر آماری معنی‌دار است

2. Strain at break (SB)

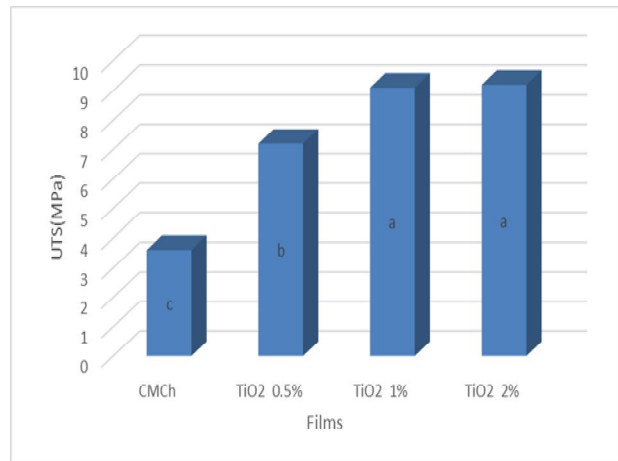
1. Ultimate tensile strength (UTS)



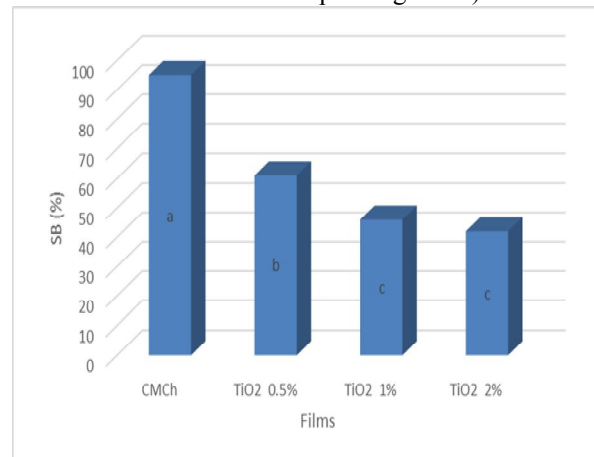
شود. در این مطالعه برای این منظور به ترکیب فیلم کربوکسی متیل کیتوسان، گلیسرول و نانورس مونت موریلینیت اضافه شده است. نتایج حاصل از آنالیز میزان انحلال پذیری نمونه‌های فیلمی در شکل ۵ نشان داده شده است. مطابق نتایج این شکل مشخص است که درصد کل حلالیت در آب فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص حدود ۸۵/۳ درصد می‌باشد. میزان انحلال پذیری در فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی حاوی ۰/۵ و ۱ و ۲ درصد نانواکسید تیتانیم به ترتیب، به ۴۰/۲، ۲۷/۳ و ۴۶/۵ درصد کاهش یافته است. این نتیجه با مشاهدات Wang و همکاران [۳۲]، Li و همکاران [۳۱] و مطالعه Rhim و همکاران [۳۲] مطابقت داشت. نتایج به دست آمده نشان دادند که با افزودن نانو اکسید تیتانیم در غلظت‌های کم (۰/۵ و ۱ درصد) میزان حلالیت در آب کاهش می‌یابد و اما با افزایش غلظت نانوذرات در ماتریکس پلیمری میزان حلالیت دوباره افزایش یافت، اما همواره از فیلم شاهد کم‌تر بود. این یافته‌ها را می‌توان به پیوندهای احتمالی به وجود آمده بین نانو اکسید تیتانیم و کربوکسی متیل کیتوسان در ساختار فیلم‌ها نسبت داد. مطالعات نشان داده اند که افزودن نانو اکسید تیتانیم موجب پیوند هیدروژنی بین نانو اکسید تیتانیم و ماتریکس پلیمرها می‌شود و به این ترتیب اتصالات مولکول‌های آزاد آب با گروه‌های آب دوست بیوپلیمرها در مقایسه با نمونه شاهد کم‌تر شده و متعاقباً حلالیت فیلم کاهش می‌یابد [۱۷، ۳۳، ۳۴]. در غلظت‌های بالاتر نانوذره احتمالاً به دلیل عدم پراکنش یکنواخت و تجمع نانوذرات دسترسی آن‌ها به زنجیره پلیمر کم‌تر و قابلیت بهبود خواص کاهش می‌یابد.



**Fig 5** Water solubility for the nanobiocomposite films containing  $\text{TiO}_2$  nanoparticles at levels 0.5 to 2 wt %



**Fig 3** The effect of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles at levels 0.5 to 2 wt % on the ultimate tensile strength (different letters indicate a significantly ( $p < 0.05$ ) different by Duncan's multiple range tests)



**Fig 4** The effect of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles at levels 0.5 to 2 wt % on the Strain at break (different letters indicate a significantly ( $p < 0.05$ ) different by Duncan's multiple range tests)

### ۳-۴- اندازه‌گیری میزان انحلال‌پذیری

#### نمونه‌های فیلم در آب

انحلال‌پذیری در آب یکی از مشخصه‌های کیفی مهم درباره مواد بسته‌بندی استفاده شده برای محصولات غذایی به شمار می‌آید. پلیمرهای زیستی مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی باید کم‌ترین حساسیت را نسبت به رطوبت داشته باشند. در غیر این صورت، در طول زمان کارایی فیزیکی خود را از دست داده و نمی‌توانند از بروز انواع فسادهای میکروبی و شیمیایی در ماده غذایی درون خود جلوگیری کنند. حساسیت نسبت به رطوبت و انحلال‌پذیری بیش‌تر فیلم کربوکسی متیل کیتوسان نسبت به پلیمرهای سنتزی، یکی از معایب اصلی آن به شمار می‌رود. به همین دلیل، باید این عیب تا حد قابل قبولی رفع

#### 1. Water solubility

### ۳-۵- کدورت

کدورت فیلم‌ها جهت بیان میزان شفافیت فیلم‌ها ارزیابی می‌شود، هرچه میزان کدورت فیلم‌ها بیش تر باشد، نشان از کاهش شفافیت فیلم‌های تولید شده می‌باشد. شفافیت از ویژگی‌های مهم فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر می‌باشد زیرا به طور مستقیم بر ظاهر محصول پوشش‌دهی شده تاثیر می‌گذارد. هم‌چنین می‌تواند بر سرعت اکسیداسیون چربی‌ها و کیفیت محصول تاثیرگذار باشد. افزودن نانوذرات اکسیدتیتانیم باعث افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) کدورت در نانوکامپوزیت‌ها شد. به طوری که میزان کدورت از  $2.056\%$  در فیلم شاهد به  $5.087\%$  در نانوکامپوزیت حاوی  $1\%$  نانوذرات اکسیدتیتانیم رسید. علت این پدیده را می‌توان به تجمع نانوذرات درون بستر پلیمری نسبت داد [35]. مشاهدات حاصل با نتایج به دست آمده توسط Pereda و همکاران [36] هم‌خوانی داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن نانو سلولز موجب افزایش کدورت فیلم‌ها گردید.

### ۳-۶- آنالیز میزان نفوذپذیری نمونه‌های فیلم

#### نسبت به بخار آب<sup>۱</sup>

تبادل رطوبت بین ماده غذایی و محیط اطراف می‌تواند سبب از دست رفتن کیفیت مواد غذایی، طراوت و تازگی مواد غذایی و بالا رفتن فعالیت آبی در آن‌ها شود که باعث گسترش فسادهای میکروبی و شیمیایی و آنزیمی می‌شود. بنابراین، بایستی مواد بسته‌بندی تا حد امکان، حداقل نفوذپذیری نسبت به بخار آب را داشته باشند تا از تبادل رطوبت بین محیط و ماده غذایی ممانعت شود. نفوذپذیری نسبت به بخار آب برای فیلم‌های کربوکسی متیل‌کیتوسان خالص و فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی کربوکسی متیل‌کیتوسان حاوی نانوذرات اکسیدتیتانیم در رطوبت نسبی  $97\%$  و بعد از گذشت یک هفته اندازه‌گیری شد. میزان WVP برای فیلم کربوکسی متیل‌کیتوسان خالص  $0.871 \times 10^{-8}$  g/m.h.Pa می‌باشد که با افزایش درصد نانوذرات فلزی درون ماتریس به تدریج کاهش یافته است. در شکل ۶ میزان نفوذپذیری فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی حاوی نانوذرات اکسیدروی تا  $2\%$  درصد وزنی مشاهده می‌شود. همان‌طور که از شکل ۶ مشخص است، مقدار WVP نانوبیوکامپوزیت کربوکسی متیل‌کیتوسان -مونت

موریلونیت-اکسیدتیتانیم کم‌تر از فیلم کربوکسی متیل‌کیتوسان خالص بوده و با افزایش درصد این نانوذرات، WVP کاهش یافته است. کاهش WVP در اثر افزودن نانوذرات اکسید تیتانیم را می‌توان به چند مکانیسم نسبت داد. در درجه اول افزایش نانوذرات اکسیدتیتانیم، یک مسیر پر پیچ و خم برای عبور مولکول‌های آب ایجاد می‌کند. در مقادیر یک درصد وزنی نانوذرات اکسیدتیتانیم پخش شده در شبکه بیوپلیمر، چندین مسیر پر پیچ و خم برای مولکول‌های آب ایجاد می‌شود که این مسیرها با افزایش میزان نانوذرات اکسیدتیتانیم به  $1\%$  و  $2\%$  درصد، بیش‌تر شده و بدین ترتیب مقدار WVP رفته رفته کم‌تر می‌شود. این نتیجه با نتایج Marvzadeh و همکاران [37] مطابقت داشت. نفوذپذیری به بخار آب در تیمار حاوی  $2\%$  درصد نانوذرات اکسید روی مجدداً افزایش نشان داد. عدم پخش همگن، تجمع و برهم خوردن ریز ساختار فیلم در اثر حضور غلظت بالای نانوذرات و متعاقب آن ایجاد شکستگی و بافت ناهمگن و ناپیوسته، مسیرهایی را برای عبور بخار آب ایجاد کرده و می‌تواند دلیل این مسأله باشد [35].

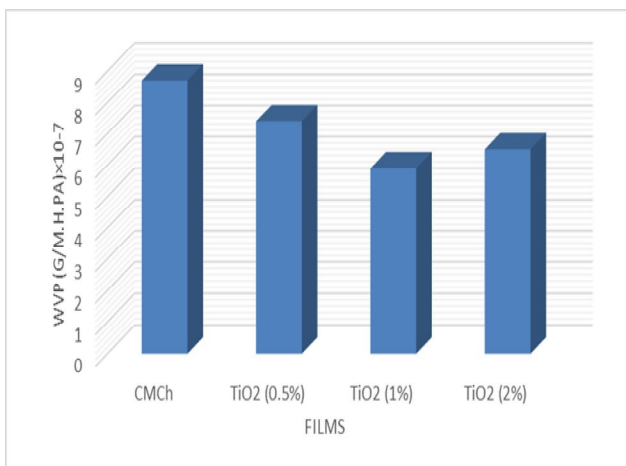


Fig 6 Water vapor permeability rate of nanobiocomposite films containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles up to 2 wt%

### ۳-۷- آنالیز خواص ضد میکروبی

#### نانوبیوکامپوزیت

جدول ۱ نتایج شمارش میانگین کلونی‌های رشد کرده انواع فیلم‌های نانوبیوکامپوزیتی با درصدهای مختلفی از نانوذرات اکسیدتیتانیم ( $0.5\%$ ،  $1\%$  و  $2\%$  درصد) را در برابر دو نوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری اشرشیاکلی که به ترتیب گرم مثبت و گرم منفی هستند، نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که تعداد کلونی‌های رشد کرده باکتری اشرشیاکلی در فیلم

1. Water vapor permeability (WVP)

برنج تقویت شده با نانوذرات اکسید تیتانیم بر روی باکتری *اشرشیاکلی* انجام شده است نتایج نشان داد که حضور نانوذرات اکسید تیتانیم باعث کاهش قابل توجهی در رشد میکروارگانیزم در مقایسه با فیلم کنترل بود. این ممکن است به دلیل تماس *اشرشیاکلی* با نانوذرات اکسید تیتانیم باشد که فعالیت فوتوکاتالیستی از خود نشان می دهند. در ضمن رادیکال های هیدروکسیل و گونه های اکسیژن فعال تولید شده در سطح مشخص اکسید تیتانیم ممکن است با غیرفعال سازی میکروارگانیزم ها با اکسید کردن جز فسفولیپید اشباع نشده غشای سلولی میکروب ها، نقشی داشته باشند [۳۸]. در تحقیقی دیگر اثر ضد باکتریایی فیلم نانو کامپوزیتی زیست تخریب پذیر نشاسته/ پلی وینیل الکل- دی اکسید تیتانیم مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل حاکی از آن بود که افزودن نانوذرات اکسید تیتانیم در حضور تابش UV به میزان قابل توجهی موجب فعالیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیتی در برابر باکتری *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می گردد. بر اساس نتایج بدست آمده حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقابل حضور نانوذرات اکسید تیتانیم در فیلم بیشتر از باکتری *اشرشیاکلی* می باشد چنانکه فعالیت ضد باکتریایی نانو کامپوزیت تهیه شده موجب کاهش تعداد باکتری *اشرشیاکلی* تا حدود ۶۴٪ شده است در حالی که در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* میزان کاهش باکتری به ۸۰٪ هم رسیده است [۳۹]. همچنین یافته های Li و همکاران [۴۰] نشان می دهد که خاصیت ضدباکتریایی اکسید تیتانیم در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از *اشرشیاکلی* است بطور کلی نتایج این تحقیقات و مطالعات سایر محققین [۴۱ و ۴۲] با مطالعه حاضر هم خوانی دارند.

کربوکسی متیل کیتوسان خالص پس از ۲۴ ساعت به تعداد  $5/1 \times 10^9$  cfu/ml و تعداد کلونی های رشد کرده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در فیلم کربوکسی متیل کیتوسان خالص به تعداد  $7/4 \times 10^8$  cfu/ml افزایش یافته است (تعداد اولیه باکتری *اشرشیاکلی* برابر  $1/4 \times 10^9$  cfu/ml و تعداد اولیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*  $4/6 \times 10^8$  cfu/ml بوده است). همان طور که از جدول ۱ مشخص است، در مورد هر دو باکتری با افزایش درصد وزنی نانوذرات اکسید تیتانیم در داخل ماتریس بیوپلیمری کربوکسی متیل کیتوسان، خاصیت ضد میکروبی فیلم های نانو بیوکامپوزیتی بطور معنی داری ( $p < 0/05$ ) افزایش می یابد. با توجه به نتایج آنالیز میکروبی در مورد فیلم های نانو بیوکامپوزیتی تهیه شده تاثیر نانوذرات اکسید تیتانیم بر کاهش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از تاثیر آن بر کاهش باکتری *اشرشیاکلی* می باشد، به عبارتی دیگر نانوذرات اکسید تیتانیم در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری از خود نشان می دهند. این موضوع به دلیل تفاوت در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی و یا تفاوت در حساسیت این غشا به نسبت پراکسید هیدروژن تولید شده از سطح نانوذرات اکسید تیتانیم است. در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت (مثل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*) لایه پپتیدوگلیکان ضخیم تر بوده، همین موضوع موجب افزایش مقاومت باکتری ها در برابر نانوذرات می شود. هم چنین وجود لیپوپلی ساکراید در غشاء خارجی باکتری های گرم منفی (مثل باکتری *اشرشیاکلی*) موجب اتصال نانوذرات به غشاء سلولی می شود، در حالی که این لایه در باکتری های گرم مثبت وجود ندارد و از عوامل دیگر مقاومت این باکتری ها می باشد [۱۷، ۳۳]. در پژوهشی اثر ضد میکروبی فیلم نشاسته

**Table 1** Antimicrobial results of nanocomposite films prepared with TiO<sub>2</sub> nanoparticles

| Sample | TiO <sub>2</sub> (%) | Mean Colonies of <i>Staphylococcus aureus</i> ( $\times 10^8$ ) | Mean Colonies of <i>Escherichia coli</i> ( $\times 10^9$ ) |
|--------|----------------------|---|--|
| 1      | 0.0                  | 7.4±0.02 <sup>a</sup>   | 5.1±0.01 <sup>a</sup>                                      |
| 2      | 0.5                  | 2.8±0.01 <sup>b</sup>   | 3.4±0.01 <sup>b</sup>                                      |
| 3      | 1.0                  | 1.4±0.01 <sup>c</sup>   | 2.2±0.01 <sup>c</sup>                                      |
| 4      | 2.0                  | 0.1±0.01 <sup>d</sup>   | 1.1±0.01 <sup>d</sup>                                      |

The different letters in each column indicate a significantly ( $p < 0.05$ ) different by Duncan's multiple range tests

آن ها بر روی خواص مکانیکی، بازدارندگی نسبت به بخار آب و سطحی و فعالیت ضد میکروبی فیلم های نانو کامپوزیتی مطالعه شد. نتایج نشان داد که استفاده هم زمان از دو نانوماده، ویژگی های مکانیکی، بازدارندگی و ضد میکروبی را بهبود داده

## ۴- نتیجه گیری کلی

در این پژوهش به منظور بهبود ویژگی های کاربردی فیلم های زیست تخریب پذیر کربوکسی متیل کیتوسان از نانورس مونت موریلونیت و نانوذرات فلزی اکسید تیتانیم استفاده و اثر

- [8] Muzzarelli, R.A.A. (1988). Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 8: 1-21.
- [9] Hong, S.I., Park, J.D. and Kim, D.M. (2000). Antimicrobial and physical properties of food packaging films incorporated with some natural compounds. *Food Science and Biotechnology*, 9 (1): 38-42.
- [10] Ghanbarzadeh, B., Oleyaei, S.A. and Almasi H. (2015). Nano-Structured Materials Utilized in Biopolymer based Plastics for Food Packaging Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 1699-1723.
- [11] Zolfi, M., Khodaiyan, F., M protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films, *International Journal of Biological Macromolecule*, 65: 340-345.
- [12] Zhou, J.J., Wang, S.Y. and Gunasekaran, S. (2009). Preparation and Characterization of Whey Protein Film Incorporated with TiO<sub>2</sub> ousavi, M. and Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey Nanoparticles. *Journal of Food Science*, 74 (7): 50-56.
- [13] Li, Y., Jiang, Y., Liu, F., Ren, F., Zhao, G. and Leng, X. (2011). Fabrication and characterization of TiO<sub>2</sub>/whey protein isolate nanocomposite film. *Food Hydrocolloids*, 25 (6): 1-7.
- [14] Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M., Hashemi, M. (2014). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films, *International Journal of Biological Macromolecule*, 65: 340-345.
- [15] Oleyaei, S.A., Ghanbarzadeh, B., Moayedi, A.A., Abbasi, F. (2017). The Effects of TiO<sub>2</sub> and Montmorillonite Nanofillers on Structural, Thermal and Optical Properties of Starch based Nanobiocomposite Films. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 12 (5): 678-695.
- [16] El-Shafei, A.M., Fouda, M.M.G., Knittel, D., Schollmeyer, E. (2008). Antibacterial activity of cationically modified cotton fabric with Carboxymethyl chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 110 (3):1289-1296.
- [17] Espitia, P.J.P., Soares, N.D.F.F., Teófilo, R.F., dos Reis Coimbra, J.S., Vitor, D.M., Batista, R.A., Medeiros, E.A.A. (2013). Physical-mechanical and antimicrobial

است. با افزایش اکسید تیتانیم کدورت افزایش، حلالیت و نفوذپذیری کاهش یافته است. با وجود این، نانورس آب‌دوستی سطح را افزایش داده است؛ اما اکسید تیتانیم افزایش آبگریزی استاتیک فیلم‌ها را موجب شده است. دلیل بهبود این ویژگی‌ها، سازگاری نانوذرات با کربوکسی متیل سلولز، توانایی پخش یکنواخت آنها در ماتریس بیوپلیمری و ایجاد برهم‌کنش‌های هیدروژنی و الکترواستاتیک بین نانوذرات با هم و با کربوکسی متیل سلولز می‌باشد. خصوصیات کاربردی فیلم مانند بازدارندگی، کشش‌پذیری و استحکام کششی به نحوه توزیع نانوذرات بستگی دارد. همچنین تأثیر نانوذره اکسیدتیتانیم بر کاهش مقدار باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیش از تأثیر نانوذره اکسید تیتانیم بر کاهش مقدار باکتری *اشرشیاکلی* است.

## ۵- منابع

- [1] Rhim, J.W. (2007). Potential use of biopolymer-based nanocomposite in food packaging applications. *Food science and Biotechnology*, 16 (5): 691-709.
- [2] Shan, G., Surampalli, R.Y., Tyagi, R.D. and Zhang, T.C., (2009). Nanomaterials for environmental burden reduction, waste treatment, and nonpoint source pollution control. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 3 (3): 249-264.
- [3] Vergnaud, J.M. (1998). Problems encountered for food safety with polymer packages: chemical exchange, recycling. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78: 267-297.
- [4] Wang, G.H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55 (11): 916-919.
- [5] Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., and Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, 67 (3): 1162-1169.
- [6] Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.J., (1999). Food application of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10 (2): 37-51.
- [7] Chen, L., Du, Y., Tian, Z., Sun, L. (2005). Effect of the degree of deacetylation and the substitution of carboxymethyl chitosan on its aggregation behavior. *Journal of Polymer Science Polymer Physics*, 43: 296-305.

- polymer nanocomposite. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 42 (12): 2117-2125.
- [27] Gholami, R., Ghanbarzadeh, B., Dehghannia, J. (2013). Potato Starch/Montmorillonite-Based Nanocomposites: Water Sensitivity, Mechanical and Thermal Properties and XRD Profile Study. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 26 (2): 91-100.
- [28] Rooney, M.L. (1995). *Active food packaging*. Australia: Blackie Academic & Professional.
- [29] Peyghambaroust, S.H., Dehghani, S., Peyghambaroust, S.J. (2015). Preparation and analysis of physical properties, Mechanical and antimicrobial Lightweight polyethylene nano-composite films containing silver nanoparticles, zinc oxide and copper oxide. *Iran Biosystem Engineering*, 46 (4): 347-354.
- [30] Poornasir, N., Peyghambaroust, S.J., Peyghambaroust, S.H. (2016). Study of physical, mechanical and antibacterial properties of nanobio-composite films based on starch containing silver metal oxide, oxide and copper oxide nanoparticles. *Quarterly Journal of Modern Food Technology*, 4 (14): 17-32.
- [31] Wang, X., Du, Y., Yang, J., Tang, Y., Luo, J. (2008). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of quaternized chitosan/organic montmorillonite nanocomposites. *Journal of biomedical materials research*, 84 (2): 384-390.
- [32] Rhim, J.W., Wang, L.F. (2014). Preparation and characterization of carrageenan-based nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles. *Applied Clay Science*, 97-98:174-181.
- [33] An, J., Luo, Q., Yuan, X., Wang, D., Li, X. (2011). Preparation and characterization of silver-chitosan nanocomposite particles with antimicrobial activity. *Journal of Applied Polymer Science*, 120 (6): 3180-3189.
- [34] Tunc, S., Duman, O. (2010). Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/ montmorillonite nanocomposite films. *Applied Clay Science*, 48 (3): 414-424.
- [35] Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., Behrooz, R. (2013). Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate properties of nanocomposite films with pediocin and ZnO nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 94 (1), 199-208.
- [18] Rhim, J.W., Wang, L.F., Hong, S.I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33 (16): 327-335.
- [19] Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., Soleimani-Zad, S. (2010). Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of freshorange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (4): 742-748.
- [20] Seo, J., Jeon, G., Sung Jang, E., Khan, S.B., Han, H. (2011). Preparation and properties of poly (propylene carbonate) and nanosized ZnO composite films for packaging applications. *Applied Polymer Science*, 122 (2): 1101-1108.
- [21] Zapata, P.A., Tamayo, L., Páez, M., Cerda, E., Azócar, I., Rabagliatil, F.B. (2011). Nanocomposites based on polyethylene and nanosilver particles produced by metallocenic “in situ” polymerization: synthesis, characterization, and antimicrobial behavior. *European Polymer Journal*, 47 (8): 1541-1549.
- [22] Li, L.H., Deng, J.C., Deng, H.R., Liu, Z.L., Li, X.L. (2010). Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal*, 160 (1): 378-382.
- [23] Yin, M., Li, C., Guan, G., Yuan, X., Zhang, D., Xiao, Y., (2009). In-Situ Synthesis of Poly (Ethylene Terephthalate) /Clay Nanocomposites Using TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> Sol-Intercalated Montmorillonite as Polycondensation Catalyst. *Polymer Engineering and science*, 49 (8):1562-1572.
- [24] Qu, L., Huang, G., Zhang, P., Nie, Y., Weng, G. (2009). Synergistic reinforcement of nanoclay and carbon black in natural rubber. *Polymer International*, 59: 1397-1402.
- [25] Oleyaei, S.A., Ghanbarzadeh, B., Moayedi, A.A., Poursani, P., Moosavi bayeghi. S.F., Bakhsh Amin. M.R. (2018). Evaluation of Applicable Properties of Nanocomposite Starch Films Contains montmorillonite and titanium dioxid. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 13 (4): 611-626.
- [26] Deka, B.K., Maji, T.K. (2011). Effect of TiO<sub>2</sub> and nanoclay on the properties of wood

- alcohol)/film reinforced with titanium dioxide nanoparticles. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 20:1001-1011.
- [40] Li, X., Xing, Y., Jiang, Y., Ding, Y., Li, W. (2009). Antimicrobial activities of ZnO powder-coated PVC film to inactivate food pathogens. *Food Science and Technology*, 44 (11): 2161-2168.
- [41] Othman, S. H., Abd Salam, N. R., Zainal, N., Kadir Basha, R., Talib R. A. (2014). Antimicrobial Activity of TiO<sub>2</sub> Nanoparticle-Coated Film for Potential Food Packaging Applications. *International Journal of Photoenergy*, Article ID 945930, 6 pages.
- [42] Pirsá, S., Farshchi, E., Roufegarinejad, L. (2020). Antioxidant/antimicrobial film based on Carboxymethyl Cellulose/Gelatin/TiO<sub>2</sub>-Ag nano-composite. *Journal of Polymers and the Environment*, 28:3154-3163.
- nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers. *Food Hydrocolloids*, 32 (2), 416-424.
- [36] Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., Marcovich, N. E. (2011). Structure and properties of nanocomposite films based on sodium caseinate and nanocellulose fibers. *Journal of Food Engineering*, 103 (1): 76-83.
- [37] Marvizadeh, M. M., Nafchi, A. M., Jokar, M. (2014). Improved physicochemical properties of Tapioca starch/bovine gelatin biodegradable films with zinc oxide nanorod. *Journal of Chemical Health Risks*, 4 (4): 25-31.
- [38] Malathi, A.N., Singh, A.K. (2019). Antimicrobial activity of rice starch based film reinforced with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles. *Agriculture Research Journal*, 56(1):111-117.
- [39] Hejri, Z., Seifkordi, A.A., Ahmadpour, A., Zebarjad, S.M., Maskooko, A.M. (2013). Biodegradable starch/poly (vinyl

## Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: [www.fsct.modares.ir](http://www.fsct.modares.ir)



Scientific Research

# Synthesis and Evaluation of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Bionanocomposites Based on Carboxymethylchitosan Biopolymer - Montmorillonite Nanoclay in the Presence of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles



Anvar, H. <sup>1</sup>, Sheikhloie Bonab, H. <sup>2\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Food Industry Science and Engineering, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Chemistry and Food Engineering, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.

| ARTICLE INFO   | ABSTRACT   |
|--|--|
| <p><b>Article History:</b></p> <p>Received 12 July 2019<br/>Accepted 15 December 2020</p> <hr/> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Active films,<br/>Carboxymethyl Chitosan,<br/>Montmorillonite,<br/>Titanium dioxide,<br/>Antimicrobial properties.</p> <hr/> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.03.24</p> <p>*Corresponding Author E-Mail:<br/>H_Sheikhloie@iau-Maragheh.ac.ir</p> | <p>In this research, an antimicrobial bionanocomposites based on carboxymethyl chitosan biopolymer-montmorillonite nanoclay was synthesized in the presence of titanium oxide nanoparticles. Investigation of surface morphology images with scanning electron microscopy (SEM) shows the rough and heterogeneous surface of nanocomposites in comparison with pure carboxymethyl chitosan. The results of the XRD test showed that the diffusion of nanoclay in the presence of TiO<sub>2</sub> nanoparticles changed from full sheets to between layers sheets. The addition of TiO<sub>2</sub> nanoparticles caused a significant increase (<math>p &lt; 0.05</math>) in turbidity in nanocomposites. The effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on reducing the amount of Gram-positive bacteria of <i>Staphylococcus aureus</i> is more than the effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on reducing the amount of gram-negative bacteria of <i>Escherichia coli</i>. By increasing the percentage of TiO<sub>2</sub> nanoparticles, its efficacy in removing colonies of both bacteria is increased. Water solubility and Vapor permeability of nanobiocomposite films decreased with increasing weight percentage of TiO<sub>2</sub>. The tensile strength of the film containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles is more than the tensile strength of neat carboxymethyl chitosan film, which is statistically significant (<math>p &lt; 0.05</math>). The study demonstrated the high potential of bionanocomposites in preventing the growth of pathogenic bacteria and showed that such packages could be used to increase the shelf-life of food.</p> |