

بررسی خصوصیات فیزیکی فیلم نانوکامپوزیتی حاصل از پروتئین ماهی تقویت شده با نانوفیبر سلولز

محسن کاظمی^{۱*}، بهاره شعبانپور^۲، پرستو پورعاشوری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲- استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۶/۱۷

*نویسنده مسئول مقاله: kazemi_mohsen@yahoo.com

چکیده:

به منظور بهبود خواص فیلم‌های تولیدی بر پایه پروتئین میوفیبریل ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*)، از ۳ سطح نانوفیبر سلولز (۱، ۳ و ۵٪) استفاده شد. تیمار بهینه با ارزیابی خصوصیات مکانیکی، فیزیکی، نوری و همچنین آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین شد. افزودن نانوذرات سلولز تغییری در استحکام کششی ایجاد نکرد اما سبب کاهش کشسانی فیلم‌های تولیدی شد ($p < 0.05$). خاصیت ممانعت فیلم‌ها در برابر بخار آب و دیگر خواص فیزیکی، با افزودن نانوفیبرهای سلولز در سطح ۱٪ بهبود یافت اما در غلظت‌های بالاتر تضعیف شد ($p < 0.05$). نتایج حاصل از SEM نیز نشان داد که نانوذرات در غلظت پایین پراکنش همگن‌تری دارند و فیلم‌های به دست آمده دارای سطح مقطع صاف‌تر و مناسب‌تر نسبت به سطوح بالاتر نانوذرات بودند. به طور کلی می‌توان گفت در تولید فیلم‌های پروتئین میوفیبریل-نانوفیبر سلولز، استفاده از سطوح پایین نانوذرات در بهبود خواص مکانیکی و فیزیکی فیلم‌ها موثر می‌باشد.

کلید واژگان: فیلم، نانوکامپوزیت، پروتئین میوفیبریل ماهی، نانوفیبر سلولز

مقدمه

در میان مواد اصلی بسته‌بندی، پلاستیک‌های تولیدی از نفت از نیمه قرن بیستم به بعد به‌طور گسترده‌ای استفاده شده‌اند که به دلیل عدم تجزیه‌پذیری سبب مشکلات جدی زیست محیطی شده‌اند (Rhim et al., 2013). در نتیجه در سال‌های اخیر تحقیقات بیشتر بر تولید فیلم‌های خوراکی/زیست تخریب‌پذیر از پلیمرهای طبیعی متمرکز شده است (Pires et al., 2011). زیست پلیمرها موادی هستند که حداقل یک مرحله از فرایند تخریب‌شان از طریق متابولیسم طبیعی موجودات زنده صورت می‌گیرد (Sorrentino et al., 2007) و می‌توانند به‌عنوان سدکننده گازها و همچنین تکمیل‌کننده انواع دیگر بسته‌بندی به‌کار روند. پروتئین‌ها به دلیل فراوانی به‌نسبت بالا، توانایی تشکیل فیلم و کیفیت مغذی مناسب می‌توانند به‌طور گسترده برای تهیه فیلم‌های خوراکی استفاده شوند. خواص فیلم‌های پروتئینی به عوامل مختلفی از قبیل منبع پروتئین، pH محلول پروتئینی، نرم‌کننده^۱ مورد استفاده، شرایط تولید و مواد مورد استفاده در محلول تشکیل‌دهنده فیلم وابسته است (Limpan et al., 2010). از میان انواع پروتئین، پروتئین‌های میوفیبریل ماهی می‌توانند برای تهیه فیلم‌هایی با شفافیت و استحکام خوب استفاده شوند، زیرا پروتئین‌های میوفیبریل کاملاً کشسان بوده و توانایی تشکیل زمینه پیوسته‌ای را در طی خشک شدن فیلم دارند (Limpan et al., 2012). اما به‌طور کلی ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌های پروتئینی ضعیف است و در مقابل بخار آب بازدارندگی پایینی دارند. از این‌رو از روش‌هایی مثل استفاده از نانوذرات برای بهبود خواص

عملکردی فیلم‌ها استفاده می‌شود (Pires et al., 2013). زیست نانوکامپوزیت‌ها مفهوم جدیدی از مواد ترکیبی و کاربردی هستند که به‌وسیله شرکت دادن تقویت‌کننده‌هایی با حداقل یک بعد در مقیاس نانو در بستر پلیمر طبیعی تولید می‌شوند (Savadekar et al., 2012). در این ترکیبات مواد پرکننده و تقویت‌کننده درون بستر پلیمری پخش شده و در نتیجه سبب بهبود ویژگی‌های مکانیکی، حرارتی، نوری و فیزیکوشیمیایی فیلم تولیدی شده و همچنین بازدارندگی نانوکامپوزیت‌های حاصل را نسبت به پلیمر اولیه یا کامپوزیت‌های معمولی افزایش می‌دهند (Sorrentino et al., 2007). نانوفیبرهای طبیعی سلولز به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد و جذابی از قبیل زیست تخریب‌پذیری، هزینه مناسب، نسبت ابعاد بالا و وزن پایین به‌عنوان یک تقویت‌کننده توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Savadekar et al., 2012). نانوفیبرهای سلولز تاکنون به‌عنوان تقویت‌کننده در پلیمرهای مختلفی از قبیل نشاسته، کیتوزان و پروتئین سویا به‌کار رفته‌اند که حاصل آن تقویت و بهبود کارایی پلیمرهای تولیدی بوده است (Wang et al., 2006; Li et al., 2009; Savadekar et al., 2012). با توجه به مطالب گفته شده، هدف از این پژوهش تهیه فیلم زیست نانوکامپوزیت پروتئین-نانوفیبر سلولز و بررسی تأثیر افزودن نانوفیبر سلولز بر فیلم پروتئینی و تعیین میزان بهینه نانوسلولز در بستر زیست پلیمر است.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی:

در این تحقیق موادی از قبیل ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) تازه (تهیه شده از

1. Plasticizer

بازار ماهی‌فروشان گرگان)، نانوفیبر سلولز (متوسط قطر فیبرها ۳۲ نانومتر و خلوص بیش از ۹۸ درصد) (Nano Novin Polymer co, IRAN)، گلیسرول (شرکت کیان کاوه آزما)، سدیم هیدروکسید (NaOH) و هیدروکلریک اسید (HCl) (Applichem) استفاده شدند.

تولید پروتئین میوفیبریل

ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) به‌صورت تازه تهیه شده و پس از شست‌وشو با آب، استخوان‌گیری شد. گوشت چرخ شده به‌دست آمده به‌منظور استخراج پروتئین‌های میوفیبریل استفاده گردید (Limpan et al., 2012). بدین منظور ابتدا گوشت چرخ شده ماهی با آب مقطر سرد مخلوط شده (نسبت ۳:۱، گوشت: آب) و در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس توسط یک پارچه نایلنی آگیری و در مرحله بعد گوشت چرخ شده با آب نمک ۰/۵ میلی‌مولار مخلوط (نسبت ۵:۱، گوشت: آب نمک) و در پی آن همگن و آگیری گردید. فرایند شست‌وشو دو بار تکرار شد.

تهیه فیلم‌های زیست نانوکامپوزیت

بدین منظور، ابتدا محلول فیلم پروتئینی ۲ درصد (وزنی/حجمی) تهیه (Limpan et al., 2010) و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ همگن شد. سپس گلیسرول به میزان ۵۰ درصد (وزنی/وزنی) محتوای پروتئین به محلول افزوده و مخلوط به‌آرامی به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. سپس pH محلول به‌وسیله HCl برای حل شدن پروتئین‌های میوفیبریل روی ۳ تنظیم گردید (Limpan et al., 2010). بقایای نامحلول به‌وسیله یک پارچه نایلنی فیلتر شد. در مرحله بعد نانوفیبرهای سلولز (محلول ژلی التراسوند شده با غلظت

۲/۵ درصد) به نسبت‌های مختلف ۱، ۳ و ۵ درصد (گرم/ ۱۰۰ گرم پروتئین) به محلول تشکیل فیلم افزوده شد (Andrade et al., 2014) و به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ همگن گردید. پس از تهیه محلول‌های تشکیل فیلم، میزان ۴ گرم از آنها درون ظروف پلاستیکی مربعی (۵×۵ سانتی‌متر) پخش شد. محلول‌ها در یک محفظه خشک‌کننده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۲۰ ساعت خشک شدند. پس از خشک شدن، فیلم‌ها از سطح ظروف جدا شده و برای رسیدن به تعادل رطوبتی به مدت ۴۸ ساعت در دسیکاتور حاوی نیترات منیزیم (رطوبت نسبی ۵۰ درصد) در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس آزمون‌های مربوط به خواص فیلم‌های تولیدی انجام شد.

ضخامت فیلم‌ها

سنجش میزان ضخامت نمونه‌ها با استفاده از ریزسنج دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر (Mitutoyo, Japan) انجام گرفت. ۹ نقطه از هر نمونه برای اندازه‌گیری انتخاب شد. میانگین ضخامت‌های به‌دست آمده برای تعیین میزان مقاومت کششی و نفوذپذیری به بخار آب استفاده گردید.

تعیین خواص مکانیکی

خواص مکانیکی با استفاده از دستگاه تجزیه و تحلیل بافت (TexVol, Sweden) ارزیابی شد. فیلم‌ها به شکل مستطیل در ابعاد ۱۰×۲/۵۴ سانتی‌متر بریده شدند و به تعادل رطوبتی رسیدند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵۰ میلی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. عواملی شامل مقاومت به کشش (TS^1) و درصد افزایش طول تا نقطه پاره شدن (EAB^2) طبق

1. Tensile Strength
2. Elongation at break

استاندارد ASTM D882-02 از روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل به دست آمدند (ASTM, 2002).
تعیین میزان نفوذپذیری فیلم‌ها در برابر بخار آب
 (WVP^۱):

نفوذپذیری فیلم‌ها براساس روش E96 مصوب ASTM اندازه‌گیری شد (ASTM, 2010). فیلم‌ها با گریس روی سطح سلول‌های اندازه‌گیری با محتوای ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ثابت شده و درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار داده شدند. آب در دمای ۲۵°C رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد و اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵°C اختلاف فشار بخاری معادل $10^3 \times 2/337$ پاسکال ایجاد می‌کند. سلول در لحظه صفر و ۸ ساعت پس از شروع آزمایش توزین و میزان تغییرات وزنی آنها محاسبه شد. نفوذپذیری به بخار آب طبق رابطه زیر به دست آمد.

کاهش وزن (W) = نفوذپذیری به بخار آب (WVP)
 سطح در معرض فیلم (A) / میانگین ضخامت فیلم (X) ×
 اختلاف فشار دو سمت فیلم (ΔP) × زمان (t) ×

تعیین میزان جذب آب

ابتدا نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون دسیکاتور حاوی سلیکاژل قرار گرفتند؛ سپس وزن اولیه آنها مشخص شد. در مرحله بعد فیلم‌ها درون ظروف محتوای آب مقطر در دمای ۲۵°C قرار داده شدند. فیلم‌ها به صورت دوره‌ای و در فواصل زمانی معین (۱۰ دقیقه) از ظرف خارج و پیش از وزن کردن سطح آنها به آرامی توسط دستمال خشک شده و توزین نمونه تا رسیدن به وزن

ثابت ادامه پیدا کرد. میزان جذب رطوبت از رابطه زیر محاسبه گردید (Lavorgna et al., 2010).

۱۰۰ × [وزن فیلم پیش از غوطه‌وری / (وزن فیلم پیش از غوطه‌وری - وزن فیلم پس از غوطه‌وری)] = جذب رطوبت (درصد)

تعیین حلالیت فیلم‌ها

ابتدا وزن اولیه نمونه‌ها پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵°C تعیین گردید. سپس نمونه‌ها درون ظروف محتوای آب مقطر غوطه‌ور شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵°C به شکل ملایمی تکان داده شدند. سپس فیلم‌ها با کاغذهای صافی که از قبل خشک و توزین شده بودند، فیلتر شدند و مجدد در دمای ۱۰۵°C خشک شدند. حلالیت فیلم‌ها از رابطه زیر محاسبه گردید (Tunc et al., 2007).

وزن نمونه خشک اولیه / ۱۰۰ × (وزن فیلم پس از غوطه‌وری - وزن نمونه خشک اولیه) = حلالیت فیلم (درصد)

سنجش رنگ سطحی، کدورت و میزان عبور نور از فیلم‌ها

به منظور سنجش میزان رنگ سطحی از دستگاه رنگ‌سنج (BYK Gardner, USA) استفاده گردید. نمونه‌ها روی کاشی استاندارد سفید رنگ قرار گرفتند و ۳ عامل L^* (شفافیت)، a^* (+ قرمز / - سبز) و b^* (+ زرد / - آبی) برای آنها تعیین گردید. همچنین برای محاسبه اختلاف رنگ نمونه‌ها (ΔE)، داده‌های به دست آمده برای سه عامل فوق مرتبط با مرجع و نیز سه عامل L^* ، a^* و b^* مرتبط با هر نمونه در رابطه زیر قرار داده شد (Ojagh et al., 2010).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$$

1. Water vapor permeability

آزمون Duncan در سطح $p < 0.05$ استفاده شد. تمام آزمایش‌ها با حداقل ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

خواص مکانیکی

نتایج حاصل از آزمون مکانیکی فیلم‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. میزان استحکام کششی (TS) به‌طور کلی با افزودن NFC^۲ به تیمار شاهد (پروتئین ماهی) تغییری نکرد. درصد کشسانی فیلم‌ها با افزودن نانوذرات در سطح ۱ درصد به‌طور معناداری کاهش یافت ($p < 0.05$) اما در سطح ۳ درصد مجدد افزایش نشان داد ($p < 0.05$). در مجموع افزودن نانوفیبر سلولز به تیمار شاهد موجب تضعیف کشسانی فیلم‌های نانوکامپوزیت شد.

برای سنجش میزان عبور نور و کدورت فیلم‌ها، نمونه‌های فیلم (1×4 سانتی‌متر) درون سلول‌های اسپکتروفوتومتری قرار گرفتند. به‌منظور سنجش میزان عبور نور و کدورت، به‌ترتیب از طول موج ۸۰۰-۲۰۰ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر برای اسکن استفاده گردید. برای محاسبه میزان کدورت فیلم‌ها از رابطه زیر استفاده شد: ضخامت فیلم / میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر = کدورت فیلم

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

بررسی ریزساختار نمونه‌ها به‌وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (KYKY-EM3200) انجام شد. برای بررسی اثرهای افزودن نانوفیبرهای سلولز بر ریزساختار فیلم‌ها، تصاویری از مقطع عرضی آنها تهیه شد. پس از شکست در ازت مایع نمونه‌ها با استفاده از چسب نقره روی پایه‌های آلومینیومی قرار داده شدند. سپس پایه‌ها با یک دستگاه پوشش‌دهنده تا نقطه بحرانی خشک شده و به‌مدت ۵ دقیقه با طلا پوشش داده شدند. تصویربرداری از نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی با شتاب ولتاژ ۲۶ کیلووات انجام شد (Tongnuanchan et al., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS انجام گردید که در آن برای بررسی اختلاف بین داده‌های به‌دست آمده از فیلم‌ها، از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. همچنین برای تعیین وجود تفاوت معنادار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از

2. Nanofibrillated cellulose

1. Scanning electron microscopy

جدول ۱ خواص مکانیکی فیلم‌های پروتئینی حاوی درصدهای مختلف نانوفیبر سلولز

نوع فیلم	مقاومت به کشش (Mpa)	ازدیاد طول (%)	ضخامت (mm)
شاهد	$7/22 \pm 0/13^a$	$63/83 \pm 1/86^a$	$0/073 \pm 0/009^a$
پروتئین - نانوسلولز ۱٪	$6/01 \pm 0/45^a$	$45/87 \pm 0/52^c$	$0/062 \pm 0/003^{ab}$
پروتئین - نانوسلولز ۳٪	$6/49 \pm 1/56^a$	$53/53 \pm 1/21^b$	$0/070 \pm 0/007^a$
پروتئین - نانوسلولز ۵٪	$7/25 \pm 0/43^a$	$47/20 \pm 0/60^c$	$0/054 \pm 0/008^b$

حروف متفاوت (a, b, c و...) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح $p < 0/05$ است.

خواص فیزیکی فیلم‌های تولیدی (نفوذپذیری به بخار آب، حلالیت، تورم)

نتایج مربوط به میزان نفوذپذیری به بخار آب، حلالیت و تورم فیلم‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. نفوذپذیری فیلم‌های پروتئینی با افزودن NFC در سطح ۱ درصد کاهش نشان داد و به حدود $1/28 \pm 0/36$ (10^{-10} g/ms Pa) رسید ($p < 0/05$). در غلظت‌های بالاتر مجدد میزان نفوذپذیری در نانوکامپوزیت‌های تولیدی نسبت به تیمار NFC ۱ درصد افزایش نشان داد ($p < 0/05$) و بیشترین میزان نفوذپذیری، در فیلم‌های با سطح نانوسلولز ۵ درصد مشاهده شد.

حلالیت فیلم شاهد در اثر افزودن NFC در سطح ۱ درصد به شکل معناداری کاهش یافت ($p < 0/05$)

به‌طوری‌که حلالیت نانوکامپوزیت‌ها پس از ۲۴ ساعت به حدود $26/14 \pm 0/24$ ٪ رسید. با افزایش غلظت نانوذرات حلالیت فیلم‌ها افزایش یافت و در سطح NFC ۵ درصد به بیشترین حد خود رسید که این مقدار به‌طور معناداری بیشتر از حلالیت فیلم شاهد بود ($p < 0/05$). در تحقیق حاضر، بیشترین میزان تورم را تیمار شاهد نشان داد و افزودن نانوذرات سلولز در سطح ۱ و ۳ درصد به‌طور چشم‌گیری سبب کاهش تورم نانوکامپوزیت‌ها شد ($p < 0/05$). کمترین میزان درصد جذب رطوبت را فیلم‌های با سطح NFC ۱ درصد نشان دادند، اما در غلظت‌های بالاتر مجدد میزان تورم افزایش یافت ($p < 0/05$) و به حدود $120/98 \pm 1/58$ درصد در تیمار NFC ۵ درصد رسید.

جدول ۲ خواص فیزیکی فیلم‌های پروتئینی حاوی درصدهای مختلف نانوفیبر سلولز

نوع فیلم	ضخامت (mm)	نفوذپذیری (10^{-10} g/ms Pa)	حلالیت (%)	تورم‌پذیری (%)
شاهد	$0/056 \pm 0/008^a$	$2/16 \pm 0/35^a$	$36/25 \pm 1/15^b$	$243/74 \pm 0/68^a$
پروتئین - نانوسلولز ۱٪	$0/045 \pm 0/011^a$	$1/28 \pm 0/36^b$	$24/14 \pm 0/26^d$	$40/20 \pm 0/63^c$
پروتئین - نانوسلولز ۳٪	$0/068 \pm 0/016^a$	$2/41 \pm 0/55^a$	$32/53 \pm 1/12^c$	$40/81 \pm 0/59^c$
پروتئین - نانوسلولز ۵٪	$0/061 \pm 0/026^a$	$2/81 \pm 0/39^a$	$53/89 \pm 0/42^a$	$120/98 \pm 1/58^b$

حروف متفاوت (a, b, c و...) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح $p < 0/05$ است.

رنگ سطحی، کدورت و میزان عبور نور از فیلم‌ها

مقادیر L^* ، a^* ، b^* و همچنین اختلاف رنگ کلی (ΔE) فیلم‌ها در جدول ۳ گزارش شده است. فیلم پروتئینی بالاترین میزان روشنایی (L^*) را داشت. افزودن NFC

به‌طور معناداری سبب کاهش این شاخص در نانوکامپوزیت‌ها شد ($p < 0/05$). شاخص a^* در تیمارهای مختلف تغییری نشان نداد، اما شاخص b^* با افزودن NFC ابتدا در سطح ۱ درصد کاهش و مجدد در سطوح بالاتر

نانوذرات افزایش یافت ($p < 0/05$) و به بالاترین حد خود در سطح ۵ درصد NFC رسید. اختلاف رنگ کلی نیز در فیلم‌های نانوکامپوزیت نسبت به فیلم شاهد در غلظت‌های

جدول ۳ ویژگی‌های رنگ سطحی فیلم‌های پروتئینی حاوی درصد‌های مختلف نانوفیبر سلولز

نوع فیلم	L*	a*	b*	ΔE
شاهد	۹۲/۶۶±۰/۴ ^a	۲/۴۲±۰/۰۴ ^a	۴/۷۷±۰/۰۰۹ ^c	۵/۸۱±۰/۲۸ ^b
پروتئین - نانوسلولز ۱٪	۹۱/۷۶±۰/۱۱ ^b	۲/۴۲±۰/۰۲ ^a	۳/۸۳±۰/۱۰ ^d	۵/۴۰±۰/۱۱ ^b
پروتئین - نانوسلولز ۳٪	۹۱/۱۶±۰/۷۵ ^b	۲/۴۳±۰/۰۵ ^a	۵/۰۵±۰/۱۵ ^b	۶/۵۳±۰/۳۸ ^a
پروتئین - نانوسلولز ۵٪	۹۱/۵۳±۰/۳۵ ^b	۲/۴۴±۰/۰۵ ^a	۵/۵۱±۰/۰۹ ^a	۶/۶۶±۰/۱۷ ^a

حروف متفاوت (a, b, c, ..) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح $p < 0/05$ است.

اثرهای افزودن مقادیر مختلف NFC به فیلم پروتئین میوفیبریل بر شاخص کدورت و مقادیر عبور نور در طول موج‌های مختلف در جدول ۴ مشهود است. با افزودن NFC به فیلم شاهد به‌طورکلی نفوذپذیری به نور در ناحیه فرابنفش کاهش پیدا کرد. همچنین میزان عبور نور از فیلم‌های نانوکامپوزیت در محدوده طول موج‌های مرئی با

جدول ۴ ویژگی کدورت و نفوذ پذیری به نور فیلم‌های پروتئینی حاوی درصد‌های مختلف نانوفیبر سلولز

نوع فیلم	طول موج	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰	۵۰۰	۶۰۰	۷۰۰	۸۰۰	کدورت
شاهد	۲۲/۳۳	۱۴	۶۱/۸۶	۷۵/۲۳	۷۹/۰۳	۸۰/۵۰	۸۱/۰۳	۲/۶۴±۰/۲۳ ^c	
پروتئین - نانوسلولز ۱٪	۲۴/۳۳	۱۸/۸۳	۵۹/۹۳	۷۳/۱۳	۷۴/۵۶	۷۶/۶۶	۷۴/۹۳	۴/۲۷±۰/۶۲ ^b	
پروتئین - نانوسلولز ۳٪	۱۵/۱۶	۵/۰۰	۳۱/۴۳	۵۱/۴۳	۵۶/۵۶	۵۹/۳۶	۶۰/۶۰	۳/۹۰±۰/۲۸ ^b	
پروتئین - نانوسلولز ۵٪	۱۸/۸۳	۸/۹۳	۴۲/۷۰	۵۰/۶۴	۵۵/۶۳	۵۲/۳۰	۵۵/۹۰	۶/۵۹±۰/۳۴ ^a	

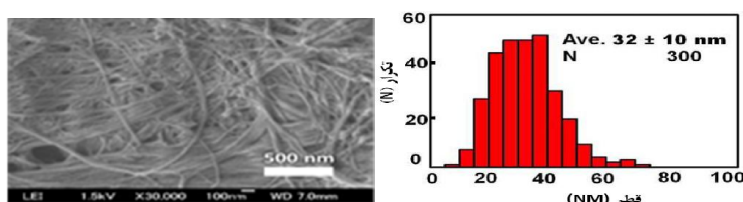
حروف متفاوت (a, b, c, ..) در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح $p < 0/05$ است. طول موج (nm)

آزمون میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

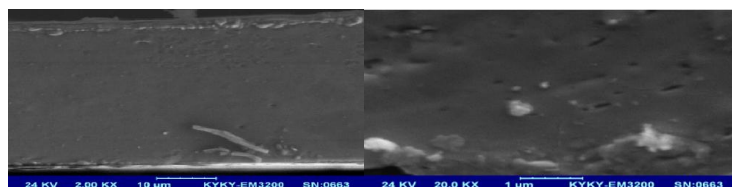
شکل ۱ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوفیبرهای سلولز و مقطع عرضی فیلم‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است نانوفیبرهای سلولز به شکل رشته‌های تقریباً استوانه‌ای مشاهده شدند. قطر نانوفیبرها در محدوده بین ۵ تا ۷۵ (nm)،

بیشینه اندازه قطر آنها بین ۲۵ تا ۴۰ (nm) و میانگین اندازه قطر آنها ۳۲ (nm) بود. همچنین طبق شکل ۱ فیلم شاهد مقطع عرضی به‌نسبت صاف و یکنواختی داشت. با افزودن نانوذرات سلولز در سطح ۱ درصد نیز مقطع عرضی صاف و بدون ترک و منفذ بود و نانوفیبرهای سلولز توزیع یکنواختی نشان دادند. اما با افزودن NFC

در سطح ۳ و ۵ درصد پستی و بلندی‌های غیریکنواخت، ترک، منفذ و همچنین توزیع ناهمگن نانوفیبرها در مقطع عرضی فیلم‌ها مشاهده شد.

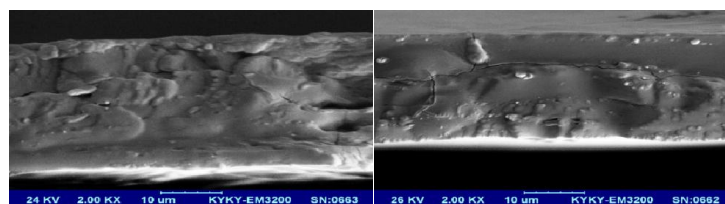


نانوفیبرهای سلولز



پروتئین - نانوسلولز ۱ درصد

شاهد



پروتئین - نانوسلولز ۵ درصد

پروتئین - نانوسلولز ۳ درصد

شکل ۱ تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای NFC (بزرگ‌نمایی ۳۰۰۰۰) و مقطع عرضی فیلم‌های مختلف (شاهد ۲۰۰۰۰، نانوکامپوزیت‌ها ۲۰۰۰)

بحث

محکم NFC در پلیمر پروتئینی و در پی آن تقویت استحکام زیست پلیمر حاصل طبق نتایج مشابه (Savadekar et al., 2012; Savadekar and Mhaske, 2012)، احتمالاً در غلظت‌های پایین‌تر از ۱ درصد نانوفیبر صورت می‌گیرد. با افزایش غلظت، NFC قادر به تشکیل مناسب شبکه و پیوندهای تقویت‌کننده در پلیمر نیست و بنابراین تجمع و توزیع ناهمگن نانوذرات می‌تواند حتی منجر به کاهش استحکام کششی شود. این مطلب با نتایج تحقیق روی پلیمرهایی مثل کاپاکارژینان (Savadekar et al., 2012) و نشاسته (Savadekar and

مقاومت کششی پارامتری برای سنجش استحکام فیلم است و افزایش طول در نقطه شکست نیز معیاری برای بررسی کشسانی فیلم پیش از پارگی است (Krochta and Mulder-Johnston, 1997). همان‌طور که مشاهده شد، مقاوت کششی (TS) فیلم‌های نانوکامپوزیت نسبت به تیمار شاهد تا سطح ۳ درصد NFC کاهش پیدا کرد که البته این تغییر معنادار نبود. این می‌تواند به دلیل عملکرد NFC در زیست پلیمر باشد که در واقع به لحاظ تقویت استحکام دارای ظرفیت محدود است. تشکیل شبکه

(Mhaske, 2012) همخوانی داشت، اما با مطالعات انجام شده روی پلیمر تولیدی از پوره انبه (Azeredo et al., 2009) و سدیم کازئینات (Pereda et al., 2011) تناقض داشت. درصد افزایش طول در نقطه شکست (EAB) نانوکامپوزیت‌ها نسبت به فیلم شاهد کاهش یافت که در واقع می‌توان گفت مشتقات سلولز پس از اضافه شدن به بستر پروتئینی به دلیل ماهیت سختی بیشتر، تحرک مولکولی را در بستر پلیمر کاهش داده و در نتیجه سبب افت کشش‌پذیری فیلم نانوترکیب در مقایسه با پروتئین خالص شده‌اند (Pereda et al., 2011). این یافته با نتایج تحقیقات روی پوره انبه و سدیم کازئینات مطابقت داشت (Azeredo et al., 2009; Pereda et al., 2011).

نفوذپذیری به بخار آب یکی از شاخصه‌های مهم پلیمرهای مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی است. طبق نتایج افزودن NFC ابتدا سبب کاهش نفوذپذیری به بخار آب شد. این می‌تواند به دلیل طبیعت آب‌گریز^۱ NFC باشد که به کاهش نرخ انتقال بخار آب کمک می‌کند (Svagan et al., 2009). حضور مرحله پراکنده NFC به عنوان سدکننده، مسیر عبور قطره‌های آب را طولانی کرده و بنابراین سبب کاهش نرخ انتقال بخار آب می‌شود (Savadekar et al., 2012). این تصور نیز وجود دارد که تأثیر مثبت سطوح پایین نانوذرات بر کاهش نفوذپذیری ناشی از پراکنش همگن‌تر و ایجاد باندهای بین مولکولی نسبتاً بیشتر بین نانوذرات و پلیمر پروتئینی باشد که تاحدی توانسته‌اند مقاومت پلیمر را در برابر آب افزایش دهند (Stepan et al., 2014). از طرفی با افزایش غلظت نانوذرات سلولز، مجدد نفوذپذیری به بخار آب افزایش نشان داد. این پدیده می‌تواند به این دلیل باشد که در غلظت‌های بالا آب با سرعت بیشتری در خلل و فرج شبکه

نانوفیبر نفوذ کرده و سبب افزایش نفوذپذیری آن شده است (Stepan et al., 2014). همچنین عدم پراکنش یکنواخت و برهم خوردن ریزساختار زیست پلیمر ناشی از حضور غلظت بالای NFC، و نیز ایجاد شکستگی در آن می‌تواند دلیل این مطلب باشد (Pereda et al., 2011). تصاویر تهیه شده از SEM نیز گویای این مسئله است که فیلم شاهد و نانوکامپوزیت ۱ درصد سطح مقطع صاف‌تر، یکنواخت‌تر و شکستگی کمتری داشتند. مشاهدات عنوان شده با نتایج تحقیقات مشابه در این زمینه همخوانی داشت (Pereda et al., 2011; Stepan et al., 2014). طبق نتایج، استفاده از نانوفیبرهای سلولز در غلظت پایین (۱ درصد) سبب کاهش حلالیت فیلم‌ها شد. علت آن می‌تواند مناسب‌تر بودن شرایط تشکیل پیوند بین پلیمر پروتئینی و NFC نسبت به غلظت‌های بالاتر باشد که تاحدی موجب بهبود مقاومت فیلم در برابر حلالیت شده است. علاوه بر این چون سلولز محلول در آب نیست، احتمالاً افزودن آن به فیلم موجبات کاهش حلالیت آن را فراهم کرده است که این مشاهدات با نتایج تحقیق Abdollahi و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت. با افزایش غلظت نانوذرات از این حد در پلیمر حلالیت افزایش یافت و به مقدار بیشتر از تیمار شاهد رسید. این امر نیز می‌تواند به دلیل عدم پراکنش یکنواخت نانوذرات ناشی از افزایش غلظت و در نتیجه برهم خوردن ساختار زیست پلیمر و افزایش خلل و فرج موجود در آن باشد که سبب می‌شود آب با سرعت بیشتری در ساختار آن نفوذ کرده و حلالیت افزایش یابد (Stepan et al., 2014).

افزودن NFC به فیلم‌های پروتئینی درصد جذب آب آنها را به میزان قابل توجهی کاهش داد. تصور می‌شود که این کاهش به دلیل نفوذ بالای نانوفیبرها به درون بستر پلیمری باشد که در واقع نفوذ آب در میان ریز منافذ پلیمر

1. Hygroscopic

به وسیله فیبر NFC محدود شده و در نتیجه تورم کاهش می یابد (Chen et al., 2008). این نتیجه در تطابق با تحقیقات انجام شده روی سدیم کازئینات (Pereda et al., 2011) و پروتئین سویا (Chen et al., 2008) بود. با افزایش غلظت نانوذرات درصد تورم افزایش یافت؛ احتمالاً به این دلیل که در غلظت های بالای NFC، به سبب عدم پخش یکنواخت نانوذرات در بستر، پلیمر در برابر آب تضعیف شده و مجدد جذب رطوبت افزایش یافته است. در این راستا، نتایجی مشابه (Stepan et al., 2014) و متفاوت (Chen et al., 2008) از سوی دیگر محققان گزارش شده است. به طور کلی خواص فیزیکی زیست پلیمرهای تولیدی رفتاری مشابه نشان دادند به طوریکه غلظت پایین نانوذرات موجب بهبود آنها شد، اما با افزایش غلظت NFC تضعیف شدند.

از جنبه رنگ سنجی، طبق نتایج فیلم های پروتئینی ظاهری روشن تر و شفاف تر نسبت به نانوکامپوزیت ها داشتند و با افزودن نانوذرات به فیلم پروتئینی، شاخص L^* (روشنایی) کاهش یافت. این می تواند به دلیل تشکیل شبکه و یا تجمع نانوفیبرها درون زیست پلیمر باشد. شاخص b^* ابتدا در غلظت پایین NFC کاهش یافت که در واقع نشان از کاهش میزان زردی فیلم ها داشت و با افزایش غلظت نانوسلولز مجدد بر میزان زردی فیلم ها افزوده شد. اختلاف رنگ فیلم های تولیدی نیز با افزودن نانوفیبرهای سلولز بیشتر شده و به بالاترین میزان خود در تیمار ۵ درصد رسید.

شفافیت و عبور نور از فیلم های تولیدی برای بسته بندی بر ویژگی های ظاهری محصول بسته بندی شده تأثیر زیادی دارد (Pereda et al., 2011). در این تحقیق به طور کلی فیلم ها بازدارندگی خوبی در برابر اشعه فرابنفش نشان دادند. همچنین با افزایش غلظت NFC در پلیمر،

نفوذپذیری آنها به نور در ناحیه مرئی مرتب کاهش پیدا کرد، این احتمالاً به دلیل افزایش میزان و پخش NFC و حضور ذرات جامد ناشی از آن است که در تصاویر حاصل از SEM نیز مشهود است. این مشاهدات با نتایج گزارش شده از چند تحقیق مشابه مطابقت داشت (Chen et al., 2008; Savadekar and Mhaske, 2012; Bilbao-Sainz et al., 2011). کدورت نیز معیاری برای اندازه گیری شفافیت فیلم ها است. با توجه به جدول ۴ کدورت در نانوکامپوزیت ها نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان داد. این مسئله می تواند به دلیل حضور مرحله پراکنده NFC درون بستر پلیمری باشد. در واقع این امر سبب افزایش کدورت به عنوان تابعی از تغییر ضریب شکست هر دو مرحله و همچنین غلظت و اندازه ذرات پرکننده می شود (Villalobos et al., 2005). به علاوه می توان گفت که افزایش میزان کدورت ناشی از پخش شدن نور توسط نانوذرات سلولز است که در بستر پروتئینی تشکیل دهنده فیلم پخش شده و بنابراین عبور نور را از آن کاهش می دهد. این نتایج به وسیله مشاهدات گزارش شده از تحقیقات مشابه تأیید شد (Pereda et al., 2011; Tunc and Duman, 2010). با توجه به تصاویر SEM و بررسی توزیع، بیشینه و میانگین اندازه نانوذرات، تولید پلیمر نانوکامپوزیت با مشخصه داشتن حداقل یک ترکیب در مقیاس نانومتر (اندازه ذرات بین ۱۰۰-۱۰۰۰ nm) تأیید شد (Savadekar et al., 2012). همچنین مشخص شد که نانوکامپوزیت ها با سطح ۱ درصد NFC دارای سطح مقطعی نسبتاً صاف، یکنواخت و بدون ترک بودند که این بیانگر پخش همگن تر نانوذرات و تولید فیلمی یکنواخت تر در قیاس با غلظت های بالاتر NFC است. اما استفاده از نانوذرات در سطوح ۳ و ۵ درصد سبب تجمع، ایجاد شکاف و تخریب ریزساختار زیست پلیمرها شد. این مشاهدات تأییدی بر نتایج حاصل از آزمون های فیزیکی

Bilbao-Sainz, C., Bras, J., Williams, T., Sénechal, T., and Orts, W. 2011. HPMC reinforced with different cellulose nano-particles. *Carbohydrate Polymers*, 86(4): 1549-1557.

Chen, G., and Liu, H. 2008. Electrospun cellulose nanofiber reinforced soybean protein isolate composite film. *Journal of applied polymer science*, 110(2): 641-646.

Krochta, J. M and De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films. *Food Technology*, 51: 61-74.

Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., and Buonocore, G. G. 2010. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 291-298

Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., and Prasarnpran, S. 2010. Properties of biodegradable blend films based on fish myofibrillar protein and polyvinyl alcohol as influenced by blend composition and pH level. *Journal of food engineering*, 100(1): 85-92.

Limpan, N., Prodpran, T., Benjakul, S., and Prasarnpran, S. 2012. Influences of degree of hydrolysis and molecular weight of poly (vinyl alcohol) (PVA) on properties of fish myofibrillar protein/PVA blend films. *Food Hydrocolloids*, 29(1): 226-233.

Li, Q., Zhou, J., and Zhang, L. 2009. Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 47(11): 1069-1077.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., and Hosseini, S. M. H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1): 161-166.

Pereda, M., Amica, G., Rácz, I., and 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.

Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., and Marques, A. 2013. Hake proteins edible films incorporated with essential oils: Physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1): 224-231.

بود و با یافته‌های حاصل از تحقیق روی سدیم کازئینات همخوانی داشت (Pereda et al., 2011).

نتیجه‌گیری کلی

ارزیابی فیلم‌های تولیدی از پروتئین و نانوکامپوزیت‌های حاوی ۳ سطح ۱، ۳، و ۵ درصد NFC با انجام آزمون‌های مختلف مکانیکی، فیزیکی، نوری و تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که برای تقویت ویژگی‌های مختلف فیلم‌های حاصل از پروتئین میوفیبریل ماهی و تولید پلیمر خوراکی با خواص کاربردی مناسب و کمک‌کننده به منظور افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی، مقادیر پایین NFC مناسب‌تر است و استفاده از NFC در غلظت‌های بالا موجب تخریب ریزساختار فیلم‌ها شده و در نتیجه تضعیف خواص مختلف آنها را در پی خواهد داشت.

منابع

Andrade, R., Skurtys, O., Osorio, F., Zuluaga, R., Gañán, P., and Castro, C. 2014. Wettability of gelatin coating formulations containing cellulose nanofibers on banana and eggplant epicarps. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1): 158-165.

ASTM. 2002. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Material*, D 882-02.

ASTM. 2010. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: *American Society for Testing and Material*, Designation: E96/E96M-10.

Azeredo, H., Mattoso, L. H. C., Wood, D., Williams, T. G., Avena-Bustillos, R. J., and McHugh, T. H. 2009. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *Journal of Food science*, 74(5): N31-N35.

- Stepan, A. M., Ansari, F., Berglund, L., and Gatenholm, P. 2014.** Nanofibrillated cellulose reinforced acetylated arabinoxylan films. *Composites Science and Technology*, 98: 72-78.
- Svagan, A. J., Hedenqvist, M. S., and Berglund, L. 2009.** Reduced water vapour sorption in cellulose nanocomposites with starch matrix. *Composites science and technology*, 69(3): 500-506.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., and Prodpran, T. 2012.** Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chemistry*, 134(3): 1571-1579.
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., and Gastaldi, E. 2007.** Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289(1): 159-168.
- Tunç, S., and Duman, O. 2010.** Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. *Applied Clay Science*, 48(3): 414-424.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernández, P., Gutiérrez, G., and Chiralt, A. 2005.** Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. *Food Hydrocolloids*, 19(1): 53-61.
- Wang, Y., Cao, X., and Zhang, L. 2006.** Effects of cellulose whiskers on properties of soy protein thermoplastics. *Macromolecular bioscience*, 6(7): 524-531.
- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, G., Batista, I., Mendes, R., Nunes, L., and Marques, A. 2011.** Characterization of biodegradable films prepared with hake proteins and thyme oil. *Journal of Food Engineering*, 105(3): 422-428.
- Rhim, J. W., Park, H. M., and Ha, C. S. 2013.** Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10): 1629-1652.
- Savadekar, N. R., Karande, V. S., Vigneshwaran, N., Bharimalla, A. K., and Mhaske, S. T. 2012.** Preparation of nano cellulose fibers and its application in kappa-carrageenan based film. *International journal of biological macromolecules*, 51(5): 1008-1013.
- Savadekar, N. R., and Mhaske, S. T. 2012.** Synthesis of nano cellulose fibers and effect on thermoplastics starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 89(1): 146-151.
- Svagan, A. J., Hedenqvist, M. S., and Berglund, L. 2009.** Reduced water vapour sorption in cellulose nanocomposites with starch matrix. *Composites science and technology*, 69(3): 500-506.
- Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y., and Tanaka, M. 2003.** Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science*, 69(5): 1026-1032.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G., and Vittoria, V. 2007.** Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2): 84-95.



Evaluation of physical properties of nanocomposite films produced by fish myofibrillar protein reinforced with nanofibrillated cellulose

Mohsen Kazemi^{1*}, Bahareh Shabanpour², Parastoo Pourashouri³

1- M. Sc. Student, Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

2- Professor., Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan

Received: 11.04.2015 Accepted: 08.09.2015

*Corresponding author: kazemi_mohsen@yahoo.com

Abstract:

In order to improve the properties of myofibrillar protein-based film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), nanofibrillated cellulose (NFC) at 3 levels (1, 3 and 5%) was used. Optimum treatment was determined by evaluating the mechanical, physical and optical properties as well as scanning electron microscopy analysis (SEM). Cellulose nanoparticles had no effect on tensile strength but reduced the elasticity of film ($p \leq 0.05$). Water vapor barrier property (WVP) and other physical properties of the films were improved by addition of nanofibrillated cellulose at 1%, but decreased at higher concentrations ($p \leq 0.05$). Based on SEM, low concentrations of nanoparticles showed more homogeneous dispersion and films had a smoother and better cross-sectional area compared to the higher levels of nanoparticles. Generally, low levels of nanoparticles could be effective to improve the mechanical and physical properties of myofibrillar protein - nanofibrillated cellulose films.

Keywords: Film, Nanocomposite, Fish myofibrillar protein, Nanofibrillated cellulose