افزایش زمان ماندگاری *خاویار ایرانی* با استفاده از لفاف‌های نانو نقره برپایه دی اکسید تیتانیوم و تعیین میزان باقی‌ماندگی ذرات به روش *تیتراسیون*

سیما مرادی[۱]، عباسعلی مطلبی[۲]، سیدامیرعلی انوار[۲]، حامداهری*[۳]، حامد بهشتی‌هاشیرازی[٤]، نوردهر رکنی[۲]، نکیسا سهرابی‌حقدوست[۲]، علیرضا مختاری[۲]، سوگند وحید[۱]، هدی رحمان‌نیا[۵]، نیوشا علیمحمدی[۵]

چکیده

نانوپکیجینگ یکی از راهکارهای جدید بسته بندی برای افزایش کیفیت و امنیت مواد غذایی است که استفاده از پوشش های بسته بندی نـانو تحـولی بـزرگ در صـادرات محصولات فسادپذیر است. در این تحقیق تعداد۳۸بسته خاویار (۵گرمی)که به ترتیب ٤ بسته در پوشش های عاری از نانو ٤ بسته در پوشش هایppm ٦۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ٤بسته در پوشش هایppm ۵۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ٤بسته در پوشـش هـایppm ٤۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ٤بسته در پوشش هایppm ۲۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ٤بسته در پوشش های ppm ۱۰۰۰ با پایه نانوسیلور در دوتکـرار مـورد بررسـی باکتریـایی و قارچی قرار گرفتند.

بعد از انجام آزمایشات میکروبی و بعد از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم و تشخیص باکتری گرم مثبت از نظر مورفولوژی بررسی و رنگ آمیزی گرم و برای بررسی بیشتر و تعیین نوع باکتری و قارچ بر روی محیط های اختصاصی برده و کشت گردیده شد که بعد از بررسی ۲٤ ساعت، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی و آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم در نمونه های عاری از پوشش نانو مشاهده گردیده شد و لیکن در پوشش پوشش های ppm ۵۰۰۰ و ٦۰۰۰ بصورت معنـی داری در کـاهش رشـد قارچی و باکتریایی موثر بوده، در نهایت به روش تیتراسیون بـه بررسـی میـزان نقـره موجود در خاویارهای بسته بندی شده پرداخته شد که از طریق تیتراسیون با دستگاه تیترازور و اسید سولفریک غلیظ، میزان باقی ماندگی نقره معادل صفر درصد بود.

استفاده از پوشش های ppm ۵۰۰۰ و ٦۰۰۰ باp_{v} کمتر از ۰/۰۵ بصورت معنـی داری در کاهش رشد قارچی و باکتریایی موثر بوده، لذا با توجه به نتایج بدست آمده و عدم رهاسازی ذرات نانو به درون خاویار می توان از این فن آوری جهت افـزایش زمـان ماندگاری این محصول ارزنده وهمچنین ارتقاء صادرات در دنیا استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *زمان ماندگاری، خاویار ایرانی، تیتراسیون*

تاریخ دریافت: ۹۳/٦/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۹

مقدمه

تحقیقات اخیر در زمینه توسعه زمان ماندگاری و افزایش کیفیت مواد غذایی همسو با کاهش ضایعات مواد بسته‌بندی، منجـر بـه تولید بسته‌بندی‌هایی با پایه زیستی نظیر فـیلم‌هـای خـوراکی و تجزیه‌ناپذیر از منابع قابل تجدید شده است. استفاده از این مواد به خاطر خاصیت تجزیه‌پذیر بودن آنهـا باعـث حـل بعضـی از مشکلات در زمینه ضایعات شده اسـت. نظیـر هـر بسـته‌بنـدی دیگـری، بسـته‌بنـدی‌هـای زیسـتی نیـز بایسـتی یـک سـری عملکردهای مهـم شـامل نگهـداری و حفاظـت از غـذا، حفـظ کیفیت حسی و ایمنی و دادن اطلاعات به مصـرف کننـدگان را داشته باشند(۱).

امروزه بسته‌بندی غذا به خصوص روی کنترل و تنظـیم متمرکـز شده است. در تکنولوژی‌های پیشرفته بسته‌بنـدی بـا اسـتفاده از نانو موادی هوشمند انجام می‌شود که می‌توانند نسبت به شرایط محیطی پاسخ دهند و خـود را تـرمیم کننـد و مصـرف‌کننـده را نسبت به آلودگی یا حضور پاتوژن آگاه کنند(۳).

بسته‌بندی‌های هوشمند در صنایع غذایی به محض شروع فسـاد در ماده غذایی در داخل بسته، از خود ماده نگهدارنده آزاد کـرده و تغییـرات دمـایی، تـرشـح رطوبت و مایعات را از ماده غذایی

۱. عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذائی، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۳. استادیار، عضو هیئت علمی، دانشکده علوم مهندسی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران Dr.h.ahari@gmail.com

٤. استادیار، عضو هیئت علمی، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. کارشناس ارشد دانشگاه پیام نور استان تهران، تهران، ایران

داخل بسته تشخیص داده و به مصرف‌کننده اعلام می‌کنند. فیلم پلاستیکی شفافی به نام دورتان که حاوی نانو مواد رسی است در سراسر پلاستیک پراکنده است و قادر است که اکسیژن، دی اکسید کربن و رطوبت را برای حفظ خاویار و سایر غذاها مسدود کند. این ماده می‌تواند پلاستیک‌های روشن‌تر و مقاوم به حرارت ایجاد کند (٦).

همچنین در صنعت بسته بندی مواد غذایی نوع دیگری از پلاستیک ها موجود است. در تولید این پلاستیک ها از فناوری نانو ذرات استفاده شده است. اکسیژن مسئله سازترین عامل در بسته بندی مواد غذایی است زیرا این عنصر باعث فساد چربی مواد غذایی و همچنین تغییر رنگ آنها می‌شود. در این پلاستیک جدید نانوذرات به صورت زیگزاگ قرار گرفته اند و مانند سدی مانع از نفوذ اکسیژن می‌شوند.

به بیان دیگر مسیری که گاز باید برای ورود به بسته طی کند، طولانی می‌شود. به همین خاطر مواد غذایی در این بسته‌ها تازگی خود را بیشتر حفظ می‌کنند. با طولانی کردن مسیر حرکت مولکول‌های اکسیژن، مواد غذایی دیرتر فاسد می‌شوند.

پژوهشگران روی بطری‌های پلاستیکی برای بسته‌بندی نوشیدنی‌ها در حال تحقیق‌اند. این مواد عمر ماندگاری شش ماهه به نوشیدنی‌ها خواهند داد. با استفاده از نانوآکرها می‌توان پلاستیکی تولید کرد که عمر ماندگاری نوشیدنی‌ها را تا حدود ۱۸ ماه افزایش دهد(٤).

خاویاریک ماده غذایی پرانرژی است که طعم و بویی بسیار خوشایند دارد. به طور عمده پروتئین موجود در خاویار متشکل از اسیدهای آمینه آرژنین، هیستامین، ایزولوسین، لیزین و میتونین است. چربی موجود در خاویار نیز به دو دسته عمده تقسیم می شود که عبارتند از "۲۵ درصد کلسترول " و "۷۵ درصد لستین". مصرف خاویار از ابتلا به بیماری افسردگی و بیماری‌های قلبی عروقی پیشگیری می‌کند؛ چرا که در خاویار غلظت اسیدهای چرب از نوع امگا ۳ بسیار بالاست. بعلاوه خاویار غنی از ترکیبی به نام "ctacosand" است که نوعی الکل چرب با زنجیره بلند است و در بدن به اسیدهای چرب تبدیل می شود. این اسیدهای چرب به دست آمده در سنتز میلین (پوشش سلول عصبی) نقش بسزایی ایفا می کند. به همین دلیل مصرف خاویار در سلامت سلول های عصبی بسیار موثر است. در کشورهایی که ماهی و خاویار در عادات غذایی مردم جایگاه ویژه ای دارد، میزان ابتلا به افسردگی بسیار کمتر از دیگر کشورها است. وجود اسیدهای چرب" امگا ۳ " در خاویار مانع از افزایش کلسترول خون و به دنبال آن باعث پیشگیری از ابتلا به بیماری های قلبی عروقی می شود. بعلاوه مصرف خاویار در پیشگیری از ابتلا به بیماری های آرتریت روماتوئید (التهاب مفاصل)، بیماری های دستگاه گوارش و بعضی از انواع سرطان بسیار موثر است. خاویار از نظر عنصر آهن نیز غنی است و به همین دلیل مصرف آن در افراد مبتلا به کم خونی ناشی از فقر آهن نیز توصیه می‌شود. خاویار، تخم ماهیان خاویاری و از گران ترین غذاهای جهان است. دریای مازندران به عنوان بزرگ ترین منبع ماهیان خاویاری در جهان بیش از ۹۰ درصد خاویار جهان را تأمین می‌کند (همانگونه که در نگاره ۱ مشاهده می‌گردد). فیل ماهی یا بلوگا، تاس ماهی روسی یا چالباش، تاس ماهی ایرانی یا قره برون، ماهی شیب و ماهی ازون برون یا سوروگا، گونه‌های اصلی ماهیان خاویاری دریای خزر هستند (۵).

نگاره ۱ـ استحصال تخم خاویار بلوگا دریای خزر

مواد و روش کار

- باکتری
- محیط **DTB** شرکت مرک
- استاندارد ۰/۵ مک فارلند
- محیط مولر هینتون آگار
- محیط Broth BHI
- محیط کشت sc (سابورو گلوکز آگارحاوی کلرامفنیکل)
- استافیلوکوکوس اورئوس
- اشرشیا کلی
- دستگاه (Spotter Coater)

کلیه مواد کاربردی در این تحقیق دارای درجه خلوص تجزیه‌ای بوده و در تهیه محلول‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شده است).

بررسی میکروبی خاویار

نمونه ای خاویار بسته بندی شده از موسسه تحقیقات شیلات ایران تهیه و از لحاظ بارمیکروبی توسط آزمون شمارش کلی میکروبی مورد بررسی اولیه قرار گرفت. برای آزمایشات میکروبیولوژی هنگام نمونه‌برداری برای از بین بردن آلودگی، ابتدا بسته‌ها با الکل ۷۰ درجه استریل شده و در کنار شعله باز شدند سپس پوشش‌های بسته‌بندی نانونقره جهت انجام آزمایشات میکروبی و شیمی بصورت تجاری از شرکت نانونصب پارس تهیه گردید.

تعداد روزهای گرمخانه‌گذاری و دمای مورد نظر برای تمامی نمونه‌ها یکسان بوده و آزمایش به صورت ۲ بار تکرار انجام شد.

❖ بررسی اثر کیسه‌های حاوی رقت های نانو بر روی قارچ های تلقیح شده در نمونه خاویار

۱-ابتدا کیسه های مورد نظر در اندازه های مساوی ۵×۵ بریده شد و تعداد مورد نیازدر اتوکلاو استریل گردید.

۲-میزان ۱ گرم از نمونه خاویار در داخل کیسه های اتو کلاو شده بسته بندی گردید.

۳-تهیه رقت یک دهم از بسته های مورد نظر بعد از گذشت ٤ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ٤°C (۱ گرم از خاویار موجود در پوشش مربوطه به لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی‌سی آب مقطر استریل اضافه و ورتکس گردید).

٤-میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بدست آمده در محیط کشت sc (سابورو گلوکز آگارحاوی کلرامفنیکل) جهت جداسازی قارچ کشت داده شد.

۵-گرمخانه‌گذاری پلیت های مورد نظر در دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه انجام گردید.

❖ بررسی اثر کیسه‌های حاوی رقت های نانو بر روی باکتری تلقیح شده در نمونه خاویار

۱-ابتدا از پوشش‌های مورد نظر ابعاد مساوی۵ × ۵ بریده و توسط اتوکلاو استریل گردید. برای جلوگیری از چسبیدن پوشش‌های پلاستیکی باید مابین آنها کاغذ صافی قرار داد. تعداد پوشش‌های پلاستیکی نانو شامل ۵ نوع رقت ppm ،٦۰۰۰،۵۰۰۰،٤۰۰۰،۲۰۰۰، ۱۰۰۰ بوده است .

۲-از سوش های باکتریایی مورد نظر، رقت های مختلف مورد استفاده در تحقیق را تهیه کرده که این کار با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند بوده که کدورتی معادل ^{8} ۱۰× ۱/۵ دارد انجام گردید.

۳-در این تحقیق از رقت های ^{8} ۱۰ تا ^{2} ۱۰ استفاده گردید.

٤- از هریک از پوشش های مورد نظر ۷ قطعه بریده شده و به میزان ۵ گرم از نمونه خاویار داخل این پو شش ها قرار داده شد. سپس از۷ رقت تهیه شده مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند به طور جداگانه به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر بر روی نمونه خاویار داخل پوشش ریخته و پو شش مورد نظر را بسته بندی کرد.

۵- پوشش‌های بسته بندی شده در یخچال در دمای ٤°C به مدت ٤۸ ساعت نگهداری گردید.

٦-بعد از ٤٨ ساعت محتویات پوشش‌های بسته بندی شده به داخل لوله‌های آزمایش منتقل گردید . تعداد ٧ عدد لوله مربوط به ٧ پوشش پلاستیکی نانو با محتویات داخل که شامل خاویار و ٧ رقت از باکتری که به طور جداگانه در هر پوشش به نمونه تلقیح گردید، مورد استفاده قرار گرفت و از محتویات این پوشش‌ها سوسپانسیونی با رقت یک دهم تهیه گردید.

٧- ٥٠ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد وبه مدت ٤٨ ساعت در دمای ٣٧° انکوبه گردید (٦).

❖ **بررسی رشد قارچ در پوشش‌های بسته‌بندی**

١- ابتدا کیسه‌های مورد نظر در اندازه‌های مساوی ٥×٥ بریده شد و در اتوکلاو استریل گردیده شد.

٢- میزان ١٠ گرم از نمونه خاویار در داخل کیسه‌های اتو کلاو شده بسته‌بندی گردید.

٣-تهیه رقت یک دهم از بسته‌های مورد نظر بعد از گذشت ٤ روز انکوباسیون در دمای ٤ درجه

بدین صورت که ١ گرم از خاویار موجود در پوشش مربوطه به لوله های آزمایش حاوی ٩ سی سی آب مقطر استریل اضافه و ورتکس گردید.

٤-میزان ١٠٠ میکرولیتر از سوسپانسیون بدست آمده در محیط کشت sc (سابورو گلوکز آگارحاوی کلرامفنیکل) جهت جداسازی قارچ کشت داده شد.

٥-گرمخانه‌گذاری پلیت های مورد نظر در دمای بین ٢٥ تا ٣٠ درجه انجام گردیده و بعد از گذشت ٤ روز قارچ رشد کرده در محیط شناسایی شد که شامل آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم بود. میزان کلنی‌های جدا شده مر بوط به هر پوشش متفاوت بودند. بدین معنی که رشد کلنی در پوشش نانو از ١٠٠٠ تا ٦٠٠٠ کاهش داشته و در پوشش ٦٠٠٠ppm قارچ آسپر ژیلوس فلاووس جدا نشد.

❖ **بررسی مورفولوژی ذرات با میکروسکوپ الکترونی SEM**

به منظور تعیین خصوصیت نانوذرات پلیمری تولیدی و تعیین مورفولوژی و اندازه این ذرات از تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی SEM استفاده گردید.

جهت آماده‌سازی نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی، ابتدا آماده سازی ذرات پوشش‌های بسته‌بندی درصدهای مختلف از طریق تهیه سوسپانسون در حلال استونیتریل درون فالکون‌های آزمایشگاهی انجام گردیده و مقدار ٣ ml از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه Spotter Coater که حاوی گاز آرگون می‌باشد بمنظور تثبیت روکش آب طلا (به روی نمونه های موجود برپایه) انتقال داده تا بعد از ١٠ دقیقه نمونه ها به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM (*scanning electron microscope*) به روی بزرگنمائی ١٠X تصاویر نمونه به روی مانتیور ظاهر گردید (٢).

❖ **بررسی میزان باقی ماندگی نانو ذرات به روش تیتراسیون**

نمونه‌های خاویار بسته بندی شده برای تست ماندگاری با دوزهای ppm ١٠٠٠ و ppm ٢٠٠٠ وppm ٤٠٠٠ وppm ٥٠٠٠ وppm ٦٠٠٠ بعد از انجام تست Shelf Life جهت ارزیابی اندازه گیری میزان نقره باقی مانده در آن نمونه ها به آزمایشگاه شیمی مواد غذائی ارسال گردید.

نمونه سازی

ابتدا نمونه‌ها را وزن کرده و بعد به نسبت وزن برداشته شده از نسبت ١/١ آب و اسید سولفوریک غلیظ برای حل کردن نقره درون خاویار استفاده شد، ظرف محتوی مواد را بسته و مدت ٤٨ ساعت نگه داری شد تا کاملاً نقره موجود آزاد گردد، سپس نمونه را صاف و پخاله‌های خاویار را دور ریخته و محلول صاف شده به حجم ١٠٠cc رسانده شد.

انجام تست نقره

به وسیله دستگاه تیترینو (دستگاه اندازه گیری میزان نقره) میزان نقره موجود اندازه گرفته شد.

ابتدا ۵CC از محلول آماده شده را با مقداری آب مقطر مخلوط، تا جایی که الکترود و لوله ورودی KCL کاملاً درون محلول باشد، دستگاه را روشن کرده، میزان نمونه‌ای را که برداشته و نوع تست که بدست آوردن میزان نقره به PPM می‌باشد را توسط دستگاه تنظیم کرده، دستگاه بعد از واکنش Cl با Ag (تاجاییکه Ag در محیط می‌باشد) نقره موجود را به PPM نشان می‌دهد که برای اطمینان از Curve آن (نمودار نشان دهنده واکنش) میزان KCL مصرف شده را یاد داشت نموده و توسط فرمول $M_1V_1=M_2V_2$ نرمالیته محلول بدست آورده شد(٦).

*نمونه خاویار ۱۰۰۰PPM = باقی مانده نشان داده شده توسط دستگاه به ازای ۱۰۰ گرم محلول۷۰ PPM بود.

باتوجه به فرمول: $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$

میزان نرمالیته نقره موجود در محلول PPM X=۰/۰۰۰٦٤٨

= ۱۰۰۰ gr/L ×۰/۰٦۹۹ gr/mol = ۱۰۸ Mol/L × ۰/۰۰۰٦٤٨

٦۹/۹ mgr/L = ٦۹/۹

بدین ترتیب درصدهای دیگر نیز مورد محاسبه قرار گرفت. در نهایت تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel-2007 و SPSS۲۱ انجام گردیده شد. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف استفاده شد و آزمون کولموگراف- اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها را تایید کرد.

نتایج

نتایج رشد قارچی پلیت‌ها

ـ میزان کلنی‌های جدا شده مر بوط به هر پوشش متفاوت بودند. بدین معنی که رشد کلنی در پوشش نانو از ۱۰۰۰ تا ٦۰۰۰ کاهش داشته و در پوشش ٦۰۰۰ppm قارچ آسپر ژیلوس فلاووس جدا نشد.

و بعد از گذشت ٤ روز قارچ رشد کرده در محیط شناسایی شد که شامل آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم بوده است.

درپوشش های نانو با غلظت ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و٤۰۰۰ رشد قارچ در تمام سطح پلیت مشاهده گردیده شد. در پوشش ۵۰۰۰ کلنی قارچی در۸۰ صد سطخ پلیت مشاهده گردید، در صورتی که در پو شش ٦۰۰۰ کلنی قارچی در ۲۰ در صد سطح پلیت رویت شد(نگاره ۲) .

نگاره ۲: رشد آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم بر روی پوشش‌های بسته‌بندی

جدول ۱: رقت‌های متعدد پوشش‌های بسته بندی در برابر رشد Ecoli

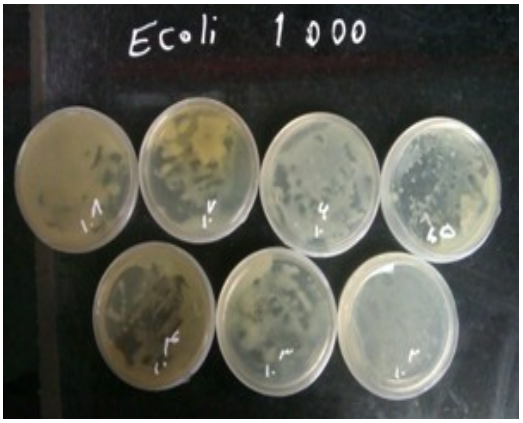
Nano film	۱۰۲	۱۰۳	۱۰٤	۱۰۵	۱۰٦	۱۰۷	۱۰۸
۱۰۰۰	....	....	....	....	....	....	....
۲۰۰۰	۸۸۰	۱۰۵۰	.....	....	....	....	....
۳۰۰۰	٥٦۰	۱۱۰۰	۱۲۸۰	....	....	....	....
٤۰۰۰	۳۲۲	٦۲۸	۸۹۰	....	....	....	....
٥۰۰۰	۱۸۹	۲۹۰	....	....	....	....	....
٦۰۰۰	0	۲۸	۲۸٦	....	....	....	....

تکراردوم:

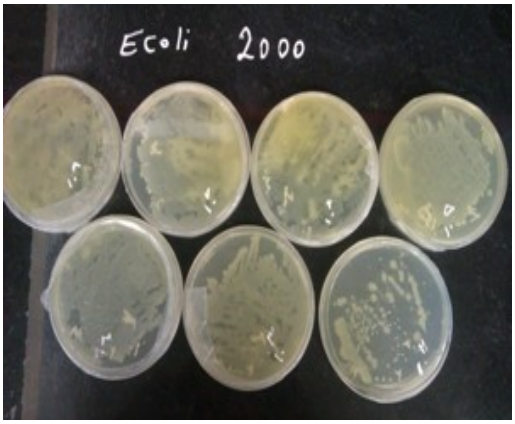
Nano film	۱۰۲	۱۰۳	۱۰٤	۱۰۵	۱۰٦	۱۰۷	۱۰۸
۱۰۰۰	....	....	....	....	....	....	....
۲۰۰۰	۸٦۸	۱۰۱۹	.....	....	....	....	....
۳۰۰۰	٥٥٤	۱۱۲۷	۱۲۸۱	....	....	....	....
٤۰۰۰	۳۲٦	٦۷۷	۸۷۸	....	....	....	....
٥۰۰۰	۱۸۲	۲۹۳	....	....	....	....	....
٦۰۰۰	0	۲۸	۲۸۸	....	....	....	....

نتایج این تحقیق برای بررسی تعداد کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت به صورت کیفی انجام گردید.

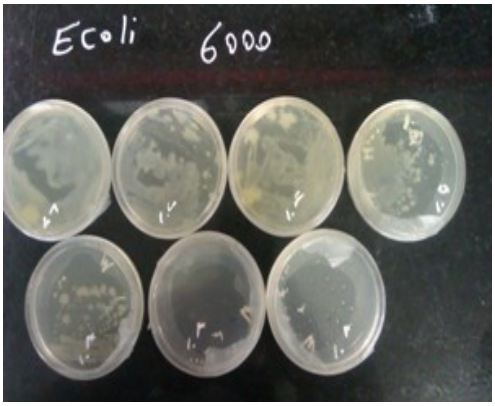
.....= غیرقابل شمارش و عدم رشد =۰



نگاره ۳: رشد باکتری E.coli در پوشش ppm ۱۰۰۰



نگاره ٤: رشد باکتری E.coli در پوشش‌های ppm ۲۰۰۰



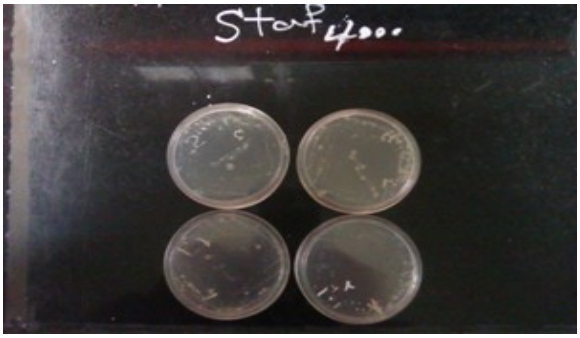
نگاره۵: رشد باکتری E.coli در پوشش های ppm ٦۰۰۰

جدول۲ـ رقت‌های متعدد پوشش‌های بسته‌بندی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس

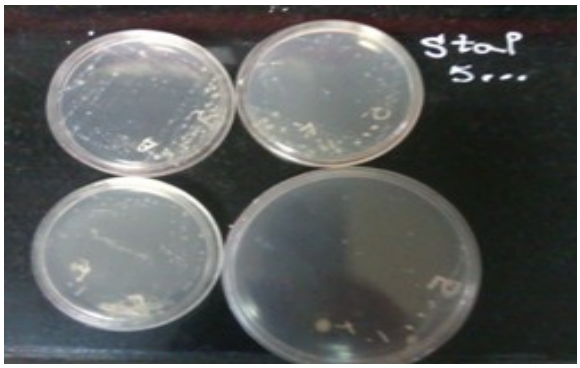
Nano film	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
۱۰۰۰	٤۷۰	٦۲۰	۷۵۰	۱۲۵۰	....	....	....
۲۰۰۰	۳۰۱	۵۰۲	۸۱۰	۹۷٦	.....	....	....
۳۰۰۰	۲۰۳	۳۱۳	۹۷٦	.....	.....	....	....
٤۰۰۰	۳۲۲	۷۰۰	۸۸۰	....	....	....	....
۵۰۰۰	٤۰	۱۷۰	۳۵۰	۵۰۰	....	....	....
٦۰۰۰	۰	۱۵	۱۲۲	۲٦۸	....	....	....

تکراردوم استافیلوکوکوس اورئوس

Nano film	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
۱۰۰۰	٤۷۸	٦۲۵	۷۵۰	۱۲٤۹	....	....	....
۲۰۰۰	۳۰۱	۵۱۰	۸۰۹	۹۷۰	.....	....	....
۳۰۰۰	۲۰۳	۳۲۳	۹۸۲	.....	.....	....	....
٤۰۰۰	۳۲۲	۷۰۸	۸۸٦	....	....	....	....
۵۰۰۰	٤۰	۱۷۳	۳۳۳	۵۱۱	....	....	....
٦۰۰۰	۰	۱٦	۱۰۲	۲٤۸	....	....	....



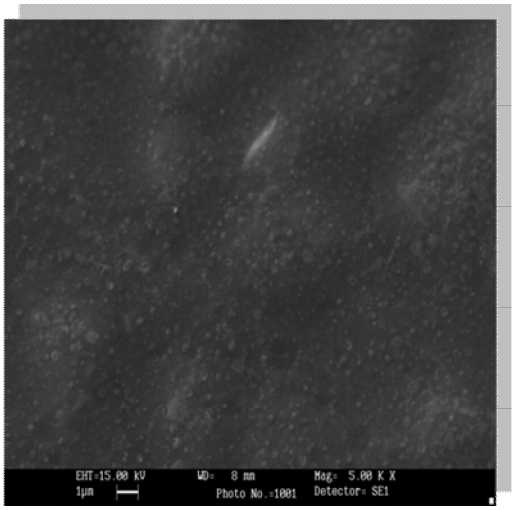
نگاره ٦: رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پوشش‌های ppm ٤۰۰۰



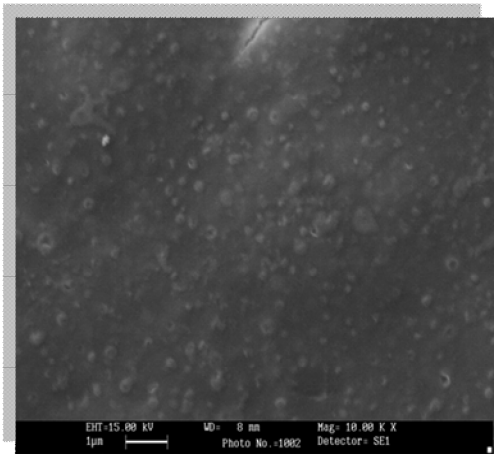
نگاره ۷: رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پوشش‌های ppm ۵۰۰۰

نتایج تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی:

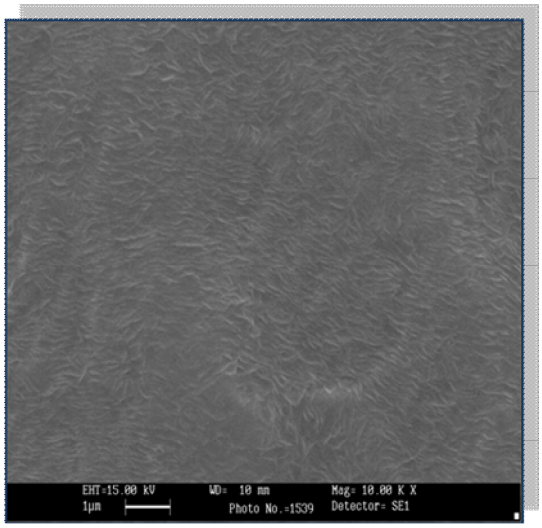
همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌گردد پراکنش ذرات با ۱۵ کیلو ولت و با ۱KX در محدوده مشخص شده معادل ۱- ۱۰ میکرومتر می‌باشد، که بیانگر آنست که متوسط ذرات نانو نقره در پوشش‌های مصرفی ۸۰-۱۲۰ نانومتر می‌باشد، در خصوص انباشتگی‌های تیره رنگ در تصاویر به علت عدم انحلال نمونه‌های پوشش در حلال استونیتریل می‌باشد.



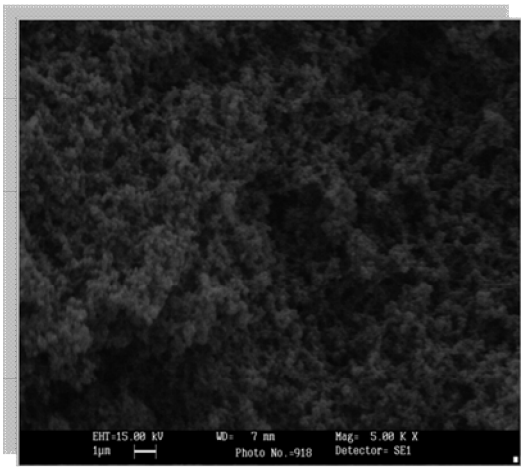
نگاره ۸: بسته بندی ۳درصد با بزرگنمائی KX ۵ با قطر ذرات ۱ میکرومتر



نگاره ۹: تصویرمیکروسکوپ الکترونی پوشش های بسته بندی ۳درصد با بزرگنمائی KX ۱ با قطر ذرات ۱میکرومتر



نگاره ۱۰: تصویرمیکروسکوپ الکترونی پوشش‌های بسته بندی ۳درصد با بزرگنمائی KX ۱۰ با قطرذرات ۱میکرومتر



نگاره ۱۱:تصویرمیکروسکوپ الکترونی پوشش‌های بسته بندی ۵درصد با بزرگنمائی KX ۵ با قطرذرات ۱میکرومتر

همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی۱۲تا ۱۶ مشاهده می‌گردد پراکنش ذرات با ۱۵ کیلو ولت و با ۱KX در محدوده مشخص شده معادل ۱-۱۰ میکرومتر می باشد، که بیانگر آنست که متوسط ذرات نانو نقره در پوشش‌های مصرفی ۲۰-۴۵ نانومتر می‌باشد، در خصوص انباشتگی های تیره رنگ در تصاویر به علت عدم انحلال نمونه‌های پوشش در حلال استونیتریل می‌باشد.

رهایش ذرات به روش تیتراسیون:

نمونه‌های تست شده با فیلم ها فاقد نقره بوده و نشان از عدم آزاد سازی نقره در خاویار دارد.

برطبق وزنی که در ابتدا گرفته شده بود:

خاویار ppm ۱۰۰۰ اسپری شده : ۲۶/۸۴۷gr

خاویار ppm ۲۰۰۰ اسپری شده: ۲۷/۳۹٤gr

خاویار ppm ٤۰۰۰ اسپری شده : ۲٦/۸۹gr

خاویار تست شده توسط فیلمppm ۵۰۰۰ : ۲۸/۸٦۷ gr

خاویار تست شده توسط فیلمppm ٦۰۰۰ : ۲۷/۷۳۸ gr

جدول۳ : میزان رهایش نمونه‌های بسته بندی شده خاویار با درصد های مختلف

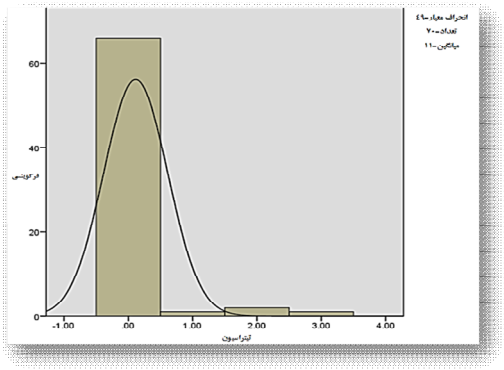
	ppm	Tiring		ppm	Tiring		ppm	Tiring
.۱	۱۰۰۰	۰	.۲۵	۳۰۰۰	۰	.٤۹	۵۰۰۰	۰
.۲	۱۰۰۰	۰	.۲٦	۳۰۰۰	۰	.۵۰	۵۰۰۰	۰
.۳	۱۰۰۰	۰	.۲۷	۳۰۰۰	۰	.۵۱	۵۰۰۰	۰
.٤	۱۰۰۰	۰	.۲۸	۳۰۰۰	۰	.۵۲	۵۰۰۰	۰
.۵	۱۰۰۰	۰	.۲۹	۳۰۰۰	۰	.۵۳	۵۰۰۰	۰
.٦	۱۰۰۰	۰	.۳۰	۳۰۰۰	۰	.۵٤	۵۰۰۰	۰
.۷	۱۰۰۰	۰	.۳۱	۳۰۰۰	۰	.۵۵	۵۰۰۰	۲
۸	۱۰۰۰	۰	.۳۲	۳۰۰۰	۰	.۵٦	۵۰۰۰	۰
.۹	۱۰۰۰	۰	.۳۳	۳۰۰۰	۰	.۵۷	۵۰۰۰	۰
.۱۰	۱۰۰۰	۰	.۳٤	۳۰۰۰	۰	.۵۸	۵۰۰۰	۰
.۱۱	۱۰۰۰	۰	.۳۵	٤۰۰۰	۰	.۵۹	۵۰۰۰	۰
.۱۲	۲۰۰۰	۰	.۳٦	٤۰۰۰	۰	.٦۰	۵۰۰۰	۰
.۱۳	۲۰۰۰	۰	.۳۷	٤۰۰۰	۰	.٦۱	۵۰۰۰	۰
.۱٤	۲۰۰۰	۰	.۳۸	٤۰۰۰	۰	.٦۲	۵۰۰۰	۲
.۱۵	۲۰۰۰	۰	.۳۹	٤۰۰۰	۰	.٦۳	٦۰۰۰	۰
.۱٦	۲۰۰۰	۰	.٤۰	٤۰۰۰	۰	.٦٤	٦۰۰۰	۰
.۱۷	۲۰۰۰	۰	.٤۱	٤۰۰۰	۰	.٦۵	٦۰۰۰	۰
.۱۸	۲۰۰۰	۰	.٤۲	٤۰۰۰	۰	.٦٦	٦۰۰۰	۰
.۱۹	۲۰۰۰	۰	.٤۳	٤۰۰۰	۰	.٦۷	٦۰۰۰	۳
.۲۰	۲۰۰۰	۰	.٤٤	٤۰۰۰	۰	.٦۸	٦۰۰۰	۰
.۲۱	۲۰۰۰	۰	.٤۵	٤۰۰۰	۰	.٦۹	٦۰۰۰	۰
.۲۲	۲۰۰۰	۰	.٤٦	٤۰۰۰	۰	.۷۰	٦۰۰۰	۰
.۲۳	۲۰۰۰	۰	.٤۷	۵۰۰۰	۱			
.۲٤	۳۰۰۰	۰	.٤۸	۵۰۰۰	۰			

در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف تک نمونه‌ای (مطابق جدول۲)، توزیع داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که در این آزمون P<0.05 است می‌توان نتیجه گرفت توزیع داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کند. به منظور مقایسه ذرات به روش Titrino در ٦ گروه مورد مطالعه از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید.

جدول ۲: توزیع نرمال داده‌های آماری

	آزمون کولموگراف اسمیرنوف			شاپیروویلک		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Titrino	./٥٣٤	٧٠	٠٠٠/٠	٢٢٤.	٧٠	٠٠٠/.

a. Lilliefors Significance Correction



نمودار۱: هیستوگرام داده‌های آماری

نتایج آزمون کروسکال والیس همانگونه که در نمودار۱ هم تائید می گردد نشان داد که تفاوت معناداری در رهایش ذرات به روش Titrino در ٦ گروه مورد مطالعه وجود ندارد (p=۰/۱٤۱).

بحث

در برخی مطالعات بیان شده که خواص ضد باکتریایی ناشی از نانو ذرات نقره در باکتری های گرم مثبت و گرم منفی با هم متفاوت است و نفوذ نانوذرات نقره در غشاء باکتری‌های گرم منفی به دلیل داشتن لایه پپتیدوگلیکان نازک تر(۸-۷ نانومتر) نسبت به باکتری‌های گرم مثبت(۸۰-۲۰ نانومتر) بیشتر بوده و در نهایت منجر به مرگ باکتری می شود(۲).

در آزمایشاتی که بر روی سویه های مختلف اشرشیا کلای انجام شد، مشخص گردید که خواص ضد باکتریایی نانوذرات نقره در بین تمامی سویه‌های اشرشیا کلای به طور معنی‌داری متفاوت است. نتایج مطالعات نشان داد تفاوت در ضخامت دیواره پپتیدوگلیکان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نمی‌تواند دلیل اصلی کاهش یا افزایش خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات نقره در باکتری‌ها باشد. در این زمینه عدم وجود رهایش ذرات به ماده غذائی از شاخص‌های اولیه بوده که ایمنی غذا را تضمین می‌نماید در عین حال کوچک بودن نانو ذرات در افزایش زمان ماندگاری به شدت حائز اهمیت می‌باشد و به بیان دیگر تولید ذرات کوچکتر در مقیاس نانومتریک از مهمترین نوآوری های این تکنولوژی در علوم پایه می‌باشد(۳).

در ابتدا تعداد کلنی در رقت‌های مختلف پوشش نانو در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در آنالیز آماری برای تعداد کلنی کدگذاری صورت گرفت (کد صفر: تعداد کلنی ۳۰۰-۳، کد ۱: تعداد کلنی بیش از ۳۰۰). به منظور مقایسه تعداد کلنی در رقت‌های مختلف پوشش نانو در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس ارئوس از آزمون مربع کای استفاده شد.

تفاوت معناداری در تعداد کلنی پوشش نانو ۱۰۰۰ تا ٦۰۰۰در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس ارئوس وجود ندارد

(۰/۱٤۲)=P. لذا در گروه های مختلف با ذرات مختلف پوشش نانو، نوع باکتری بر تعداد کلنی تاثیر معناداری ندارد به عبارت دیگر در هر رقت پوشش نانو هیچ ارتباطی بین نوع باکتری و تعداد کلنی وجود ندارد ولی در مقایسه تعداد کلنی در رقت های مختلف پوشش نانو، تفاوت به شد معنا داری بین پوشش های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ٤۰۰۰ با ۵۰۰۰ وجود دارد (۰/۰۳۱) =P و به عبارتی بهتر با افزایش رقت پوشش نانو تعداد کلنی باکتری کاهش معناداری یافته است.

در تحقیق انجام شده سال ۱۳۸۹ سلطانی وهمکاران (۱) زمان ماندگاری قزل آلای رنگین کمان با کاربری فیلم هائی با سایز ذرات متوسط ٤۰ نانومتر تغییر محسوسی نداشته برخلاف فیلم های نانوppm ۵۰۰۰ که در این تحقیق ماندگاری را با ارزش معنی داری افزایش داده است این در حالی است که فیلم های وارداتی دارای ماندگاری بسیار محسوس تر بوده اند(۱).

نانو ذرات نقره به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا و بالا بودن تعداد زیادی از اتم های فلز در واحد سطح، تماس بهتری با میکروارگانیسم‌ها داشته و ویژگی‌های ضد میکروبی منحصر به فردی را نسبت به فلز نقره در ابعاد بزرگتر نشان می دهند(۱).

از آنجایی که اکثر روشهای نگهداری معمول مواد غذایی در مورد غذاهای تازه و آماده مصرف قابل کاربرد نیست. برای نگهداری این قبیل محصولات از بسته بندی های ضد میکروب استفاده می شود. این بسته بندی ها نوعی بسته بندی فعال بوده که حاوی ترکیبات ضد میکروبی می باشد. به دلیل افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها به آنتی بیوتیک ها، دانشمندان به دنبال یافتن ترکیبات جایگزین برای آنتی بیوتیک ها هستند. نانو ذرات فلزی مانند طلا،نقره و مس از این دسته مواد می‌باشند. نقره به دلیل واکنش با گروه تیول آنزیم های میکروارگانیسم ها باعث دناتوزه شدن آنزیم و در نهایت مرگ سلولی می شود. بسته بندی های حاوی نانو ذرات نقره با آزاد سازی یون های نقره باعث کاهش، جلوگیری و یا به تاخیر انداختن رشد میکروبها و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت محصول غذایی می شود. این ترکیبات در ساختار پدهای جاذب و یا در ترکیب با پلیمرهای پلی اتیلن، پلی پروپیلن، پلی استایرن به کار می رود.

خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره برای گروه‌های مختلف باکتریایی مورد مطالعه متفاوت و منحصر به فرد است. از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که بار الکتریکی منفی سطح باکتری‌ها موجب جذب شدن نانو ذرات نقره به خود می‌شود. بنابراین احتمالا وجود اختلاف بار الکتریکی سطحی بین باکتری‌های گوناگون می‌تواند موجب اختلاف در میزان جذب نانو ذرات نقره به خود و در نهایت موجب تفاوت در خاصیت ضد باکتریایی نانو نقره علیه سوش‌های مختلف باکتریایی شود(٦).

عوامل مختلفی بر عملکرد میکروبیولوژی لفاف مورد نظر تاثیر می گذارد این لفاف از آلژینات سدیم به عنوان پایهٔ اصلی و نانو سیلور به عنوان آنتی باکتریال تشکیل شده است آلژینات سدیم خود به تنهایی دارای خاصیت آنتی باکتریالی می‌باشد، یکی از مکانیسم‌های آن با پارگی لیپو پلی ساکارید غشای بیرونی باکتری های گرم منفی می‌باشد، این عملکرد آن همانند یک بازدارنده و مانع در برابر انتقال اکسیژن است. مکانیسم دیگر واکنش با گروهی آنیونی بر روی سطح سلول به دلیل ماهیت پلی کاتیونی‌اش می‌باشد که باعث تشکیل یک لایهٔ غیر قابل نفوذ در اطراف سلول می‌شوند و از انتقال حلال‌های اصلی و مهار RNA و تولید پروتئین از طریق نفوذ به هستهٔ سلولی جلوگیری می‌کند و در کنار این پلی ساکارید از نانو سیلور به عنوان آنتی باکتریال استفاده شد محلول نانو سیلور از یون نقره در اندازه ppm٤۰۰۰ نانو متر تشکیل شده بود که در دزهای ۱ ،۳ ، ۵ درصد به فیلم آلژینات سدیم اضافه شد با هم جواری نقره موجود در فیلم با دگرگون ساختن میکروارگانیسم به وسیله تبدیل پیوند های SH ـــ به Sag ـــ دراین مکانیسم ذرات نانوسیلور فلزی به مرور زمان یونهای نقره از خود پراکنده می‌کنند. این یونها طی واکنش جانشینی، باندهای -SHرا در

جداره میکروارگانیسم به باندهای SAg- تبدیل می‌کنند، که نتیجه‌ای واکنش تلف شدن میکروارگانیسم است بنابراین می‌توان گفت به وسیله این مکانیسم‌های شرح داده شده از رشد باکتری‌ها جلوگیری کردند، تغییرات در مجموع باکتری‌های مزوفیل و باکتری‌های سرمادوست مورد آزمایش قرار گرفت کیفیت اولیه ماهیان به کار رفته در مطالعه خوب بود زیرا شمارش باکتریایی کل تعداد کمی را نشان داد با پیشرفت روند آزمایش تعداد و شمارش باکتری‌ها رو به افزایش بود و این روند در ماهی‌های فاقد لفاف سرعت خیلی بیشتری داشت(۱).

با توجه به اینکه خاویار خاصیت فسادپذیری بالایی دارد، می‌توان از نانو حسگرهایی که به رهایش مواد شیمیایی ناشی از فساد غذاها و تغییرات شیمیایی و میکروبی حساس هستند در بسته‌بندی‌های هوشمند استفاده کرد، تا به محض شروع خراب شدن غذا، با تغییر رنگ بسته‌بندی، مصرف‌کننده را از تغییرات ماده غذایی درون بسته‌بندی مطلع کند. این سیستم به مراتب دقیق‌تر و مطمئن‌تر از فروش با تاریخ مصرف است. بنابراین در آینده نزدیک کارخانه‌ها از درج تاریخ تولید و انقضا بر روی بسته‌بندی‌ها بی‌نیاز شده و یک شاخص بسیار دقیق از آخرین وضعیت فساد ماده غذایی در داخل بسته‌بندی برای مصرف کننده وجود خواهد داشت. به عنوان مثال بر روی بسته‌بندی جمله‌ای را خطاب به مصرف‌کننده خواهید دید که: «مصرف کننده محترم رنگ بسته‌بندی این محصول در زمان مصرف باید به رنگ سفید باشد در صورت تغییر رنگ به رنگ قرمز از مصرف آن خودداری کنید.» بنابراین فساد ماده غذایی در هرمرحله‌ای از آن مشخص می‌شود، از طرفی تحقیقات مختلف بازاریابی نشان داده‌اند که طراحی بسته‌بندی، جزء مؤثرترین ابزار بازاریابی برای فروش است. محرک و عامل نهایی موفقیّت، طراحی بسته‌بندی است. برخی بسته‌بندی‌ها، به‌ویژه برای محصولات غذایی طوری طراحی می‌شوند که برای سبک زندگی و نگرانی‌های اجتماعی و بهداشتی مصرف‌کننده جذاب باشند. با توجه به اینکه در فرآیند تولید پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر از درجه حرارت‌های بالا استفاده می‌شود، در نتیجه عملیات اکسید شدن رنگ قهوه‌ای نامطلوبی ایجاد می‌شود، که می‌توان با یافتن راهکارهایی به ارتقای خصوصیات بازاریابی این پوشش‌ها دست یافت.

استفاده از پوشش‌های بسته‌بندی نانو به شرط عدم رهایش ذرات به درون محصول و عدم تغییر در بافت اولیه محصول قطعا به عنوان یکی از راهکارهای اصلی در افزایش زمان lag phase و تعویق فساد می باشد و جای آن دارد که استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی و گیاهی نیز بصورت ترکیبی همراه این لفاف ها مورد پایش قرار بگیرد.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از شرکت نانو نصب پارس که از این طرح حمایت نموده و امکان استفاده از انواع پوشش های بسته‌بندی نانو را در اختیار قرار دادند، علی الخصوص جناب آقای مهندس جعفر رحمان نیا و نیز باشگاه پژوهشگران جوان واحد علوم و تحقیقات تهران کمال سپاس و امتنان را داریم.

فهرست منابع

۱. سلطانی، م.، اهری، ح.، عطایی، م. (۱۳۸۹): اثر ممانعت کنندگی ذرات نانونقره بر برخی از باکتری های بیماری زای ماهی: استرپتوکوکوس اینیایی: لاکتوکوکوس گارویه، یرسینیا راکری و آئروموناس هایدروفیلا. مجله طب دامی ایران (مجله بین المللی تحقیقات دامپزشکی). ۵۱(۱):۲۹-۴۸.

2. Cozzolino, C.A, Nilsson, F. (2013): Exploiting the nano-sized features controlled-Release packaging. Colloids Surf B Biointerfaces. 110: 208-16.

3. Hyeon, D.J., Kim, T.H. (2013): Effect of nano-silica filler on the uniform packaging of white light emitting diodes. J. Nanosci. Nanotechnol. 13: 5976-81.

4. Lin, Q.B. Zhong, Zhao, Q., Xiao. D.H. (2014): Migration of Ti from nano-tio(2)-polyethylene composite packaging into food simulants. Food Addit Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 31: 1284-90.

5. Martinez-Abad, A. (2014): Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (Evoh) films for food-packaging applications. J. Agric. Food Chem. 60:5350-9.

6. Ramos, M. Peltzer. (2014): Development of novel nano-biocomposite antioxidant flms based on poly (Lactic Acid) and thymol for active packaging. Food Che. 162: 149-55.