

بررسی خواص فیزیکی و ضد میکروبی فیلم‌های نانویو کامپوزیت امولسیون بر پایه کربوکسی متیل سلولز - نانو نقره

شفق کریمی¹، بابک قنبرزاده^{2*}، خالد عرب³

- 1- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
- 2- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
- 3- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

در این پژوهش، فیلم‌های امولسیونی بر پایه کربوکسی متیل سلولز (CMC) به روش قالب ریزی، تهیه شد و اثرات نانو ذرات نقره، بر روی خواص فیزیکی و ضد میکروبی آنها مورد بررسی قرار گرفت. حلالیت در آب و میزان جذب رطوبت فیلم‌ها با افزایش غلظت نانو ذرات در سه سطح 0/5%، 1% و 2% کاهش یافت. به منظور بررسی خواص مکانیکی از آزمون کشش استفاده شد و نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانو ذرات از صفر به 2%، استحکام کشش نهایی (UTS) به ترتیب از 102/4 MPa به 90MPa کاهش و کرنش تا نقطه شکست از 58/36% به 64/51% افزایش یافت. حضور 1 این نانو ذرات در ساختار بیوپلیمر، شفافیت و روشنایی فیلم‌ها را کاهش داده و میزان تیره‌گی و زردی آنها افزایش یافت. جهت بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی فیلم‌های حاوی 0/5% نانو نقره، آزمون شمارش میکروبی به روش کشت در پلیت انجام شد. این نانوذرات فعالیت ضد میکروبی قوی در برابر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (اشرشیا کلای) نشان دادند. به طوریکه بعد از 24 ساعت، 57% از تعداد باکتری‌های اشرشیا کلای و 33/33% از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کردند.

واژه‌های کلیدی: فیلم نانویو کامپوزیت، نانو نقره، کربوکسی متیل سلولز، ویژگی ضد میکروبی

*مسئول مکاتبات: chia.arab@yahoo.com

1- مقدمه

در سالهای اخیر استفاده از پلیمرهای سنتزی و پلاستیکی به عنوان اجزای پایه بسته بندی های مواد غذایی به طور پیوسته رو به افزایش بوده است که دلیل آن فراوانی و در دسترس بودن، شکل پذیری بالا و قیمت پایین این مواد می باشد. ولی با وجود این مزیت ها، بسته بندی های پلاستیکی دارای معایب متعددی هستند از جمله زیست تخریب پذیری پایین، ایجاد آلودگی - های محیطی و خصوصیات بازدارندگی و مکانیکی ضعیف برخی از پلیمرها [9]. گسترش دانش تولید، اصلاح و کاربرد بیوپلیمرهایی که منشأ کشاورزی داشته و از منابع حیوانی و گیاهی به دست می آیند، راهکاری امید بخش برای کاهش تولید و مصرف پلیمرهای نفتی می باشد [15]. این بیوپلیمرها طی فرایند کمپوست به محصولات طبیعی مانند دی اکسید کربن، آب، متان و توده زیستی تبدیل می شوند و در چهار دسته پروتئین ها، پلی ساکاریدها، پلی استرها و لیپیدها (به صورت پلیمریزه شده تقسیم بندی می شوند [21]. پلی - ساکاریدهای خطی آنیونی مشتق شده از سلولز مانند کربوکسی متیل سلولز¹ (CMC)، توانایی تشکیل فیلم هایی شفاف با خصوصیات بازدارندگی و مکانیکی نسبتاً خوب را دارند [3 و 14]. استفاده از مواد زیست فعال مانند مواد ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در ساختار پلیمرهای سنتزی و طبیعی می تواند کارایی آنها را در افزایش ماندگاری مواد غذایی افزایش دهد که به این نوع بسته بندی، بسته بندی های فعال² گفته می شود [7]. طیف وسیعی از مواد ضد میکروبی می توانند به طور بالقوه در بسته بندی های فعال مورد استفاده قرار بگیرند که برخی از آنها شامل نانو ذرات نقره، اکسید روی، کیتین و دی اکسید تیتانیم می باشند. نانو ذرات نقره بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها اعم از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، جلبک ها و قارچ ها اثر کشندگی دارند. هر چند که باکتری های گرم منفی نسبت به باکتری های گرم

مثبت در مقابل یون های نقره حساس تر هستند و دلیل آن وجود لایه ضخیم پیتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری - های گرم مثبت است [22]. ویژگی های فیزیکی نانو مواد مثل اندازه، شکل، خصوصیات سطحی و ترکیب شیمیایی آنها می - تواند نقش مهمی در اثرات ضد میکروبی داشته باشد. مورا و همکاران (2012) گزارش کردند که فیلم های هیدروکسی - پروپیل متیل سلولز حاوی نانو ذرات نقره با اندازه 41 نانومتر دارای خواص مکانیکی، بازدارندگی و ضد میکروبی بهتری نسبت به فیلم های حاوی ذرات با اندازه 100 نانومتر هستند. از آنجائیکه فیلم های کربوهیدراتی می توانند حامل های مناسبی برای نانو ذرات نقره باشند [18]. در سالهای اخیر این نانو ذرات در فیلم های بیوپلیمری به طور وسیعی مورد استفاده قرار گرفته اند. برای مثال متیل سلولز - نقره [12]، پولولان - نانو نقره [20]، سلولز - نقره [11]، هیدروکسی پروپیل متیل - نانو نقره [13] و آگار - نانو ذرات نقره [18]. همچنین به صورت نمک های نقره یا نقره فلزی در پلیمرهای سنتزی نظیر، پلی پروپیلن، پلی - استایرن و نایلون نیز به کار گرفته شده است [20]. با توجه به پژوهش های صورت گرفته در چند سال اخیر، استفاده از اسید اولئیک جهت تولید فیلم های امولسیون و استفاده از نانو ذرات مختلف در فیلم های CMC از جمله راهکارهای انجام شده جهت بهبود خواص مختلف این فیلم ها بوده است. اما در مورد استفاده هم زمان این دو عامل گزارشی صورت نگرفته است. از این جهت توسعه یک فیلم امولسیون نانو کامپوزیت زیست تخریب پذیر نوین جهت بسته بندی مواد غذایی با استفاده از نانو ذرات نقره از جمله اهداف این پژوهش به شمار می رود. در این تحقیق غلظت های مختلف نانو ذرات نقره به فیلم های امولسیون بر پایه CMC اضافه شد و خواص ضد میکروبی این نانو ذرات در غلظت 0/5% بر روی دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و گرم منفی اشرشیا کلای و خواص فیزیکی، مکانیکی و رنگی فیلم ها مورد بررسی قرار گرفت.

1-Carboxymethylcellulose

2-Active Packaging

2-2-4- آزمون میزان حلالیت در آب

حلالیت در آب عبارت است از درصد ماده خشک فیلم که پس از 24 ساعت غوطه‌وری در آب مقطر، به حالت محلول در می‌آید [5]. ابتدا نمونه‌هایی به ابعاد 20×20 میلی متر تهیه نموده، سپس برای رسیدن به وزن خشک اولیه، به مدت 24 ساعت در آن 105 درجه سانتیگراد قرار گرفتند. وزن خشک اولیه نمونه‌ها را تعیین کرده و بعد هر قطعه از آنها را در داخل ظرف درب دار حاوی 50 میلی لیتر آب مقطر غوطه‌ور شده و در حالی که به صورت مقطعی هم زده می‌شوند، در دمای 23 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت قرار گرفتند. سپس فیلم‌ها از داخل آب خارج و دوباره به مدت 24 ساعت در آن 105 درجه سانتیگراد قرار داده تا به وزن ثابت برسند. با توزین مجدد نمونه‌ها، وزن خشک نهایی به دست می‌آید. درصد کل ماده محلول (TSM%) از رابطه زیر به دست می‌آید.

$$100 \times \text{وزن خشک اولیه} / [\text{وزن خشک نهایی} - \text{وزن خشک اولیه}] = \text{TSM} \%$$

2-2-5- اندازه گیری میزان جذب رطوبت

برای انجام این آزمون ابتدا نمونه‌هایی به ابعاد 20×20 میلی متر تهیه شدند و در دسیکاتور حاوی سولفات کلسیم (RH=0%) به مدت 24 ساعت قرار گرفت تا عمل مشروط سازی صورت بگیرد. پس از توزین اولیه نمونه‌ها، آنها را به دسیکاتور حاوی محلول اشباع نیتريت کلسیم (RH=55%) منتقل کرده و در دمای 20-25 درجه سانتیگراد قرار گرفتند [1]. سپس وزن نمونه‌ها در زمان‌های مختلف تا رسیدن به وزن ثابت، اندازه‌گیری شده و میزان جذب رطوبت (WU%) از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{WU} (\%) = \frac{M - M_0}{M_0} \times 100$$

WU%: میزان جذب رطوبت، M_0 : وزن اولیه نمونه
M: وزن نمونه پس از زمان t در رطوبت 55%

2-2-6- اندازه‌گیری خواص مکانیکی

استحکام کششی نهایی⁵ (UTS) و کرنش تا نقطه شکست⁶ (SB) فیلم‌ها با استفاده از دستگاه آزمون مکانیکی Zwich/Roell مدل FR010 (ساخت کشور آلمان) واقع در پژوهشکده مواد پلیمری دانشکده صنعتی سهند طبق استاندارد ASTM D882-91 [2] اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه‌ها به مدت 24 ساعت در رطوبت نسبی 55% واجد شرایط شدند و سپس هر کدام از فیلم‌ها به شکل دمبلی با ابعاد 6 × 0/5 سانتیمتر بریده شد و در بین دو فک دستگاه قرار گرفتند. فاصله اولیه بین دو فک 50 میلی‌متر و سرعت حرکت فک بالایی 5 mm/min⁸ تعیین و داده‌ها توسط کامپیوتر ثبت گردید.

2-2-7- اندازه گیری خواص رنگی

رنگ نمونه‌ها توسط دستگاه هانتر لب (واقع شده در آزمایشگاه بیوفیزیک و مهندسی ساختمان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان رنگ، با استفاده از پارامترهای هانتر بر حسب روشنایی (L)، قرمز و سبزی (a)، زردی-آبی (b) بیان گردید [4]. محور L که شامل دو رنگ مکمل سیاه و سفید بوده و رنگ خاکستری در بین آنها می‌باشد. در بالای این محور رنگ سفید خالص با نمرة 100 و در پایین آن رنگ سیاه خالص با نمرة صفر نشان داده می‌شود. محور a که در انتهای سمت راست آن رنگ قرمز خالص با نمرة 100+ و در انتهای سمت چپ آن رنگ سبز با نمرة 100- قرار دارد. محور b که شامل رنگ‌های زرد و آبی بوده و رنگ زرد با نمرة 100+ و رنگ آبی با نمرة 100- در دو انتهای آن نشان داده می‌شود. همچنین اختلاف رنگ کلی⁷ (ΔE) و اندیس زردی⁸ (YI) نیز به ترتیب از طریق رابطه‌های 4 و 5 محاسبه شدند. داده‌ها در طی پنج اندازه‌گیری از نقاط

5- Ultimate tensile strength

6- Strain to break

7- Total color difference

8- Yellowness index

3- Total soluble matter

4- Water uptake

سرولوژی (85/0%) تا 7-10 تهیه شد و در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شده، و پس از انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت تعداد کلنی‌های رشد کرده شمارش شدند. به منظور تعیین میزان بازدارندگی از رشد میکروب‌ها توسط نانویو کامپوزیت بعد از 24 ساعت، از هر کدام از لوله‌های حاوی فیلم و باکتری تلقیح شده، سری‌های رقت تهیه شدند تا با کشت در پلیت و شمارش سلول‌ها، تعداد میکروب‌های رشد کرده در هر یک از لوله‌ها را مشخص و با نمونه شاهد (باکتری و محیط کشت بدون فیلم) مقایسه شود. درصد کاهش سلول طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$1 - \text{درصد کاهش سلول} = \frac{\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right)_{\text{تعداد سلول در نمونه}}}{\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}}\right)_{\text{تعداد سلول در نمونه شاهد}}} \times 100$$

2-3- تحلیل آماری

همه آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ONE WAY ANOVA) از نرم افزار آماری SPSS 19 در سطح احتمال 5% ($P < 0/05$) و آزمون چند دامنه‌ای توکی (Tukey) برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

4- نتایج و بحث

3-1- حلالیت در آب

شکل 1 حلالیت در آب نانویو کامپوزیت امولسیون‌ی بر پایه CMC، حاوی نسبت‌های مختلف نانو نقره را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت نانو ذرات نقره، حلالیت در آب فیلم‌ها کاهش پیدا می‌کند اگرچه این کاهش غیر معنی دار است ($P < 0/5$). درصد کل ماده‌ی محلول (TSM) در فیلم‌های امولسیون شده شاهد 22% بود، که در فیلم‌های حاوی 0/5، 1 و 2% نانو ذرات نقره به ترتیب به 21/83، 20/45 و 20/24% کاهش پیدا نمود. در توضیح این کاهش می‌توان گفت که نانو ذرات نقره از یک طرف می‌تواند فضاهای خالی بین زنجیری را پر کند و نفوذ آب را کاهش دهند و از طرف دیگر با ایجاد برهمکنش‌های

مختلف فیلم‌ها (یکی در مرکز و چهار عدد در پیرامون) بدست آمد و از آنها میانگین گرفته شد.

(رابطه 4)

$$\Delta E = [(L_{\text{standard}} - L_{\text{sample}})^2 + (a_{\text{standard}} - a_{\text{sample}})^2 + (b_{\text{standard}} - b_{\text{sample}})^2]^{0.5}$$

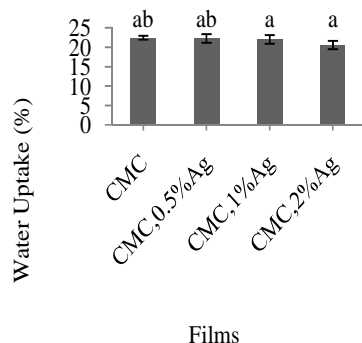
(رابطه 5)

$$YI = 142.86 \frac{b}{L}$$

2-2-8- بررسی خواص ضد میکروبی فیلم‌ها

به منظور بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی فیلم‌های نانویو کامپوزیت CMC حاوی نانو ذرات نقره، از آزمون شمارش میکروبی به روش کشت در پلیت استفاده شد [16]. بدین منظور فیلم‌هایی به ابعاد 4x4 سانتی متر بریده شدند و از دو سویه باکتری گرم منفی، اشرشیاکلی (ATCC10536) و گرم مثبت، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)، استفاده شد. از محیط کشت نوترینت برات به منظور رشد باکتری و رسیدن به مقدار لازم استفاده گردید. به میزان 8 گرم از این محیط کشت در 1 لیتر آب مقطر حل کرده و آن را حرارت داده تا زمانی که رنگ محیط شفاف شود. سپس برای استریل کردن محیط کشت، در اتوکلاو در دمای 121 سانتیگراد به مدت 15 دقیقه قرار گرفت. بعد از استریل کردن آن را تا دمای اتاق خنک کرده، 100 میلی‌لیتر از محیط کشت را در داخل ارلن ریخته و یک لوپ از کلنی خالص باکتری مورد نظر در داخل آن تلقیح نموده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد، گرماخانه گذاری شد. به تعداد فیلم‌های مورد آزمایش 20 میلی‌لیتر از محیط کشت مایع را در داخل لوله‌های آزمایش ریخته و قطعات فیلم‌های بریده شده در داخل لوله‌ها گذاشته شد. به هر کدام از این لوله‌ها 100 میکرو لیتر از باکتری آماده شده را تلقیح و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد، گرماخانه گذاری شد. به منظور تعیین غلظت اولیه باکتری در 100 میکرو لیتر باکتری تلقیح شده، از این مقدار لوله‌های رقت توسط محلول نمکی

زنجیرهای داخل شبکه بیوپلیمر را قوی تر می کند. این امر باعث می شود، خصوصیات بازدارندگی ماتریس بیوپلیمر در مقابل ملکول های آب بیشتر شود. در مطالعاتی که ویمالا و همکاران (2010) در مورد فیلم های کیتوزان حاوی نانو ذرات نقره انجام دادند، عنوان کردند، اضافه کردن این نانو ذرات ظرفیت جذب آب فیلم ها را کاهش می دهد. آنها دلیل این امر را احتمالاً ایجاد اتصالات نانو ذرات نقره با اتم های N و O گروه های آمینی و اتری موجود در شبکه زنجیری کیتوزان، بیان کردند. همچنین مورا و همکاران (2012) گزارش کردند، نانو ذرات نقره با قرار گرفتن در منافذ و فضاهای خالی، فضای بین ملکولی را کاهش داده و میزان نفوذ رطوبت را در فیلم های هیدروکسی پروپیل متیل سلولز کاهش می دهد.



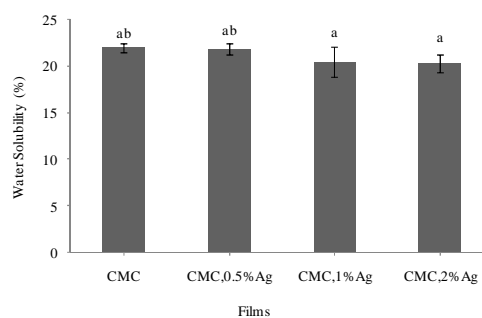
شکل 2- تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره بر میزان

جذب رطوبت فیلم های نانویو کامپوزیت بر پایه CMC (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در آزمون توکی ($P < 5\%$) می باشند).

3-3- خواص مکانیکی

خواص مکانیکی پلیمرها از نظر حفظ یکپارچگی فیلم طی شکل دادن و کار با آن مهم است. نتایج حاصل از آزمون کشش بر روی فیلم های امولسیون بر پایه CMC دارای سطوح مختلف نانو ذرات نقره در شکل 3 گزارش شده است. میزان استحکام کششی نهایی (UTS) برای فیلم شاهد برابر با 102/4 MPa بود که در ابتدا با اضافه کردن 0/5% نانو نقره، UTS به 110/78 MPa افزایش پیدا کرد و تفاوت معنی داری

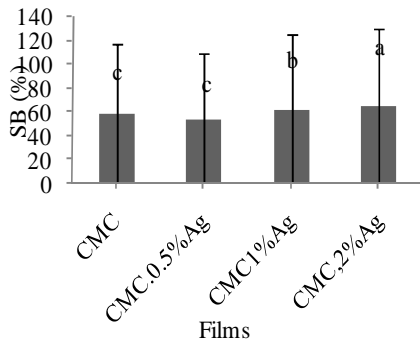
الکترواستاتیکی ما بین زنجیرهای CMC باعث ایجاد ساختاری محکم در ماتریس بیوپلیمر شوند. نتایج مشابهی در مورد تأثیرات نانو ذرات نقره بر روی حلالیت فیلم های CMC امولسیونی گزارش نشده است. اما در تحقیقی که رحیم و همکاران (2006) در مورد نانویو کامپوزیت های کیتوزان حاوی نانو ذرات نقره انجام دادند، گزارش کردند، حضور نانو ذرات نقره تأثیری بر ویژگی حلالیت در آب فیلم ها ندارد که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت دارد.



شکل 1- تأثیر مقادیر مختلف نانو ذرات نقره بر حلالیت در آب فیلم های نانویو کامپوزیت بر پایه CMC (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در آزمون توکی ($P < 5\%$) می باشند).

3-2- میزان جذب رطوبت

همانطوری که مشاهده می شود با افزایش غلظت نانو ذرات نقره در فیلم های امولسیونی CMC، میزان جذب رطوبت فیلم ها کاهش پیدا می کند (شکل 2). مقدار جذب رطوبت در نمونه شاهد 22/41% بود که با افزوده شدن 0/5% و 1% نانو ذرات نقره، به ترتیب به 22/27% و 22% کاهش غیر معنی داری پیدا کرد. بیشترین کاهش میزان جذب رطوبت در غلظت 2% نانو ذره نقره مشاهده شد که برابر با 20/55% بود. اما این میزان کاهش مابین غلظت های مختلف نانو نقره و نمونه شاهد معنی دار نبود ($P < 5\%$). این نانو ذرات دارای یونهایی با بار مثبت بوده و از طریق پیوندهای الکترواستاتیکی با گروههای کربوکسیل CMC، اتصالات عرضی را افزایش داده و انسجام



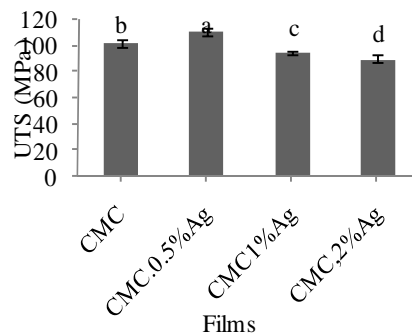
شکل 3- اثر نانو ذرات نقره بر استحکام کششی نهایی (UTS) و کرنش تا نقطه شکست (SB) نانویو کامپوزیت‌های بر پایه CMC (حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در آزمون توکی ($P < 0.05$) می‌باشند).

گوتام و رام (2010) [6] گزارش کردند که نانو ذرات نقره در غلظت‌های پایین ($p < 0.05$) با قرار گرفتن در بین زنجیرهای پلی و نیل الکل و ایجاد پیوندهای واندروالسی، تحرک زنجیر-های پلیمری را کاهش داده و مقاومت مکانیکی فیلم‌ها را افزایش دادند. در حالی که در غلظت‌های 1% و بیشتر کاهش مقاومت مکانیکی را مشاهده کردند. همچنین در پژوهش انجام گرفته توسط رحیم و همکاران (2013) افزایش معنی‌دار مقاومت مکانیکی و افزایش غیرمعنی‌دار کرنش با افزایش غلظت نانو ذرات نقره مشاهده شد.

3-4- رنگ سنجی

ویژگی‌های ظاهری فیلم‌های پلاستیکی از پارامترهای مهم در ارزیابی و مصرف آنها به شمار می‌رود. در جدول 1 پارامترهای رنگی هانتر (L, a و b)، اختلاف رنگ کلی (ΔE) و اندیس زردی (YI) فیلم‌های امولسیون‌ی بر پایه CMC حاوی نانو ذرات نقره ارائه شده است. طبق نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت نانو نقره اندیس L فیلم‌ها که معیاری از روشنایی می‌باشد، در غلظت‌های 0/5% و 1% فیلم‌های حاوی نانو ذره تفاوت معنی‌داری ($P < 0.05$) با نمونه شاهد نداشتند. اما در غلظت 2%، اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) مشاهده شد.

($P < 0.05$) با نمونه شاهد نشان داد. در ادامه با افزایش غلظت نانو ذرات نقره به 1 و 2%، UTS به ترتیب به 94/69 MPa و 90MPa کاهش پیدا کرد. همچنین کرنش تا نقطه شکست (SB) که نشان دهنده انعطاف پذیری فیلم می‌باشد، برای نمونه شاهد برابر با 58/36% بود که ابتدا با اضافه کردن 0/5% نانو نقره، به 54/8% کاهش پیدا کرد. با اضافه کردن 1% و 2% از نانو ذرات نقره، SB نمونه‌ها به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) به ترتیب به 62/58 و 64/51% افزایش پیدا کردند. مکانیسم‌های مختلفی برای افزایش UTS توسط نانو نقره می‌توان پیشنهاد کرد که شامل برقراری پیوندهای مختلف بین نانو نقره و پلیمر و در نتیجه کاهش تحرک زنجیرها، پر کردن فضاهای خالی بین زنجیری، افزایش نواحی بلوری در بستر پلیمری و بالا بودن استحکام خود نانو ذرات که جایگزین بخشی از پلیمر می‌شوند. در غلظت‌های بالای نانو ذرات، امکان تجمع آنها و در نتیجه کاهش سطح تماس نانو ذره و بستر پلیمری وجود دارد که موجب کاهش استحکام می‌گردد ولی ممکن است بر میزان کرنش اثر افزایش دهنده یا کاهش دهنده داشته باشد. در صورتی که نانو ذرات موجب افزایش فضاهای خالی شوند ممکن است SB افزایش یابد و در صورتی که موجب ایجاد ساختار نامنظم و نقاط ضعف در بخشی از ساختار شود SB نیز کاهش می‌یابد که در اینجا به نظر می‌رسد حالت اول رخ داده است [4].



ویژگی های رنگی فیلم ها، اختلاف رنگ کلی (ΔE) است. که میزان اختلاف رنگ نمونه ها با نمونه استاندارد را نشان می دهد و معیاری برای سنجش میزان شفافیت فیلم ها است. هر چه ΔE یک نمونه کمتر باشد، نشان می دهد که آن فیلم کمتر دچار تغییر ظاهری شده است و پارامترهای رنگی آن به پارامترهای رنگی نمونه شاهد نزدیک تر است. مطابق داده های بدست آمده، ΔE فیلم ها با افزایش غلظت نانو ذرات نقره افزایش معنی داری ($P < 0.05$) پیدا کرد. این اختلاف معنی دار در بین تمامی غلظت های نانو ذرات نقره مشاهده شد. میزان ΔE از 3/06 برای نمونه شاهد به 6/68 برای نمونه حاوی 2% نانو نقره افزایش پیدا کرد. این مسئله نشان از تغییر شفافیت و ظاهر فیلم ها در غلظت های بالا است.

به طوریکه اندیس L از 69/5 برای نمونه شاهد به 66 برای نمونه حاوی 2% نانو نقره کاهش پیدا کرد. به عبارتی با افزایش میزان نانو ذرات نقره، از شفافیت و روشنایی فیلم ها کاسته شد. همچنین اندیس b که معیار زردی فیلم ها می باشد، با افزایش غلظت نانو ذرات افزایش پیدا کرد. اندیس b فیلم ها از 12/6 برای نمونه شاهد به 13، 14/8 و 16/6 برای فیلم های حاوی 0/5%، 1% و 2% نانو ذرات نقره رسید. با بررسی این سه پارامتر رنگی مشخص شد، با افزایش مقدار نانو ذرات نقره میزان شفافیت، روشنایی و قرمزی کاهش پیدا کرده، در صورتی بر میزان زردی نمونه ها افزوده شده است. ایجاد لایه بین سطحی بین نانو ذرات و پلیمر، ساختار فشرده خود نانو ذرات و اثر بر آرایش ساختار در پلیمر می تواند در کاهش شدت شفافیت پلیمر موثر باشد. یکی دیگر از پارامترهای مورد توجه در

جدول 1- پارامترهای رنگی فیلم های نانو کامپوزیتی CMC حاوی سطوح مختلف نانو ذرات نقره*

نوع فیلم	L	a	b	ΔE	YI
CMC	69/5±1/8 ^a	-15/1±0/01 ^a	12/6±1/15 ^a	3/06±0/01 ^a	28/57±0/01 ^a
CMC, %0.5Ag	68/3±1/37 ^{a,b}	-15/4±1 ^{a,b}	13±0/001 ^a	3/58±0/01 ^b	28/66±0/01 ^b
CMC, %1Ag	67/8±0/01 ^{a,b}	-16/5±1 ^{b,c}	14/8±0/57 ^b	4/58±0/01 ^c	31/18±0/01 ^c
CMC, %2Ag	66/1±1 ^b	-17/4±1 ^c	16/6±1/15 ^c	6/68±0/01 ^d	35/39±0/01 ^d

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار در آزمون توکی ($P < 5\%$) می باشند.

اضافه کردن 2% نانو نقره این مقدار به 35/39 افزایش پیدا کرد. نتایج بدست آمده در این آزمون با پژوهش های انجام گرفته توسط رحیم و همکاران (2013) کاملاً مطابقت دارد. آنها گزارش کردند، اندیس L فیلم ها با افزایش غلظت نانو ذرات نقره در فیلم های نانویوکامپوزیت آگار کاهش یافته، همچنین اندیس های a و b فیلم ها و میزان ΔE به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است.

از جمله پارامترهای توصیفی دیگر اندیس زردی (YI) می باشد که با امولسیون کردن فیلم ها و افزودن اسید اولئیک بر میزان زردی فیلم ها افزوده می شود [4]. از طرفی دیگر هنگامی که نانو ذرات نقره در ساختار پلیمر افزوده می شود، از شفافیت فیلم ها کاسته شده و خود باعث تشدید رنگ زرد فیلم ها می گردد. به همین دلیل طبق نتایج بدست آمده با افزایش غلظت نانو ذرات YI فیلم ها هم به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش پیدا نمود. به طوریکه YI فیلم شاهد 28/57 بود که با

3-5- آزمون میکروبی

تعداد کلنی‌های رشد کرده باکتری اشرشیا کلای در فیلم شاهد، پس از 24 ساعت به $3/3 \times 10^8$ CFU/ml افزایش پیدا کرد که هیچگونه بازدارندگی در مقابل باکتری نشان نداد، اما در فیلم‌های حاوی 0/5% نانو نقره به $1/4 \times 10^8$ CFU/ml کاهش پیدا کرد (شکل 4 و جدول 2). چنانچه در شکل 5 مشاهده می‌شود، تعداد اولیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در 100 میکرولیتر سوسپانسیون تلقیح شده، برابر با CFU/ml 1×10^8 بود. پس از 24 ساعت تلقیح در محیط کشت حاوی فیلم‌ها، برای شمارش تعداد کلنی سری‌های رقت تهیه شد، و پس از کشت در پلیت این مقدار باکتری در نمونه شاهد، به $1/2 \times 10^8$ CFU/ml افزایش پیدا کرد و هیچ گونه بازدارندگی نشان نداد، اما در مقابل فیلم‌های حاوی 0/5% نانو نقره، تعداد کلنی‌ها را به $0/8 \times 10^8$ CFU/ml کاهش داد. اثرات ضد میکروبی نانو نقره به سه عامل مختلف نسبت داده می‌شود: یون‌های Ag^+ آزاد شده، خود نانو ذرات (با اتصال و نفوذ) و گونه اکسیژن فعال ROS^9 تولید شده توسط نانو ذرات نقره (عامل تنش اکسیداتیو). نانو ذرات نقره با اکسید کردن اتم اکسیژن، یون‌های اکسیژن تولید کرده و این یون‌ها با هیدرولیز کردن ملکول‌های آب، رادیکال‌های OH^+ ایجاد می‌کنند. که هر یک از این مواد از بنیان‌های فعال و از عوامل ضد میکروبی قوی به شمار می‌روند [22]. با کاهش اندازه ذرات انرژی واکنش پذیری و توان آنها برای تولید ROS

افزایش می‌یابد [10]. همچنین مکانیسم‌های دیگری نیز مطرح شده‌اند از جمله:

تخریب دیواره پلی ساکاریدی و غشای پلاسمایی و در نتیجه اختلال در کنترل انتقال مواد ضروری سلول؛

اتصال به آنزیم‌های تنفسی موجود در غشای لیپوپلی- ساکاریدی؛

نفوذ به داخل سلول و آسیب زدن به DNA و در نتیجه عدم همانند سازی؛

نفوذ به داخل سلول و تداخل در عمل ریبوزوم ها و در نتیجه اختلال در تولید آنزیم‌های چرخه انرژی.

باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیا کلای در مقابل نانو ذرات نقره مقاومت بیشتری نشان داد، این موضوع به دلیل تفاوت در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت لایه پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر بوده، همین موضوع موجب افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر نفوذ نانو ذرات می‌شود. همچنین وجود لیپوپلی ساکارید غشای خارجی در باکتری‌های گرم منفی موجب اتصال نانو ذرات به غشای سلولی می‌شود، در حالی که این لایه در باکتری‌های گرم مثبت وجود ندارد و از عوامل دیگر مقاومت این باکتری‌ها می‌باشد. مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققان در مورد اثرات ضد میکروبی نانو ذرات نقره بر روی دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلای گواهی بر این موضوع است [11، 12، 16 و 19].

جدول 2- میزان بازدارندگی فیلم نانویو کامپوزیت CMC حاوی 0/5% نانو نقره

فیلم	E.Coli (CFU/ml)	کاهش تعداد باکتری (%)	S.aureus (CFU/ml)	کاهش تعداد باکتری (%)
CMC	$3/3 \times 10^8$	-	$1/2 \times 10^8$	-
CMC, % 0.5Ag	$1/4 \times 10^8$	57	$0/8 \times 10^8$	33/33

3. Choi, Y. and Simonsen, J. 2006. Cellulose nanocrystal-filled carboxymethyl cellulose nanocomposites. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(3): 633-639.
4. Ghanbarzadeh, B. and Almasi, H. 2011. Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48: 44-49.
5. Gontard, N., Duchez, C., Cuq, B. and Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *Food Science and Technology*, 29: 39-50.
6. Gautam, A. and Ram, S. 2010. Preparation and thermomechanical properties of Ag-PVA nanocomposite films. *Materials Chemistry and Physics*, 119: 266-271.
7. Henriette, M. de Azeredo. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42:1240-1253.
8. Jiang, Y., Chai, Z. and Leng, X. 2010. Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 5100- 5108.
9. Kirwan, M. and Strawbridge, J. 2003. Plastics in food packaging. *Food Packaging Technology*, 174-240.
10. Liya, G., Weiyong, Y., Zhisong, L. and Chang Ming, L. 2013. Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1-15.
11. Li, S. H., Jia, N., Ma, M. and Sun, R. 2011. Cellulose-silver nanocomposites: microwaveassisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property. *Carbohydrate Polymers*, 86: 441-447.
12. Maity, D., Mollick, M., Mondal, D. and Bhowmick, B. 2012. Synthesis of methylcellulose-silver nanocomposite and investigation of mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*, 90:1818- 1825.



(الف) (ب)

شکل 4- میزان رشد باکتری *E.Coli* بعد از 24 ساعت در

فیلم شاهد (الف) و فیلم حاوی 0/5% نانو نقره (ب)



(ج) (د)

شکل 5- میزان رشد باکتری *S.aureus* بعد از 24 ساعت در

فیلم شاهد (ج) و فیلم حاوی 0/5% نانو نقره (د)

5- نتیجه گیری

اضافه کردن نانو ذرات نقره به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در ساختار فیلم های امولسیون بر پایه CMC نه تنها موجب اثرات ضد باکتریایی شد بلکه در غلظت بهینه ($p < 1\%$)، خواص مکانیکی و تا حدودی بازدارندگی در برابر رطوبت را نیز بهبود داد. بنابراین در فیلم های امولسیون نیز نانو نقره می تواند تاثیرات فیزیکی مفیدی داشته باشد البته غلظت های بالا می تواند موجب تضعیف خواص مکانیکی و رنگی فیلم ها شود.

6- منابع

1. Angles, M.N. and Dufrense, A. 2000. Plastized starch/tunicin whiskers nanocomposites structural analysis. *Macromolecules*, 33:8344-8353.
2. ASTM D882-91. 1996. Annual Book of ASTM, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

- Ricardo, J. B., Almeida, A., Susana, C.M., Carmen, S.R., Armando, J.D., Neto, C.P. and Trindade, T. 2013. Antifungal activity of transparent nanocomposite thin films of pullulan and silver against *Aspergillus niger*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103: 1143-148.
20. Sinha Ray, S. and Bousmina, M. 2005. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in greening the 21st century materials world. *Progress in Material Science*, 50: 962-1079.
21. Timothy, V. 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363: 1-24.
22. Vimalaa, K., Murali, Mohana, Y. and Samba Sivudua, K. 2010. Fabrication of poruse chitosan films impregnated with silver nanoparticles: A facial approach for superior antibacterial application, *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 76: 248-258.
13. Moura, M., Mattoso, L. and Zucolotto, V. 2012. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of Food Engineering*, 109: 520-524.
14. Park, H.J., Weller, C.L., Vergano, P.J. and Testin, R.F. 1993. Permibeability and mechanical properties of cellulose based edible films. *Journal of Food Science*, 58(6): 1361-1364.
15. Park, S. K., Hettiarachchy, N. S. and Were, L. 2000. Degradation behavior of soy protein-wheat gluten films in simulated soil conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 3027-3031.
16. Rangelova, N., Aleksandrov, L., Angelova, T., Georgieva, N. and Müller, R. 2014. Preparation and characterization of SiO/CMC/Ag hybrids with antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 101: 1166-1175.
17. Rhim, J.W., Hong, S.I., Park, H.M. and Perry, K. W. N. 2006. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54: 5814-5822.
18. Rhim, J.W., Wang, L.F. and Hong, S.I. 2013. Preparation and characterization of agar/silver nano particlescomposite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33: 327-335.
19. Ricardo, J. B., Susana, C.M., Carmen, S.R., Sadocco, P., Causio, J., Neto, C.P. and Trindade, T. 2012. Antibacterial activity of optically transparent nanocomposite films based on chitosan or its derivatives and silver nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 348: 77-83.