

## اثر نانوذرات رس بر خواص ساختاری و حرارتی فیلم‌های نانوبیوپلیمری بر پایه کفیران

فرامرز خدائیان<sup>۱\*</sup>، سهیلا اسمی<sup>۲</sup>، سید سعید حسینی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۱۱)

### چکیده

کفیران یک اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های دانک کفیر بوده که دارای خواص سلامت بخشی مختلفی است. در این پژوهش، خصوصیات فیزیکومکانیکی و حرارتی فیلم‌های نانوکامپوزیتی تولید شده از کفیران- مونت موریلونیت (۰.۱، ۳ و ۵ درصد وزنی/وزنی مونت موریلونیت) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش نانورس سبب افزایش ضخامت و مقاومت کششی فیلم‌ها می‌شود اما تاثیر آن بر کشش در نقطه شکست، دمای انتقال شیشه‌ای و دمای ذوب در غلظت‌های مختلف متفاوت است به طوری که تا غلظت ۳ درصد سبب افزایش فاکتورهای مذکور و در غلظت‌های بالاتر (۵ درصد) کاهش آنها را به دنبال دارد. تجزیه و تحلیل الگوی پراش اشعه ایکس نشان داد که یک ساختار متورق در اثر اضافه کردن مونت موریلونیت به ماتریکس کفیران ایجاد می‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی و نتایج توپوگرافی سطحی به ترتیب نشان دهنده توزیع مناسب نانوذرات مونت موریلونیت در ساختار فیلم‌های بیونانوکامپوزیتی و افزایش قابل توجه پارامترهای زبری در اثر افزودن نانورس به ماتریکس کفیران می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: فیلم نانوکامپوزیت، کفیران، پراش پرتو ایکس، توپوگرافی سطحی

### مقدمه

در سال‌های اخیر، به منظور استفاده از روش‌های نوین برای حفاظت از مواد غذایی در برابر شرایط مختلف محیطی و مکانیکی تلاش‌های گسترده‌ای صورت گرفته است. در قرن گذشته، استفاده از پلاستیک‌ها و پلیمرهای سنتزی برای بسته‌بندی مواد غذایی رشد قابل توجهی داشته است، اما استفاده از این مواد تجزیه‌ناپذیر سبب ایجاد مشکلات اساسی برای محیط زیست می‌شود (Ghasemlou et al., 2011). از طرف دیگر، به علت محدود بودن نفت و منابع نفتی (به عنوان ماده اولیه تولید بسته‌های مواد غذایی) استفاده از مواد و پلیمرهای زیستی در بسته‌بندی مواد غذایی امری ضروری به نظر می‌رسد (Debeaufort et al., 1998).

به تازگی مطالعات فراوانی روی فیلم‌های زیست تخریب پذیر به دلیل مزایای بالقوه آنها از لحاظ زیست محیطی و هزینه تولید صورت گرفته است (Khanzadi et al., 2015). ترکیبات این فیلم‌ها می‌توانند به سه دسته هیدروکلئیدی، لیپیدی و مرکب یا مخلوط تقسیم‌بندی شوند (Fabra et al., 2008). هیدروکلئیدها شامل پروتئین و پلی ساکاریدهایی چون

نشاسته، آلژینات، مشتقات سلولز، کیتوزان و آگار می‌باشند. از لیپیدهای پرکاربرد در تولید فیلم‌های خوراکی می‌توان به واکس‌ها و اسیدهای چرب اشاره کرد. فیلم‌های مرکب نیز شامل مخلوطی از ترکیبات هیدروکلئیدی و لیپیدی می‌باشند. انتخاب نوع ترکیب برای تولید فیلم تا حدود زیادی بستگی به عملکرد مد نظر دارد (Kokoszka et al., 2010).

دانه کفیر که بعنوان استارتر برای تولید کفیر استفاده می‌شود، یک توده‌ی ژلاتینی نامنظم حاوی پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و میکروارگانیسم‌های تخمیر کننده (لاکتیک اسید باکتری‌ها، استیک اسید باکتری‌ها و مخمرها) می‌باشد (Piermaria et al., 2009). اگزوپلی ساکارید بدست آمده از فلور میکروبی کفیر را کفیران گویند. کفیران یک هتروپلی ساکارید شامل گلوکز و گالاکتوز به نسبت یک به یک است (Kooiman, 1999; Micheli et al., 1968) که اخیراً مطالعات نشان داده می‌توان آن را با بازده بالا از دانه کفیر (پس از پروتئین زدایی) استخراج کرد (Rimada & Abraham, 2001). کفیران نسبت به سایر پلی ساکاریدها دارای چندین مزیت مهم از قبیل خصوصیات ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد توموری می‌باشد (Maeda et al., 2004). بنابراین این اگزوپلی ساکارید می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای بسته‌بندی‌های سنتزی در صنعت غذا مطرح باشد (Ghasemlou et al., 2011).

استفاده قرار گرفت. برای تولید دانه کفیر، استراتر در شیر کم چرب حاوی ۱/۵ درصد چربی در دمای اتاق کشت و نگهداری شد. شیر به طور روزانه تا حصول مقدار مورد نیاز تعویض گردید.

#### جداسازی و خالص‌سازی کفیران

کفیران از دانه کفیر، با استفاده از روش *Piermaria et al.* (2009) با کمی تغییر استخراج شد. به طور خلاصه، وزن مشخصی از دانه کفیر در آب جوش با نسبت ۱ به ۱۰۰، روی همزن مغناطیسی به بهم زده شد. مخلوط حاصل در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در دور  $10000 \times g$  سانتریفیوژ گردید و سپس به منظور رسوب پلی‌ساکارید، اتانول سرد با نسبت ۱ به ۱ به آن اضافه شده و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. رسوب حاصل با استفاده از سانتریفیوژ در دور  $10000 \times g$  دمای ۴- درجه سلسیوس و مدت زمان ۲۰ دقیقه جدا گردید. رسوب بدست آمده دوباره در آب داغ حل و سپس رسوب داده شد، این فرایند به منظور خالص‌سازی بیشتر دو بار تکرار گردید. سپس رسوب خالص‌سازی شده به منظور اطمینان از عدم حضور قند و پروتئین به ترتیب با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC, model 1200, Agilent, USA) و روش فنل‌سولفوریک اسید تست گردید (*Dubois et al.*, 1956).

#### تولید فیلم و نانوکامپوزیت بر پایه کفیران

محلول آبی حاوی ۲ درصد حجمی/وزنی کفیران تحت شرایط همزدن با همزن مغناطیسی در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تولید شد. سپس نرم کننده گلیسرول در غلظت ۳۵ درصد نسبت به کل ماده جامد به محلول فوق اضافه گردید و مجدداً در همان دما و به مدت ۱۵ دقیقه عمل اختلاط صورت گرفت. بعد از هواگیری در آن تحت خلا محلول‌ها در پلیت‌های تفلونی ریخته شده و به منظور تشکیل فیلم به مدت ۳۶ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. فیلم‌های حاصل بعنوان نمونه شاهد در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (*Ghasemlou et al.*, 2011).

برای تهیه نانو بیوپلیمر، مقدار تعیین شده از نانوذره Cloisite 30B (Southern clay products, Texas, USA) دارای چگالی ۱/۹۸ گرم بر میلی‌لیتر و متوسط اندازه ذرات ۱۳ میکرون در حلال (آب) ریخته شده و به مدت ۱۲ ساعت با همزن مغناطیسی بهم زده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تحت فرایند التراسونیک در فرکانس ۳۵ کیلو هرتز و توان ۱۰۰ وات قرار گرفت. در ادامه این دو محلول (کفیران- مونت موریلونیت) به نسبت‌های مختلف

به طور کلی فیلم‌های بسته‌بندی زیست تخریب‌پذیر نسبت به فیلم‌های بسته‌بندی سنتزی آبدوست‌تر و خواص مکانیکی ضعیفتری دارند که این ویژگی‌ها سبب کاهش کاربرد آن در بسته‌بندی مواد غذایی شده است (*Debeaufort et al.*, 1998). نرم کننده‌ها (Plasticizers) در فیلم‌های بسته‌بندی به وفور استفاده می‌شوند. این مواد سبب کاهش نیروهای بین ملکولی، افزایش تحرک زنجیره‌های پلیمر و کاهش دمای انتقال شیشه‌ای ( $T_g$ ) می‌گردند (*Gontard et al.*, 1993). همچنین این ترکیبات با تغییر شبکه سه بعدی زنجیره‌ها باعث افزایش انعطاف پذیری و کشش پذیری و کاهش پیوستگی الاستیسیته و مقاومت مکانیکی می‌شوند (*Chen*, 1995). گلیسرول از جمله نرم کننده‌های پرکاربرد در تولید فیلم‌های زیستی است. خصوصیات مانند نقطه جوش بالا، محلولیت در آب، غیر قطبی و غیر فرار بودن این نرم کننده، سبب تبدیل گلیسرول به یک نرم کننده بسیار مناسب در مقایسه با سایر نرم کننده‌های محلول در آب شده است (*Cheng et al.*, 2006).

نانوکامپوزیت‌ها یکی از گزینه‌های امیدوارکننده در بهبود خواص حرارتی، مکانیکی و ممانعت‌کنندگی فیلم‌های تولید شده از بیوپلیمرهای زیست تخریب‌پذیر می‌باشند. اختلاط فیبرهای طبیعی یا مصنوعی با پلیمرها در تولید نانوکامپوزیت می‌تواند سبب بهبود بسیاری از خصوصیات پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر شود (*Cyras et al.*, 2008). لذا، نانوذرات مونت موریلونیت که رس در مقیاس نانو می‌باشند به دلیل ارزان و در دسترس بودن بسیار مورد توجه هستند (*Almasi et al.*, 2010). این نانوذرات اگر به صورت متورق (Exfoliation) و کاملاً پراکنده در ماتریکس پلیمر قرار گیرند می‌توانند سبب بهبود بسیاری از خواص فیلم‌های زیستی شوند (*Rhim et al.*, 2005; *Zheng et al.*, 2002).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای روی نانوکامپوزیت‌های مونت موریلونیت- پلیمر زیستی صورت گرفته است (*Wakai & Almenar*, 2015) اما در سال‌های اخیر استفاده از بیوپلیمرهای میکروبی (به دلیل خصوصیات منحصر به فرد) در این نانوکامپوزیت‌ها بسیار مورد توجه بوده است (*Ghasemlou et al.*, 2011). لذا هدف از این تحقیق، تولید و مطالعه خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و حرارتی فیلم‌های نانوکامپوزیتی کفیران مونت موریلونیت می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت استراتر

دانه کفیر از بانک سلولی و میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه شد و بعنوان استراتر مورد

یک ظرف آلومینیومی خالی به عنوان مرجع استفاده شد. سپس نمونه‌ها با نرخ ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه در معرض سیکل گرمایش/سرمایش بین دماهای ۵۰- تا ۲۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. از روی ترموگرام حاصل، دمای انتقال شیشه‌ای ( $T_g$ ) و دمای ذوب ( $T_m$ ) تعیین گردید.

**مطالعه ریزساختار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM)**  
به منظور بررسی نحوه توزیع نانوذرات در داخل و سطح فیلم از یک میکروسکوپ الکترونی (Oxford Instruments INCA Penta FET×X3) استفاده شد. برای تهیه تصاویر میکروسکوپی از سطح فیلم‌ها، آنها را به کمک چسب دوطرفه روی پایه‌های آلومینیومی چسباندیم. برای تصویر برداری از مقطع عرضی، نمونه‌ها پس از شکستن شدن در ازت مایع، از سمت مقابل قسمت شکسته شده روی پایه‌های آلومینیومی نصب شدند. سپس پایه‌های آلومینیومی با دستگاه پوشش دهنده BAL-TEC SCD 005 (Baltec AG, Balzers, Liechtenstein) به مدت ۵ دقیقه با طلا پوشش داده شدند. با یک میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی‌های متفاوت، از نمونه‌ها تصویر برداری شد.

#### آزمون میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

برای مطالعه نمای سطحی (morphology) فیلم‌های مشروط شده در رطوبت نسبی ۵۰ درصد از یک میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM; Dualscope/Rasterscope C26, DME, Denmark) استفاده شد. نمونه‌های فیلم به قطعات کوچک مناسب برای تصویربرداری AFM بریده شده و با نوار چسب دوطرفه بر روی پایه متصل شدند. سپس برای هر نمونه نتایج به تصاویر ۳D مبدل گردید (برای قابل مقایسه کردن نتایج، تمام تصاویر از ناحیه مرکزی هر سطح بدست آمد) (Fabra et al., 2009). از نرم افزار SPM برای محاسبه ارزش زبری فیلم‌ها استفاده شد. پارامترهای مختلفی از زبری با استفاده از AFM قابل اندازه‌گیری است، که به برخی از این پارامترها در تحقیق حاضر پرداخته شده است.

$S_a$ ،  $S_q$  و  $S_{dq}$  به ترتیب زبری متوسط تمامی سطح مورد بررسی، ریشه مربع میانگین (RMS) زبری و شیب ریشه مربع میانگین (RMS gradient) زبری (شیب تمامی نقاط به استثنای نقاط موجود در لبه) بوده که با توجه به معادلات ۱ تا ۳ محاسبه شدند:

$$S_a = \iint_a |Z(x,y)|. dx. dy \quad (\text{رابطه ۱})$$

۱۰۰:۰، ۹۹:۱، ۹۷:۳ و ۹۵:۵ درصد وزنی/وزنی نسبت به کفیران خشک با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱ ساعت با همزن مغناطیسی بهم زده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مانند قبل بعد از هواگیری در آن تحت خلا روی پلیت‌های تفلونی قرار گرفته و در دمای محیط خشک شدند (Zolfi et al., 2014b).

#### ضخامت

ضخامت فیلم‌ها به وسیله یک میکرومتر دیجیتال دستی (Mitutoyo No. 293-766, Tokyo, Japan) با دقت ۰/۰۰۱ میلی‌متر، در حداقل ۶ نقطه تصادفی برای هر فیلم اندازه‌گیری شد.

#### خواص مکانیکی فیلم

خواص مکانیکی فیلم‌ها با استفاده از یک دستگاه تستومتریک (Testometric Co., Ltd., Rochdale, Lancs., England) و روش استاندارد ASTM-D ۸۸۲ اندازه‌گیری شد (ASTM, 2001). ابتدا فیلم‌ها در ابعاد ۱۰×۱ سانتی‌متر مربع بریده شده و در دسیکاتور تحت متعادل سازی رطوبت (Conditioning) (رطوبت ۵۰ درصد، دمای ۲۵ درجه سلسیوس زمان برابر با ۴۸ ساعت) قرار گرفتند. فاصله بین دو فک دستگاه ۵۰ میلی‌متر و سرعت حرکت فک‌ها ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه انتخاب شد. فاکتورهایی شامل مقاومت کششی و کشش در نقطه شکست (تغییر طول نمونه تقسیم بر طول اولیه ضرب در ۱۰۰)، با استفاده از روش استاندارد ASTM-D ۸۸۲ از روی منحنی‌های نیرو بر حسب تغییر شکل محاسبه گردید.

#### پراش پرتو ایکس (XRD)

آنالیز پراش پرتو ایکس روی نانوذرات و نمونه‌های کامپوزیت حاوی مقادیر مختلف از نانوذرات صورت گرفت. در این آزمایش از دستگاه پراش سنج (X'Pert MPD (Philips Co., Holland) به منظور انجام آزمایش‌ها و ثبت داده‌ها استفاده گردید (Zolfi et al., 2014a). الگوی پراش پرتو ایکس با ولتاژ شتاب دهنده ۴۰ کیلوولت و شدت جریان ۳۰ میلی‌آمپر با استفاده از تابش CuKα انجام پذیرفت. منحنی پراش در محدوده زوایای پراش (۲θ)، تا ۲۰ درجه با سرعت ۱ درجه بر دقیقه و گام ۰/۰۲ حاصل گردید.

#### اندازه‌گیری خصوصیات حرارتی فیلم‌ها

خصوصیات حرارتی فیلم‌ها با استفاده از یک دستگاه کالریمتری روبشی افتراقی (DSC) (Mettler Toledo, DSC1 Star System) ارزیابی شد (Ghasemlou et al., 2011). ۱۰ میلی‌گرم نمونه فیلم بریده شده و در داخل ظرف دستگاه قرار داده شد (از

افزودن نانوذرات افزایش یافته بطوری که در غلظت ۵ درصد نانورس به ۸/۷۱ مگاپاسکال می‌رسد. افزایش مقاومت کششی را می‌توان به مقاومت اعمال شده توسط خود نانوذرات رس، جهت‌گیری، نسبت ابعادی بالا (Aspect Ratio) و گستردگی سطح نانورس (Cyras *et al.*, 2008) و همچنین پراکنش یکنواخت نانوذرات در بستر پلیمری نسبت داد (Sothornvit *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). این نتایج مشابه گزارشات (2009) Bae *et al.* می‌باشد. این محققین نشان دادند که با افزودن ۵ درصد نانورس به فیلم ژلاتینی ماهی، مقاومت کششی این فیلم از ۳۰/۳۱ به ۴۰/۷۱ مگاپاسکال افزایش می‌یابد. البته باید توجه داشت که با هر مقدار افزایش در غلظت نانورس مقاومت کششی افزایش نمی‌یابد، زیرا درصد بالای نانوذرات امکان تورق (Exfoliation) آنها را در فیلم نانوکامپوزیت کاهش می‌دهد. از سوی دیگر در زمان بالا بودن غلظت نانوذرات قدرت جذب آنها نسبت بهم زیاد شده و کلوخه‌ای شدن را به دنبال دارد (Xu *et al.*, 2006).

کشش در نقطه شکست فیلم کفیران در حدود ۸۱/۳۶ درصد بوده که این مقدار با افزودن نانورس تا غلظت ۳ درصد افزایش می‌یابد (جدول ۱). افزودن نانورس در غلظت‌های بالاتر از ۳ درصد (۵ درصد) سبب کاهش در میزان افزایش طول شده است، که این نشان می‌دهد نانورس در ماتریس فیلم کفیران به عنوان یک استحکام بخش مکانیکی عمل کرده و در غلظت‌های بالا باعث کاهش انعطاف‌پذیری شده است (Almasi *et al.*, 2010). این نتایج مشابه گزارشات Bae *et al.* (2009) می‌باشد. این محققین بیان داشتند که درصد افزایش طول در فیلم ژلاتینی با افزودن نانورس تا غلظت ۱ درصد، افزایش یافته و سپس کاهش می‌یابد. این تفاوت در غلظتی از نانورس که سبب کاهش درصد ازدیاد طول می‌شود (بین فیلم‌های بر پایه کفیران و ژلاتین)، احتمالاً به دلیل تفاوت در مواد پایه تشکیل دهنده فیلم‌ها می‌باشد.

جدول ۱. اثر نانوذرات رس بر خواص مکانیکی فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر پایه کفیران

نمونه	مقاومت کششی (مگاپاسکال)	افزایش طول (درصد)
کفیران	۴/۸۸ ± ۰/۶۷ <sup>c</sup>	۸۱/۳۶ ± ۱/۲۰ <sup>c</sup>
کفیران+۱درصد نانورس	۵/۹۸ ± ۰/۷۶ <sup>c</sup>	۸۳/۷۷ ± ۰/۷۴ <sup>b</sup>
کفیران+۳درصد نانورس	۷/۴۰ ± ۰/۱۶۵ <sup>b</sup>	۸۷/۰۱ ± ۱/۳۹ <sup>a</sup>
کفیران+۵درصد نانورس	۸/۷۱ ± ۰/۴۹ <sup>a</sup>	۸۲/۵۷ ± ۰/۹۵ <sup>b,c</sup>

\* در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

$$Sq = \sqrt{\iint_a |Z(x,y)|^2 dx dy} \quad (\text{رابطه ۲})$$

$$Sdq = \sqrt{(1/A \int_0^x \int_0^y ((\delta Z(x,y)/\delta x)^2 + (\delta Z(x,y)/\delta y)^2) dx dy)} \quad (\text{رابطه ۳})$$

در معادلات فوق Z تابع ارتفاع ناحیه می‌باشد.

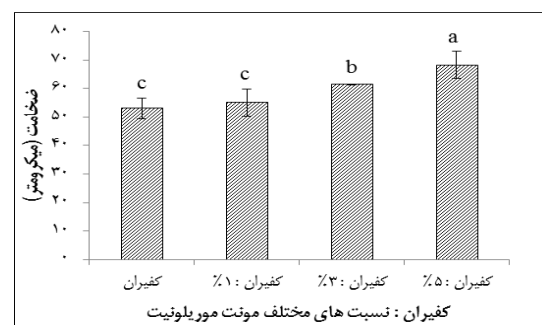
## آنالیز آماری

براساس آزمون فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با استفاده از تجزیه واریانس (ANOVA) اختلاف بین نمونه‌های مختلف در سطح احتمال ۵ درصد تعیین و میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS (V.16) در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند. تمامی نمونه‌ها در سه تکرار تهیه شده و همچنین برای ترسیم اشکال از نرم افزار Excel استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### ضخامت

نتایج آزمون اندازه‌گیری ضخامت در شکل ۱ آمده است. این نتایج نشان می‌دهد، که با اضافه کردن نانوذره ضخامت فیلم افزایش می‌یابد که این افزایش و روند آن متناسب با افزایش درصد نانوذره می‌باشد به طوری که با افزودن ۵ درصد نانورس ضخامت فیلم کفیران از ۵۵/۵۱ میکرومتر به ۸۳/۷۱ میکرومتر رسیده است. نانورس با توجه به ساختار لایه‌ای خود، در اثر تماس با حلال (آب) دچار انبساط شده و صفحات آن از هم فاصله می‌گیرد که این امر موجب افزایش ضخامت فیلم‌ها می‌شود (Petersson & Oksman, 2006; Zolfi *et al.*, 2014b).



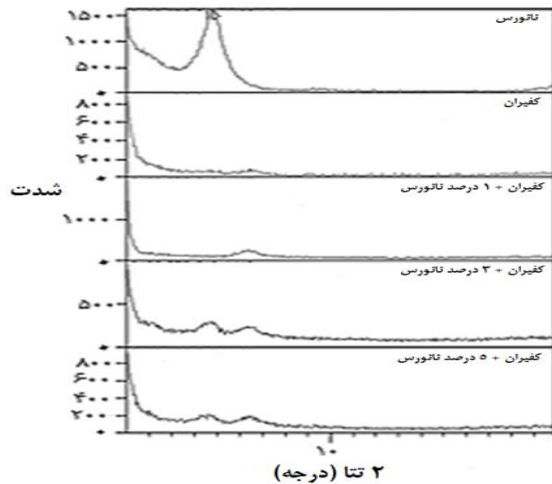
شکل ۱. اندازه گیری ضخامت فیلم های نانوکامپوزیتی کفیران حاوی غلظت‌های مختلف نانورس (ستون ها با حروف متفاوت در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار دارند).

### خواص مکانیکی فیلم

جدول ۱ نتایج مربوط به مقاومت کششی و درصد افزایش طول فیلم‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد، فیلم کفیران دارای مقاومت کششی حدود ۴/۸۸ مگاپاسکال می‌باشد که این مقدار با

$$\lambda = 2d_{001} \sin \theta \quad (\text{رابطه ۴})$$

در معادله فوق  $\lambda$  طول موج پرتو تابیده شده،  $d_{001}$  فاصله صفحات و  $\theta$  زاویه بین پرتو تابش و بازتاب می‌باشد.



شکل ۲. الگوی پراش پرتو ایکس نانوذرات رس، فیلم کفیران و نانوکامپوزیت‌های کفیران- نانورس

#### اندازه‌گیری خصوصیات حرارتی

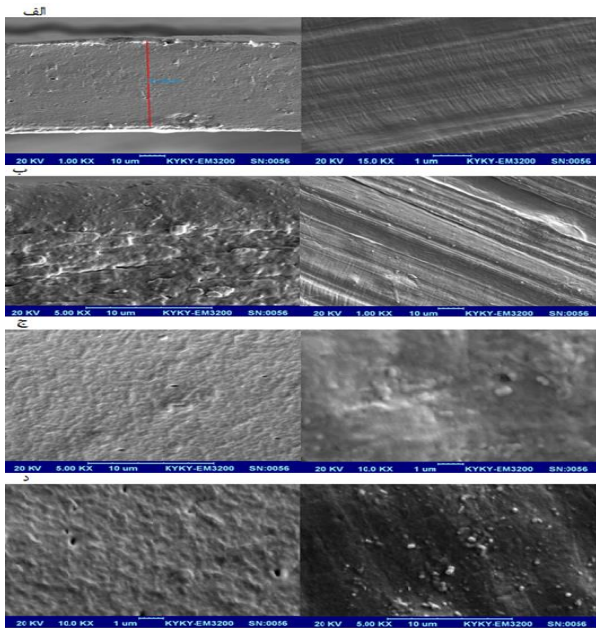
بررسی خصوصیات حرارتی فیلم‌ها نظیر دمای انتقال شیشه‌ای ( $T_g$ ) و دمای ذوب ( $T_m$ ) فیلم حائز اهمیت است، زیرا فیلم‌ها در دماهای بالاتر از دمای انتقال شیشه‌ای به صورت نرم و لاستیکی می‌باشند و در دماهای پایین‌تر از آن به صورت شیشه‌ای و سفت می‌باشند. در دماهای بالاتر از  $T_g$  به دلیل افزایش فضا بین پلیمرها، تحرک پذیری پلیمرها بیشتر شده و در نتیجه نفوذپذیری فیلم افزایش می‌یابد، بنابراین هر چقدر  $T_g$  یک فیلم بالاتر باشد فیلم بسته بندی در محدوده دمایی وسیع‌تری به عنوان محافظت کننده می‌تواند عمل کند. در دمای ذوب فیلم پلیمری به صورت کاملاً مایع و روان در می‌آید. در این پژوهش خواص حرارتی فیلم‌ها از لحاظ پارامترهایی چون دمای انتقال شیشه‌ای ( $T_g$ ) و دمای ذوب ( $T_m$ ) مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۳ منحنی‌های به دست آمده از آنالیز حرارتی فیلم کفیران و نانوکامپوزیت‌های آن نشان داده شده است. این منحنی‌ها شاهد ۲ پیک گرماگیر (Endothermic) هستیم. اولین پیک ظاهر شده مربوط به  $T_g$  و دومین پیک مربوط به  $T_m$  می‌باشد. فیلم کفیران به ترتیب دارای  $T_m$  و  $T_g$  برابر با ۱۵/۲۵- و ۸۱/۶۰ درجه سلسیوس است که در اثر الحاق نانو ذرات رس، این دو فاکتور افزایش می‌یابد به طوری که در نمونه حاوی ۳ درصد نانورس  $T_g$  و  $T_m$  در بالاترین مقدار و به ترتیب برابر با ۵/۳۳- و ۹۶/۹۲ درجه سلسیوس می‌باشد. در شکل ۴ روند تغییرات  $T_g$  و  $T_m$  هم‌زمان با افزایش درصد نانو ذرات نشان داده شده است. اینکه افزایش غلظت نانورس باعث افزایش

#### پراش پرتو ایکس (XRD)

پراش پرتو ایکس روشی کلاسیک برای شناسایی نحوه پراکنش نانوذرات در بستر پلیمری و مطالعه رفتار کریستالی نانوکامپوزیت‌ها می‌باشد. در شکل ۲ الگوی پراش پرتو ایکس فیلم کفیران، نانورس و نانوکامپوزیت‌های حاوی ۱ تا ۵ درصد نانورس نشان داده شده است. نتایج نشان داد که نانورس استفاده شده در این تحقیق دارای یک پیک در  $2\theta = 4/82^\circ$  بوده و در نتیجه طبق قانون براگ (معادله ۴) فاصله صفحات نانورس معادل با ۱۸/۳۰ آنگستروم می‌باشد. در فیلم حاوی ۱ درصد نانورس، منحنی پراش حذف پیک مذکور را نشان می‌دهد که این بدلیل پراکنش کامل صفحات نانورس در بستر پلیمری و شکل‌گیری نانوکامپوزیت از نوع یکنواخت می‌باشد (Tang et al., 2008). در غلظت‌های ۳ و ۵ درصد نانورس پیک مورد نظر بطور کامل از بین نرفت اما از شدت آن کاسته شده و به درجات پایین‌تر ( $2\theta = 4/62^\circ$ ) برای نانوکامپوزیت‌های حاوی ۳ درصد نانورس و  $2\theta = 4/50^\circ$  برای نانوکامپوزیت‌های حاوی ۵ درصد نانورس) منتقل گردید. این امر بیانگر شکل‌گیری نانوکامپوزیت‌ها از نوع نفوذی می‌باشد. به عبارت دیگر نفوذ رشته‌های بیوپلیمر کفیران به درون صفحات موجب افزایش فاصله بین صفحات نانورس شده که تشکیل پیک مورد نظر را در زاویه پایین‌تر و با ارتفاع کمتر سبب می‌شود. این پدیده به دلیل پیوندهای قطبی قوی شکل گرفته بین گروه‌های هیدروکسیل شاخه‌های پلیمری و لایه‌های سیلیکاتی می‌باشد (Mook Choi et al., 2003; Xu et al., 2006). این نتایج مشابه گزارش‌های بسیاری از محققین می‌باشد. نتایج بررسی پراش پرتو ایکس روی فیلم‌های نانوکامپوزیتی نشاسته- مونت‌موریلونیت نشان داد که نانورس دارای یک پیک در  $2\theta = 7/3^\circ$  (فاصله صفحات برابر با ۱۲/۱ آنگستروم) می‌باشد، در حالیکه در فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی ۳ و ۵ درصد نانورس پیک مذکور به درجات پایین‌تر (حدود  $2\theta = 5^\circ$ ) منتقل می‌شود (Cyras et al., 2008). در تحقیقی دیگر (Zolfi et al., 2014c) نتایج حاصل از آنالیز پراش پرتو ایکس فیلم‌های نانوکامپوزیتی پروتئین آب‌پنیر- مونت‌موریلونیت را مورد بررسی قرار دادند. این محققین بیان داشتند که نانورس دارای یک پیک در  $2\theta = 8/23^\circ$  (فاصله صفحات برابر با ۱۰/۷۴ آنگستروم) می‌باشد که پیک مذکور در فیلم‌های نانوکامپوزیتی حاوی ۱ و ۳ درصد نانورس حذف شده است، در حالیکه در فیلم‌های حاوی ۵ درصد نانورس به طور کامل حذف نشد اما به درجه پایین‌تری ( $2\theta = 8/23^\circ$ ) و فاصله صفحات برابر با ۱۲/۶۳ آنگستروم) منتقل گردید.

### بررسی ریزساختار با میکروسکوپ الکترونی

در شکل ۵ تصاویر میکروسکوپ الکترونی از سطح و سطح مقطع فیلم کفیران و نانوکامپوزیت‌های آن نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد اگر چه فیلم کفیران دارای سطح صاف و یکنواخت می‌باشد اما شکاف‌ها و حباب‌های در آن دیده می‌شود. افزودن نانورس به کفیران، ساختار فشرده‌ای را ایجاد کرده و باعث ایجاد حالت پیچ و خم شده است که به خوبی توانسته مسیر حرکت مولکول‌های نفوذ کننده را سد کند. این تصاویر حاکی از توزیع یکنواخت و تفکیک کامل صفحات رس از یکدیگر است و از طرفی نانوذرات به شکل مناسبی توسط بستر پلیمری احاطه شده است که این موضوع بیانگر سازگاری خوب نانو ذرات و بیوپلیمر می‌باشد. این نتایج مشابه گزارش‌های بسیاری از محققین بوده است (Casariego et al., 2009; Rhim et al., 2006).



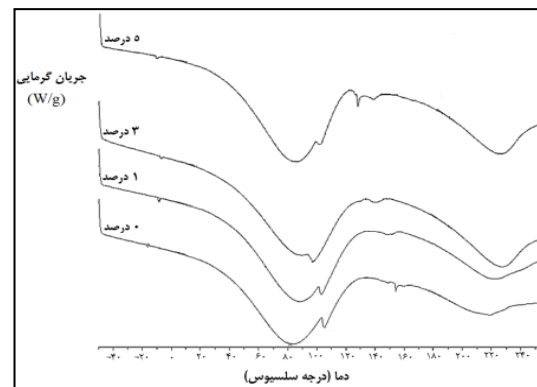
شکل ۵. تصویر میکروسکوپ الکترونی از سطح (راست) و سطح مقطع (چپ) - الف - فیلم کفیران و نانو کامپوزیت‌های حاوی - ب - ۱ درصد - ج - ۳ درصد - د - ۵ درصد نانورس

### توپوگرافی سطحی

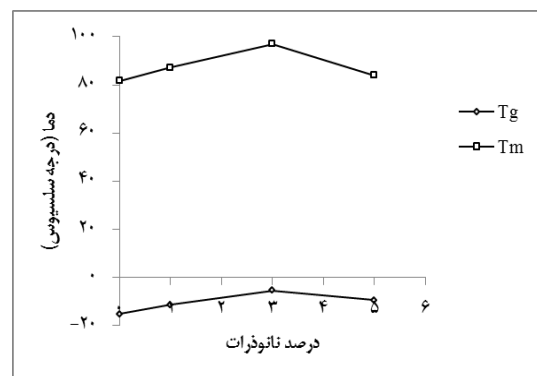
ثبت چگونگی قرارگیری و نشان دادن عمق و ارتفاع پستی و بلندی‌ها در یک سطح خاص از ماده را توپوگرافی گویند. میکروسکوپ نیروی اتمی تکنیکی قدرتمند در مطالعه سطوح بوده که اطلاعات کمی و کیفی مناسبی را در زمینه توپوگرافی سطح فیلم‌ها می‌دهد. شکل ۶ تصویر توپوگرافی فیلم کفیران و نانوکامپوزیت کفیران حاوی ۳ درصد نانورس را در اسکن سایز ۱۰×۱۰ میکرومتر و ۵۰×۵۰ میکرومتر نشان می‌دهد. فیلم کفیران از سطوح نسبتاً صافی برخوردار بوده و میزان پستی و

$T_g$  می‌شود احتمالاً به دلیل قرارگیری لایه‌های رس در بین زنجیره‌های بیوپلیمر و کاهش تحرک رشته‌ها می‌باشد. در واقع با پخش شدن سیلیکات‌های لایه‌ای، هم به دلیل افزایش تراکم و ایجاد فشردگی و هم به دلیل برقراری پیوند بین لایه‌های نانورس و رشته‌های بیوپلیمر تحرک موضعی زنجیره‌های بیوپلیمر کاهش یافته و بدنبال آن  $T_g$  نیز کاهش می‌یابد (Rimdusit et al., 2008).

شکل ۴ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نانورس تا ۳ درصد  $T_m$  نیز به مانند  $T_g$  افزایش می‌یابد. قرارگیری لایه‌های نانورس در بین زنجیره‌های کفیران و برقراری پیوند با آنها باعث افزایش نظم و انسجام ساختاری در نواحی آمورف شده و همچنین باعث تبدیل نواحی آمورف به قسمت‌های کریستالی می‌شود و در نتیجه درجه کریستالی شدن و بدنبال آن دمای ذوب فیلم‌ها افزایش می‌یابد (Rimdusit et al., 2008). البته باید توجه داشت هر مقدار افزایش در غلظت نانورس ممکن است سبب افزایش  $T_g$  و  $T_m$  نشود (همان طور که در غلظت ۵ درصد نانورس مشاهده می‌شود)، زیرا در غلظت‌های بالاتر امکان تفکیک لایه‌های رس و نفوذ زنجیره‌های کفیران به فواصل این لایه‌ها کمتر شده و از طرفی امکان خوشه‌ای شدن نانوذرات نیز وجود دارد (Kubies et al., 2006).



شکل ۳. منحنی‌های DSC فیلم‌های نانوکامپوزیتی بر پایه کفیران حاوی درصدهای مختلف نانورس



شکل ۴. وابستگی  $T_g$  و  $T_m$  نانوکامپوزیت‌ها به درصد نانوذرات

جدول ۲. پارامترهای زبری سطح کفیران و نانوکامپوزیت حاوی ۳ درصد نانورس

پارامترهای زبری			
نمونه فیلم	S <sub>a</sub> (نانومتر)	S <sub>q</sub> (نانومتر)	S <sub>dq</sub>
کفیران	۱۶/۰۰±۱/۱۲ <sup>b</sup>	۲۱/۳۵±۱/۵۰ <sup>b</sup>	۰/۰۵۱±۰/۰۰۱ <sup>b</sup>
کفیران-۳ درصد نانورس	۲۷/۰۵۰±۳/۹۴ <sup>a</sup>	۳۹۵/۳۶±۲/۲۵ <sup>a</sup>	۰/۱۶±۰/۰۰۷ <sup>a</sup>

\*در هر ستون اعداد با حروف متفاوت در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار دارند.

### نتیجه گیری

در این مطالعه فیلم‌های بیونانوکامپوزیتی بر پایه کفیران و نسبت‌های مختلف مونت موریلونیت تولید شد. نتایج نشان داد، نانورس خصوصیات فیلم‌ها را به طور معناداری تحت تاثیر قرار داده و سبب بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها می‌شود. نانورس ضخامت و مقاومت کششی فیلم‌ها را افزایش می‌دهد در حالی که این نانوذره تا غلظت ۳ درصد سبب افزایش درصد ازدیاد طول و در غلظت‌های بالاتر سبب کاهش آن می‌شود. الگوی XRD نشان داد که ذرات نانورس سازگاری مناسبی با ماتریس کفیران داشته و به خوبی در آن توزیع شده‌اند. همچنین افزودن نانورس تا غلظت ۳ درصد سبب افزایش دمای انتقال شیشه‌ای و دمای ذوب می‌شود اما با افزایش غلظت این نانوذره از ۳ به ۵ درصد این دو فاکتور کاهش می‌یابند. بررسی تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان از توزیع یکنواخت و تفکیک کامل صفحات رس در بستر پلیمری کفیران دارد. توپوگرافی سطحی نشان می‌دهد که ذرات نانورس سبب افزایش ناهمواری در سطح فیلم‌ها شده به طوری که پارامترهای زبری را به طور معناداری افزایش داده است. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد فیلم‌های بیونانوکامپوزیتی کفیران- نانورس می‌توانند به عنوان یکی از جایگزین‌های مناسب برای پلیمرهای سنتزی در بسته‌بندی مواد غذایی مطرح باشند.

### سپاسگزاری

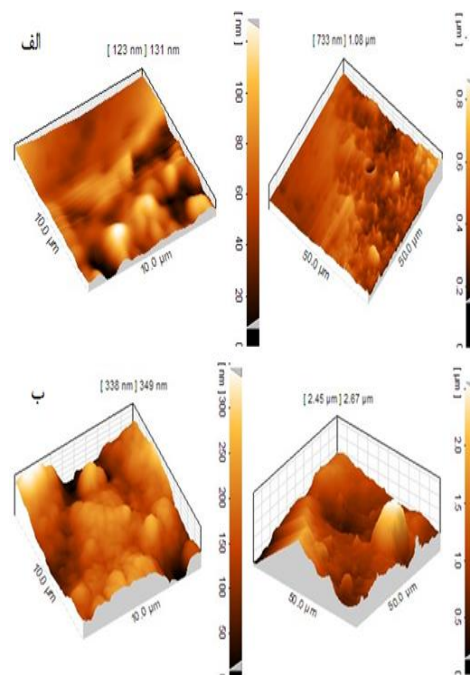
این پژوهش در قالب طرح شماره ۷۳۱۴۸۷۲/۱/۰۵ دانشگاه تهران اجرا شد. همچنین لازم است از همکاری ویژه دانشگاه آزاد اسلامی واحد وارمین-پیشوا سپاسگزاری شود.

### REFERENCES

ASTM (2001). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Standard D882. In Annual book of ASTM: Philadelphia. PA: American Society for Testing and Materials.  
Almasi, H., Ghanbarzadeh, B. & Entezami, A. A. (2010). Physicochemical properties of starch-CMC-

بلندی در سطح آن کمتر از نانوکامپوزیت حاوی ۳ درصد رس می‌باشد. با افزودن نانورس، میزان برآمدگی و فرورفتگی افزایش یافته و یکنواختی سطح فیلم، کمتر شده است.

نواحی پر رنگ که به صورت فرورفتگی و دره دیده می‌شود، قسمت‌های غنی از بیوپلیمر بوده و نواحی با رنگ روشن‌تر که به صورت تپه دیده می‌شود، قسمت‌های حاوی لایه‌های نانورس می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که مولکول‌هایی از نانورس که در قسمت سطحی فیلم قرار می‌گیرند، می‌توانند باعث افزایش ناهمواری سطح فیلم شوند (Zolfi et al., 2014b).  
جدول ۲ پارامترهای زبری این دو فیلم را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود سه پارامتر متوسط زبری (S<sub>a</sub>), انحراف معیار (S<sub>q</sub>) و شیب نقاط روی سطح به استثنای لبه‌ها (S<sub>dq</sub>) در مورد فیلم کفیران به ترتیب در حدود ۱۶/۰۰ نانومتر، ۲۱/۳۵ نانومتر و ۰/۰۵۱ می‌باشد که با اضافه کردن نانورس این مقادیر به طور معنی‌داری افزایش یافته است. این مسئله همان‌طور که در مورد تصاویر توپوگرافی بحث شد، به حضور مولکول‌های نانورس نسبت داده می‌شود (Zolfi et al., 2014b).



شکل ۶. تصاویر توپوگرافی ۳ بعدی ۱۰×۱۰ میکرومتر (چپ) و ۵۰×۵۰ میکرومتر (راست) - الف - فیلم کفیران - ب - فیلم نانوکامپوزیتی بر پایه کفیران حاوی ۳ درصد نانورس

nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(1), 1–5.

Bae, H. J., Park, H. J., Hong, S. I., Byun, Y. J., Darby, D. O., Kimmel, R. M. & Whiteside, W. S. (2009). Effect of clay content, homogenization RPM, pH, and ultrasonication on mechanical and



- barrier properties of fish gelatin/montmorillonite nanocomposite films. *LWT-Food Science and Technology*, 42(6), 1179–1186.
- Casariago, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Diaz, R. & Vicente, A. A. (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1895–1902.
- Chen, H. (1995). Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2563–2583.
- Cheng, L. H., Karim, A. A. & Seow, C. C. (2006). Effects of Water-Glycerol and Water-Sorbitol Interactions on the Physical Properties of Konjac Glucomannan Films. *Journal of Food Science*, 71(2), E62–E67.
- Cyras, V. P., Manfredi, L. B., Ton-That, M. T. & Vazquez, A. (2008). Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/ montmorillonite nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 55–63.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A. & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*, 38(4), 299–313.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, Pa. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Fabra, M. J., Talens, P. & Chiralt, A. (2008). Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 393–400.
- Fabra, M. J., Talens, P. & Chiralt, A. (2009). Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 676–683.
- Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Oromiehie, A. & Yarmand, M. S. (2011). Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 127(4), 1496–1502.
- Gontard, N., Guilbert, S. & Cuq, J. (1993). Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, 58(1), 206–211.
- Khanzadi, M., Jafari, S. M., Mirzaei, H., Chegini, F. K., Maghsoudlou, Y. & Dehnad, D. (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate-pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate Polymers*, 118, 24–29.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Hambleton, A., Lenart, A. & Voilley, A. (2010). Protein and glycerol contents affect physico-chemical properties of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 503–510.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A. & Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53–60.
- Kooiman, P. (1968). The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, 7(2), 200–211.
- Kubies, D., Scudla, J., Puffr, R., Sikora, A., Baldrian, J., Kovarova, J. & Rypacek, F. (2006). Structure and mechanical properties of poly (L-lactide)/layered silicate nanocomposites. *European Polymer Journal*, 42(4), 888–899.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors*, 22(1), 197–200.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefir. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 69–74.
- Mook Choi, W., Wan Kim, T., Ok Park, O., Keun Chang, Y. & Woo Lee, J. (2003). Preparation and characterization of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)-organoclay nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 90(2), 525–529.
- Petersson, L. & Oksman, K. (2006). Biopolymer based nanocomposites: comparing layered silicates and microcrystalline cellulose as nanoreinforcement. *Composites Science and Technology*, 66(13), 2187–2196.
- Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A. & Abraham, A. G. (2009). Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 684–690.
- Rhim, J. W., Hong, S. I., Park, H. M. & Ng, P. K. W. (2006). Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5814–5822.
- Rhim, J. W., Lee, J. H. & Kwak, H. S. (2005). Mechanical and water barrier properties of soy protein and clay mineral composite films. *Food Science and Biotechnology*, 14(1), 112–116.
- Rimada, P. S. & Abraham, A. G. (2001). Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, 68(04), 653–661.
- Rimdisit, S., Jingjid, S., Damrongsakkul, S., Tiptakorn, S. & Takeichi, T. (2008). Biodegradability and property characterizations of methyl cellulose: effect of nanocompositing and chemical crosslinking. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 444–455.
- Sothornvit, R., Rhim, J. W. & Hong, S. I. (2009). Effect of nano-clay type on the physical and



- antimicrobial properties of whey protein isolate/clay composite films. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 468–473.
- Tang, S., Zou, P., Xiong, H. & Tang, H. (2008). Effect of nano-SiO<sub>2</sub> on the performance of starch/polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydrate Polymers*, 72(3), 521–526.
- Wakai, M. & Almenar, E. (2015). Effect of the presence of montmorillonite on the solubility of whey protein isolate films in food model systems with different compositions and pH. *Food Hydrocolloids*, 43, 612–621.
- Xu, Y., Ren, X. & Hanna, M. A. (2006). Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 99(4), 1684–1691.
- Zheng, J. P., Li, P., Ma, Y. L. & Yao, K. De. (2002). Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(5), 1189–1194.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Hashemi, M. (2014a). Development and characterization of the kefiran-whey protein isolate-TiO<sub>2</sub> nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 340–345.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Hashemi, M. (2014b). The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 109, 118–125.
- Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. & Hashemi, M. (2014c). Characterization of the new biodegradable WPI/clay nanocomposite films based on kefiran exopolysaccharide. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3485–3493.