

بررسی ویژگی‌های حرارتی و ضد میکربی نانوکامپوزیت‌های کیتوزان - نانوسلولز و تأثیر آن در افزایش مدت ماندگاری گوشت چرخ کرده

دانیال دهناد¹، حبیب‌الله میرزایی²، زهرا امام‌جمعه³، سید مهدی جعفری⁴، سعید داداشی⁵

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
- 2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران. پست الکترونیکی: habibmirzaei@yahoo.ca
- 3- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
- 4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
- 5- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 92/3/2

تاریخ پذیرش: 92/6/20

چکیده

سابقه و هدف: کیتوزان، ترکیبی طبیعی و ضد میکربی در برابر باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به شمار می‌رود. نانوذرات سلولز دارای نرخ زیست-تخریب پذیری بالا و نسبت به سایر نانوپرکن‌های بهبوددهنده خواص، ارزان‌تر هستند. هدف پژوهش حاضر این است که بتوان با به‌کارگیری این دو ماده فراوان در طبیعت، نانوکامپوزیتی با ثبات حرارتی بالا تهیه و با استفاده از آن، بهبود معنی‌داری در مدت ماندگاری گوشت چرخ کرده، حاصل کرد.

مواد و روش‌ها: نانوکامپوزیت‌های کیتوزان-نانوسلولز با استفاده از پودر کیتوزان با وزن مولکولی 600-800 کیلودالتون، نانوسلولز با قطر الیاف 20-50 نانومتر و نیز گلیسرول درجه مطلق تهیه شدند. نانوکامپوزیت‌ها تحت آزمون حرارتی گرماسنجی روبشی افتراقی، آزمون ساختاری پراکنش اشعه ایکس و آزمون میکربی انتشار در محیط آگاردار قرار گرفتند؛ نهایتاً کارآیی این فیلم خوراکی در افزایش مدت ماندگاری محصول گوشت چرخ کرده بررسی شد. طراحی آزمایشات با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert، روش سطح پاسخ و طرح Box-Behnken انجام شد.

یافته‌ها: با افزایش میزان نانوسلولز از صفر به 2 درصد (وزنی/وزن کیتوزان)، دمای ذوب و انتقال شیشه‌ای فیلم‌ها کاهش یافت. فیلم‌های کیتوزان-نانوسلولز به اندازه وسعت سطح تماس خود نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، خاصیت ضد میکروبی نشان دادند. به کارگیری نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز بر روی گوشت چرخ کرده توانست جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک محصول را تا میزان 3 سیکل لگاریمی (نسبت به نمونه کنترل) کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به خصوصیات ویژه نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز از قبیل پایداری حرارتی بالا و خاصیت ضد میکروبی می‌توان این پلیمر را برای بسته‌بندی مواد دارای نرخ فساد بالا و زمان ماندگاری کم نظیر محصولات گوشتی توصیه کرد.

واژگان کلیدی: فیلم خوراکی، کشسان‌کننده، ساختار بلورین، مدت ماندگاری

• مقدمه

ترکیبات ضد میکربی طبیعی علیه گروه‌های مختلف میکروارگانیسمی شامل باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها به شمار می‌روند (1). کیتوزان در pH = 6 و پایین‌تر، به دلیل دارا بودن بار مثبت روی کربن شماره 2 مونومر گلوکز آمین، دارای قابلیت انحلال و فعالیت ضد میکربی بیشتری نسبت به

کیتوزان، پلی‌ساکاریدی مشتق شده از کیتین است و به میزان زیاد در پوست سخت پوستان یافت می‌شوند. کیتوزان، اساساً از واحدهای 2-آمینو-2-دِاکسی-بتا-دی-گلوکوپیرانوز تشکیل می‌شود، اگرچه حاوی مقادیر اندکی 2-استامیدو-2-دِاکسی-بتا-دی-گلوکوپیرانوز نیز می‌باشد. کیتین و کیتوزان،

شود، رهایش اسیدها به درون محصول به طور دفعی (در یک مرحله) و در مقادیر زیاد صورت می‌پذیرد (11). هدف پژوهش حاضر این است که بتوان با استفاده از نانوکامپوزیت، رشد باکتری را در سطح تماس محصول-فیلم بسته بندی به تأخیر انداخت و بدین ترتیب، بهبود معنی‌داری در مدت ماندگاری محصول گوشتی به دست آورد.

• مواد و روش‌ها

مواد اولیه: پودر کیتوزان با وزن مولکولی 600-800 کیلودالتون از شرکت Acros آمریکا و نانوذرات سلولز با قطر لیاف 20-50 نانومتر از شرکت Asahi Kasei Corp ژاپن خریداری شدند. اسید استیک و گلیسرول درجه مطلق از شرکت Merck آلمان تهیه گردیدند. محیط‌های کشت Nutrient Broth، BHI (Agar)، MRS Broth، Agar از شرکت Merck آلمان و نیز Bacto-Peptone از شرکت Media هند تهیه شدند. باکتری‌های /شریشیا کلاهی PTCC 1399 و /استافیلوکوکوس /اورئوس PTCC 1431 از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و باکتری /سالمونلا /تتریتیدیس PTCC 1381 از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند.

تهیه فیلم: فیلم‌های نانوکامپوزیت با استفاده از روش قالب-ریزی و مطابق روش توضیح داده‌شده توسط Rhim و همکاران در سال 2009 با اندکی اصلاحات تهیه شدند (12). پودر کیتوزان به میزان مشخص (جدول 1) به 40 میلی‌لیتر اسید استیک 1 درصد (حجمی-حجمی) اضافه گردید. سپس در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و با سرعت 250 دور در دقیقه، عمل هم‌زدن (مدل CB162، محصول شرکت Stuart® کشور انگلستان) طی 2 ساعت انجام شد. به طور موازی، مقدار مشخصی (جدول 1) از نانوذرات سلولز به 20 میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و تحت شرایط هم‌زنی مشابه به مدت 2 ساعت پخش گردید. در نهایت، محلول آب مقطر به همراه محتویات، به محلول کیتوزان اضافه شد. گلیسرول (جدول 1) هم به محلول نهایی اضافه و اجازه داده شد تا محلول نهایی به مدت 24 ساعت، کاملاً یکنواخت گردد. محلول بالا با هم‌کن‌کننده (مدل IKA® T25 digital ساخت شرکت ULTRA-TURAX® کشور آلمان) با دور 8000 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه و سپس با استفاده از دستگاه فراصوت (مدل TI-H-10 ساخت شرکت Elma® کشور آلمان) تحت فرکانس 35 کیلوهرتز و توان 100 درصد به مدت 30 دقیقه هم‌گن گردید. هواگیری در دستگاه آون

کیتین است (2). سلولز یک ترکیب همپولی ساکاریدی با وزن مولکولی بالا است که از واحدهای بتا 1 و 4 آن‌هیدرید-دی-گلوکوپیرانوز تشکیل شده است. یکی از مشخصات ویژه سلولز این است که هر یک از منومرهای آن دارای سه گروه هیدروکسیل می‌باشد؛ این گروه‌های هیدروکسیل و توانایی آنها در تشکیل پیوند هیدروژنی، نقش اصلی را در کنترل ساختار بلورین و خواص فیزیکی این ماده برعهده دارند (3). فرآیند تولید نانوسلولز با خردکردن ورقه‌های بسیار خالص پالپ چوپ شروع می‌شود؛ پالپ خردشده در حمام گرم اسید معدنی (کلرید هیدروژن) غوطه‌ور و نواحی آمورف میکروفیبریل در آن حل می‌شود در حالی که قطعات بلورین دست‌نخورده باقی می‌مانند (4).

Kim و همکاران در سال 2011 گزارش کردند که کیتوزان‌های دارای ویسکوزیته بالا (100 و 200 میلی-پاسکال ثانیه) هیچ‌گونه اثر ضد میکربی نسبت به /شریشیا کلاهی و /سالمونلا تایفی‌موریوم از خود نشان ندادند؛ در حالی که نسبت به باکتری لیستریا مونوسایتوجنس موثر بودند (5). No و همکاران در سال 2002 گزارش کردند که رشد باکتری /شریشیا کلاهی به طور موثری توسط کیتوزان دارای وزن مولکولی نسبتاً بالا (در مقایسه با کیتوزان دارای وزن مولکولی پایین) بازدارد (6).

رشد میکربی به طور معمول، تغییرات حسی نامطلوبی در طول انبارداری گوشت برجا می‌گذارد (7) لذا چنانچه بتوان رشد باکتری را در سطح تماس محصول-فیلم بسته بندی به تأخیر انداخت یا متوقف کرد، بهبود چشمگیری در مدت ماندگاری گوشت روی خواهد داد (8). از آنجا که ورود عوامل کشنده‌ی باکتریایی یا بازدارنده‌ی رشد به درون فرمولاسیون-های گوشتی با موضوع غیرفعال شدن نسبی این مواد فعال توسط اجزای ترکیبی خود محصول مواجه می‌شود بنابراین این عوامل تأثیر محدودی روی فلور سطحی گوشت خواهد داشت؛ کاربرد مستقیم عوامل ضد میکربی روی سطوح گوشت، از طریق غوطه‌وری یا پاششی، نیز به دلیل انتشار سریع مواد فعال در کل حجم ماده‌ی غذایی ناکارآمد است (9، 10). هدف از ورود اسیدهای آلی به درون ماتریکس کیتوزانی به جای به کارگیری مستقیم آنها بر روی سطح محصول، افزایش مدت رهایش اسیدهای محتوایی کیتوزان (رهایش تدریجی) در طول انبارداری محصول است؛ زیرا در صورتی که اسیدهای آلی به طور مستقیم و از طریق پاششی یا غوطه‌وری بر روی سطح محصول به کار گرفته

ایکس با طول موج 1/54 آنگسترم قرار گرفتند (15). منحنی‌های پراکنش در محدوده زوایای پراکنش از 2 تا 45 درجه با سرعت پویش 1 درجه در دقیقه و با گام 0/02 به دست آمدند (16). نمونه‌های 2، 4، 6 و 8 به منظور مطالعه مشخصات کریستالی نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز (شامل فاصله نانولایه‌های درونی، تعداد، شدت و موقعیت پیک‌های نانوکامپوزیت، ...) و نیز نحوه تأثیر متغیرهای مختلف بر ساختار کیتوزان بررسی شدند.

بررسی فعالیت ضد میکربی نانوکامپوزیت‌های کیتوزان-نانوسلولز: باکتری‌های اشریشیاکلای،

استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریتیدیس بر روی محیط آگار مغذی شیب‌دار کشت داده و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هنگام تهیه کشت مایع از باکتری‌ها، یک لوپ پر از هر نمونه باکتری برداشته، در شرایط کاملاً سترون در 50 میلی‌لیتر محیط استریل BHI کشت داده و سپس به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد درون دستگاه گرمخانه-لرزان با سرعت 140-150 دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. در نهایت عمل رقیق کردن کشت‌ها با استفاده از آب مقطر سترون تا رسیدن به جمعیت میکربی مورد نیاز برای کشت سطحی صورت گرفت. هنگام کشت سطحی، جمعیت میکربی 10^5 - 10^6 CFU/ml بود. برای تعیین فعالیت ضد میکربی فیلم‌های خوراکی از روش انتشار در محیط آگاردار استفاده شد. فیلم‌ها با استفاده از قالب به قطعات مربعی شکل به قطر 10 یا 15 میلی‌متر تبدیل شدند و سپس در شرایط سترون بر روی محیط کشت BHIA (Brain Heart Infusion Agar) قرار گرفتند؛ برای باکتری‌های اشریشیاکلای و استافیلوکوکوس اورئوس از قطعات 10 میلی‌متری و برای باکتری سالمونلا انتریتیدیس از قطعات 15 میلی‌متری نانوکامپوزیت‌ها استفاده شد. قبل از قراردادن دیسک‌ها بر روی سطح محیط کشت، عمل کشت سطحی با استفاده از 0/1 میلی‌لیتر محلول مایع هر کدام از باکتری‌های مورد آزمایش انجام گرفت؛ سپس پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند (17). نتایج به صورت توانایی (-) و یا عدم توانایی (+) رشد باکتری‌ها در سطح تماس با نانوکامپوزیت گزارش گردید.

بررسی کارایی نانوکامپوزیت‌های تهیه‌شده در افزایش مدت ماندگاری گوشت چرخ‌کرده: میزان عملکرد فیلم‌های ضد میکربی از طریق کاربرد آنها بر سطح رویی صفحه‌های

تحت خلأ (نوع Croydon محصول Townson & Mercer Ltd.) تحت فشار 600 میلی‌متر جیوه و بدون اعمال دما به مدت 1 ساعت انجام شد. محلول (60 میلی‌لیتر) به آرامی در مرکز پلیت شیشه‌ای-قرار داده شده درون آون (کیمیژن، ساخت ایران) 37 درجه سانتی‌گراد- دارای مساحت 100 سانتی‌مترمربع، ریخته شد؛ مدت زمان لازم برای تشکیل فیلم، 48 ساعت اعمال گردید. نهایتاً، فیلم از قالب جدا و به مدت دو روز دیگر جهت حذف باقیمانده‌ی حلال در آون 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس درون پلاستیک بسته‌بندی زیپ-کیپ (14×18 سانتی‌مترمربع، ساخت کارخانه‌ی پلی‌اتیلن ایران) قرار گرفت.

پس از آنالیز فیلم‌های ذکرشده، فیلم نهایی نیز با در نظر گرفتن مقدار 1 درصد (وزنی/0/6 حجمی) کیتوزان، 0.18 درصد (وزنی/وزن کیتوزان) نانوسلولز و 30 درصد (حجمی/وزن کیتوزان) گلیسرول برای به کارگیری روی محصول گوشتی مطابق روش بالا تهیه گردید.

آزمون حرارتی: خواص حرارتی نانوکامپوزیت‌ها با استفاده از دستگاه گرماسنجی روبشی افتراقی از نوع Mettler Toledo مدل 1 DSC ساخت کشور سوئیس بررسی شد. بوتله آلومینیمی خالی به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت؛ کالیبره کردن دستگاه با ایندیم انجام شد. بدین منظور، مقدار 10/1 میلی‌گرم از نمونه توسط دستگاه گرماسنج تحت جریان آرگون با سرعت 20 میلی‌لیتر بر دقیقه و نرخ حرارت-دهی 10 درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، تا دمای 160 درجه سانتی‌گراد حرارت سپس تا 10- درجه سانتی‌گراد سرد و مجدداً تا 200 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد (13). در روبش حرارتی نخست، آنتالپی و پیک ذوب به دست آمد و در روبش حرارتی دوم دمای انتقال شیشه‌ای اندازه‌گیری گردید (14). نمونه‌های 1، 3، 5 و 14 به منظور مطالعه ویژگی‌های حرارتی نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز (کیفیت پیک‌های ذوب، دما، آنتالپی و مساحت محدوده ذوب و نیز خصوصیات نقاط انتقال شیشه‌ای) و نیز نحوه تأثیر متغیرهای مختلف بر رفتار حرارتی نانوکامپوزیت بررسی شدند.

آزمون پراکنش پرتو ایکس: به منظور مطالعه ساختار کریستالی و ریز ساختار فیلم‌های نانوکامپوزیت، از دستگاه پراکنش‌سنج Bruker مدل D8 Advance ساخت شرکت Siemens آلمان استفاده شد. برای انجام آزمون، منبع پرتو ایکس با استفاده از تابش Cu K α در ولتاژ شتاب‌دهنده KV 40 و جریان 30 mA تنظیم شد و نمونه‌ها در معرض پرتو

شمارش جمعیت باکتری، لایه ای نازک (ضخامت 0/3-0/2 سانتی‌متر) از روی گوشت، شامل سطحی که با فیلم ضدمیکربی در تماس بود، جدا شد و درون کیسه‌ی مخصوص همگن‌سازی که دارای 90 میلی‌لیتر محیط رقیق‌کننده‌ی باکتوپتون 0/1 درصد (وزنی/حجمی) بود قرار گرفت و در دور بالا به مدت 120 ثانیه در همگن‌ساز Stomacher 400 (ساخت شرکت Seward کشور انگلستان) مخلوط شد. رقت‌های مناسب از محلول همگن آماده و به منظور شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک، از هر رقت به میزان 0/1 درصدوزنی/حجمی پخش سطحی بر روی محیط MRSA (de Man, Rogosa and Sharpe Agar) درون پلیت انجام شد نهایتاً تمامی پلیت‌ها درون گرمخانه 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 روز قرار گرفتند. نتایج به صورت لگاریتم تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی در یک میلی‌لیتر ($\log_{10}$ CFU/ml) گزارش شدند (1).

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق، روش سطح پاسخ و طرح Box-Behnken برای سه متغیر مستقل شامل کیتوزان (1/3-1 درصد)، نانوسلولز (0-2 درصد) و گلیسرول (30-90 درصد) در سه سطح و سه تکرار در نقطه مرکزی جهت طراحی آزمایشات، توسط نرم‌افزار Design-Expert® 6.0.2، به کار گرفته شد (جدول 1).

حلقوی گوشت چرخ‌کرده دارای قطری معادل 60 میلی‌متر و ضخامت 15 میلی‌متر، ارزیابی شد. مقدار 100 گرم گوشت چرخ‌شده در اسفند ماه 1391 از بازار محلی گرگان خریداری گردید. صفحه‌های حلقوی گوشت تحت شرایط سترون با استفاده از قالب در ابعاد مورد نظر آماده و درون پتری دیش‌ها قرار گرفتند، سپس به طور کامل با نانوکامپوزیت و یا نایلون (به عنوان کنترل) پوشانده شدند و به طور جداگانه در بسته‌های غیرقابل نفوذ به اکسیژن (13×13) سانتی‌مترمربع، ساخت کارخانه پاکیزه‌پلاستیک ایران) با استفاده از دستگاه درزگیر-حرارتی پرس‌پلاست (گروه صنعتی مانا، ایران) درزبندی و در 3 و 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 2، 4 و 6 روز نگهداری گردیدند تا نهایتاً میزان باکتری‌های رشد کرده شمارش شود. نمونه‌های گوشت در دوره‌های مشخص تحت شرایط سترون از درون بسته‌ها بیرون آورده شدند و آزمون شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها به همراه تعیین pH نمونه‌ها انجام گرفت. برای تعیین pH نمونه‌ها از دستگاه Knick pH-Meter 766 Calimatic (ساخت آلمان) استفاده شد. آزمون اندازه‌گیری pH مطابق با استاندارد ملی ایران شماره‌ی 1028 انجام گرفت (18)؛ سه نقطه‌ی مختلف گوشت جهت انجام آزمون pH انتخاب و میانگین نتیجه‌های به دست آمده گزارش شد. به منظور

جدول 1. طرح آزمایشی Box-Behnken به کار رفته برای متغیرهای مستقل

شماره استاندارد تیمار	میزان کیتوزان (درصدوزنی/0.6حجمی)	میزان نانوسلولز (درصدوزنی/وزن کیتوزان)	میزان گلیسرول (درصدحجمی/وزن کیتوزان)
1	1/00	0	60
2	1/30	0	60
3	1/00	2	60
4	1/30	2	60
5	1/00	1	30
6	1/30	1	30
7	1/00	1	90
8	1/30	1	90
9	1/15	0	30
10	1/15	2	30
11	1/15	0	90
12	1/15	2	90
13	1/15	1	60
14	1/15	1	60
15	1/15	1	60

• یافته‌ها

ویژگی‌های حرارتی فیلم تولیدی: نتایج آزمون گرماسنجی روبشی افتراقی در جدول 2 آورده شده است. بالاترین محدوده و دمای انتقال شیشه‌ای به نمونه‌ی شماره 1 تعلق داشت که حاوی کمترین درصد نانوسلولز در مقایسه با سه تیمار دیگر بود. از مقایسه‌ی نمونه‌ی 14 با نمونه‌های 1 و 3 نیز مشخص شد که با افزایش کیتوزان از 1 به 1/15 درصد (وزنی/0/6 حجمی) و بالتبع آن گلیسرول، دمای انتقال شیشه‌ای کاهش یافت.

بالاترین دمای ذوب به نمونه 1 تعلق داشت که حاوی کمترین درصد نانوسلولز بود. با افزایش گلیسرول از 30 به 60 درصد (حجمی/وزن کیتوزان)، آنتالپی و مساحت محدوده

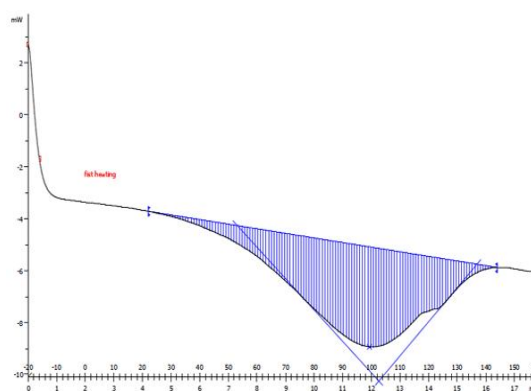
ذوب کمتر شد که از مقایسه نمونه‌های 1 و 3 با نمونه‌ی شماره 5 نتیجه گردید.

فرآیند ذوب شدن نانوکامپوزیت طی یک بازه زمانی-دمایی رخ داد که ابتدا به صورت نزولی و سپس صعودی در شکل 1 الف مشاهده شد. ارتفاع بیشتر پیک نمونه‌های 1 و 5 نسبت به سایر نمونه‌ها نشان‌دهنده این است که پیوندهای درونی این نمونه‌ها بیشتر، محکم‌تر و پیچیده‌تر بود در نتیجه مقدار انرژی بیشتری برای ذوب ماده، مصرف‌گردید. به عبارت دیگر، نمونه شماره 1 به دلیل عدم وجود نانوذرات و نمونه شماره 5 به دلیل وجود کمترین مقادیر گلیسرول، ساختار کریستالی منظم‌تری تشکیل دادند. شکل 1 ب، فقط وجود یک پیک را تایید می‌کند؛ بدین معنی که، دو لایه شامل ماتریکس کیتوزانی و نانوذرات سلولزی در هم پراکنده شده و فرورفته بودند.

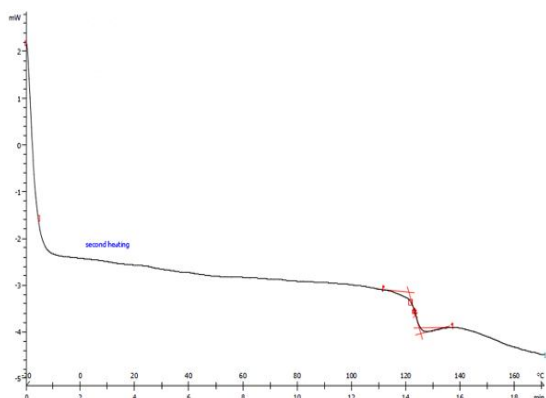
جدول 2. مشخصات حرارتی نانوکامپوزیت‌های کیتوزان- نانوسلولز حاوی مقادیر مختلف کیتوزان، نانوسلولز و گلیسرول

شماره تیمار	شروع محدوده انتقال شیشه‌ای (°C)	دمای انتقال شیشه‌ای (°C)	نقطه پایانی انتقال شیشه‌ای (°C)	پایان محدوده انتقال شیشه‌ای (°C)	شروع نقطه ذوب (°C)	نقطه ذوب (°C)	پایان نقطه ذوب (°C)	آنتالپی ذوب (J.g ⁻¹)	ارتفاع پیک ذوب (mW)	مساحت محدوده ذوب (mJ)
1	121/16	123/06	124/88	134/10	52/67	98/99	136/57	-123/34	3/85	-1221/07
3	118/54	119/95	121/33	132/79	49/76	97/73	133/78	-88/28	2/64	-882/78
5	118/71	121/45	123/77	131/50	48/18	97/87	137/68	-121/39	3/53	-1226/09
14	114/04	115/88	117/87	128/55	47/09	97/44	136/08	-86/38	2/50	-872/41

الف) نمودار ذوب



ب) نمودار انتقال شیشه‌ای



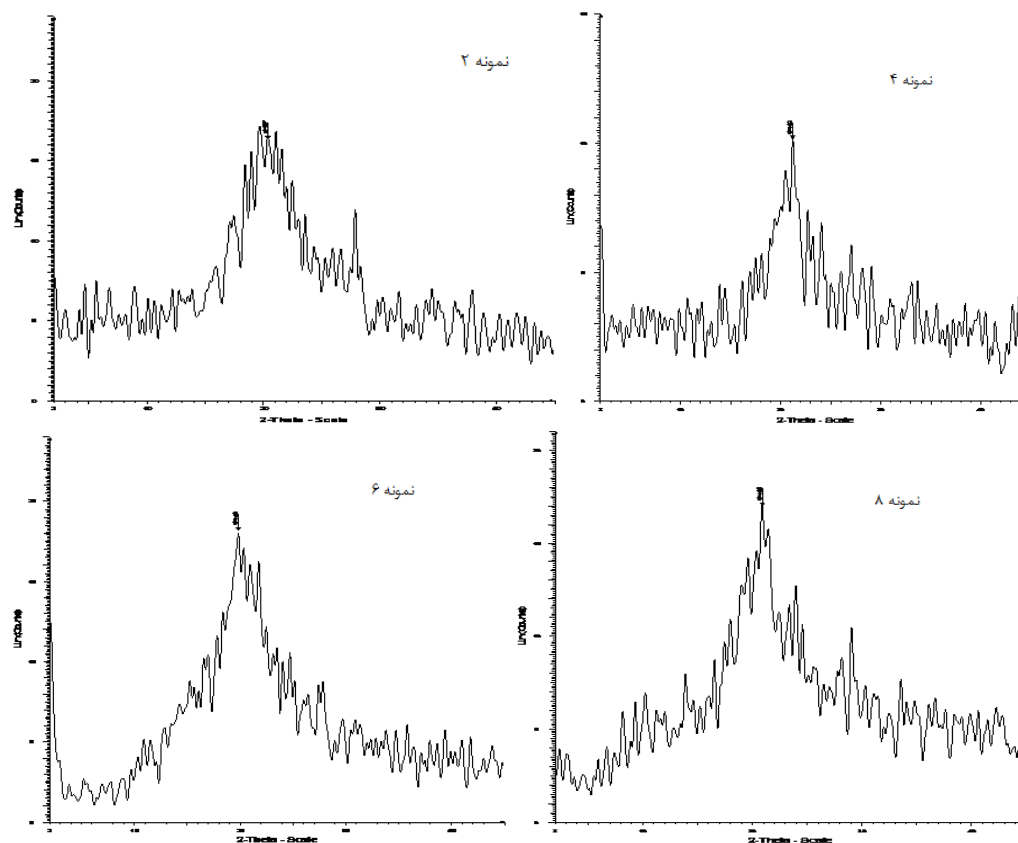
شکل 1. نمودارهای الف) ذوب حاصل از مرحله اول و ب) انتقال شیشه‌ای حاصل از مرحله دوم گرمادهی آزمون گرماسنجی روبشی افتراقی اعمالی به نانوکامپوزیت شماره 1

نتایج آزمون پراکنش اشعه ایکس: کیتوزان قالب
ریزی شده الگوی پراکنشی با پیک نسبتاً گسترده به مرکزیت 20 حدود 20 درجه نشان داد که بیانگر طبیعت نیمه آمورف فیلم کیتوزان بود. نانوسلولز مورد استفاده دارای ماهیت کریستالی بود که پژوهش پیشین انجام شده توسط داداشی و همکاران در سال 2011 روی همین نانوذره، وجود یک پیک قوی در موقعیت 30/26 درجه را تایید کرده بود. از مقایسه نتایج نمونه شماره 2 با نمونه شماره 4 در جدول 3 مشخص شد که با افزودن نانوذرات سلولز اگرچه موقعیت پیک کیتوزان به سمت زوایای بالاتر تغییر کرده و به

محدوده‌ی پیک نانوسلولز نزدیک شده بود اما اولاً شدت پیک بسیار کاهش یافت، دوم این که فاصله بین صفحات نیز کمتر گردید؛ فاصله کم بین صفحات نشان‌دهنده این حقیقت بود که زنجیره‌های نانوسلولزی نتوانسته بودند به نحو مناسبی در میان صفحات کیتوزان باز شوند. از مقایسه نتایج نمونه شماره 6 با نمونه شماره 8 مشخص شد که با کاهش مقادیر گلیسرول، شدت پیک افزایش یافت و فاصله بین صفحات نیز بیشتر شد که افزایش سطح زیر پیک نیز موید این مطلب بود (شکل 2).

جدول 3. نتایج آزمون پراکنش اشعه ایکس 4 نمونه نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز حاوی مقادیر مختلف نانوسلولز و گلیسرول

شماره نمونه	d-space (آنگستروم)	زاویه (درجه 2-تا)	شدت پیک (شمار)	مساحت ناخالص (Cps × 2-Theta°)	مساحت خالص (Cps × 2-Theta°)
2	4/37	20/304	16/4	322/7	164/60
4	4/20	21/160	10/2	104/3	52/14
6	4/48	19/791	18/2	331/7	218/60
8	4/25	20/874	17/0	202/8	86/55



شکل 2. نتایج آزمون پراکنش اشعه ایکس به دست‌آمده از نانوکامپوزیت‌های 2، 4، 6 و 8

کاهش جمعیت اسیدلاکتیک باکتری‌ها تا 1/3 سیکل لگاریتمی در دمای یخچال و تا حدود 3 سیکل لگاریتمی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نسبت به نمونه کنترل دست یافت (جدول 5). بیشترین تأثیر بازدارندگی نانوکامپوزیت در مقایسه با نمونه‌ی کنترل به گوشت‌های 4 و 6 روز نگهداری- شده در دمای 25 درجه سانتی‌گراد تعلق داشت که این بازدارندگی به ترتیب 2/25 و 3/08 سیکل لگاریتمی بود؛ آزمون pH هم نشان داد که در دو تیمار مذکور نانوکامپوزیت توانسته بودند pH گوشت را در مقایسه با نمونه‌ی کنترل به ترتیب 0/12 و 0/2 پایین‌تر نگه‌دارند (جدول 5). به طور موازی، کمترین تأثیر بازدارندگی نانوکامپوزیت در مقایسه با نمونه‌ی کنترل نیز مربوط به گوشت دو روز نگهداری‌شده در دمای 25 درجه سانتی‌گراد بود و اندازه‌گیری pH نمونه‌ها تایید کرد که فیلم خوراکی نتوانسته بود تغییری (مثبت نسبت به نمونه‌ی کنترل) در میزان pH گوشت ایجاد نماید.

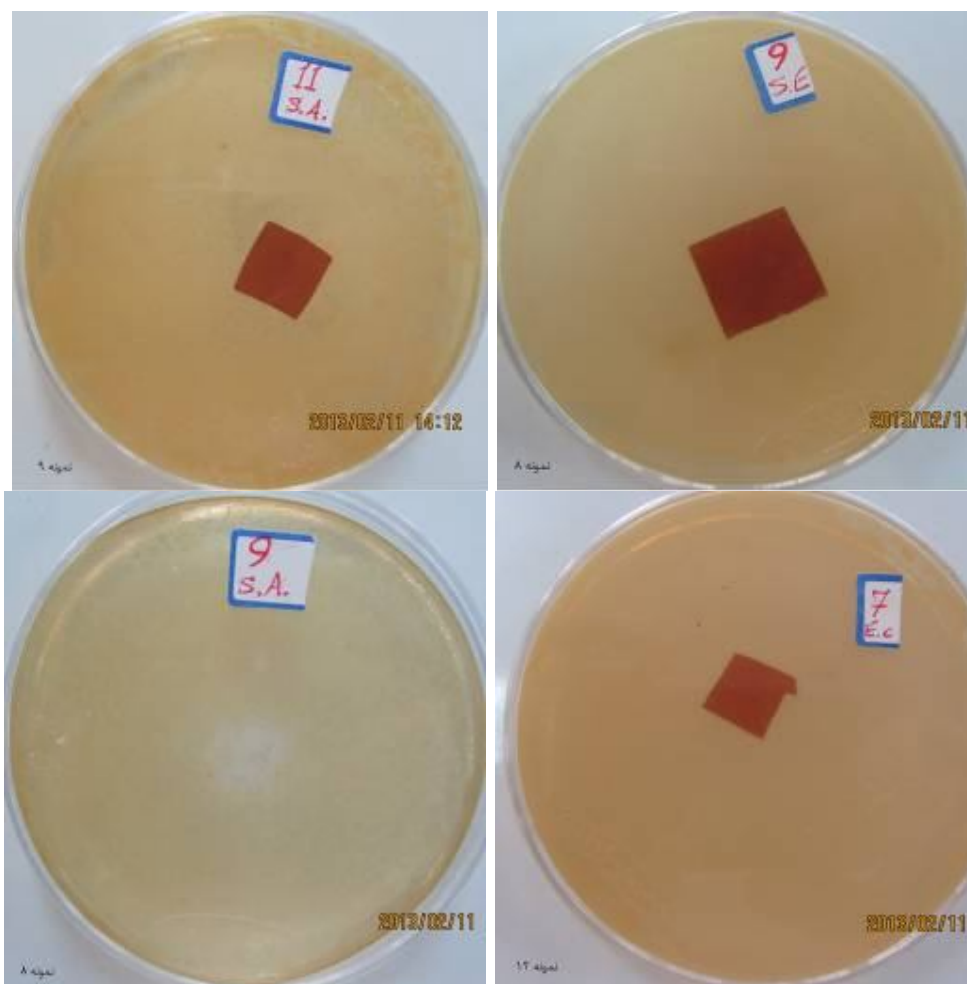
نتایج آزمون ضد میکربی: نتایج آزمون انتشار در محیط آگاردار در جدول 4 آمده است، نانوکامپوزیت‌های کیتوزان- نانوسلولز نسبت به باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس /اورئوس و باکتری‌های گرم منفی /شریشیاکلاهی و /سالمونلا /انتریتیدیس خاصیت کشندگی از خود نشان دادند. نانوکامپوزیت‌های کیتوزان-نانوسلولز فقط به اندازه وسعت سطح تماس خود خاصیت ضد میکربی ارائه کردند؛ به عبارت دیگر، خاصیت ضد میکربی نانوکامپوزیت‌ها مستقل از غلظت کیتوزان، نانوسلولز و گلیسرول مصرفی بود (البته در محدوده‌ی غلظتی انتخاب‌شده در پژوهش حاضر) و افزایش یا کاهش فاکتورهای سه‌گانه، هیچ‌گونه تأثیر افزایشی یا کاهشی در انتشار خواص ضد میکربی نانوکامپوزیت‌ها نداشت (شکل 3).

نتایج به کارگیری نانوکامپوزیت بر روی محصول: با به کارگیری نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز به منظور پوشش- دهی گوشت چرخ‌کرده به جای بسته‌بندی نایلونی می‌توان به

جدول 4. نتایج آزمون انتشار در محیط آگاردار متعلق به نانوکامپوزیت‌های کیتوزان-نانوسلولز

شماره نمونه	استافیلوکوکوس اورئوس	شریشیاکلاهی	سالمونلا انتریتیدیس
1	+	+	ت.ن.
2	+	+	+
3	+	+	ت.ن.
4	+	+	+
5	+	+	ت.ن.
6	+	+	+
7	+	+	ت.ن.
8	+	+	+
9	+	+	ت.ن.
10	+	+	ت.ن.
11	+	+	ت.ن.
12	+	+	ت.ن.
13	+	+	ت.ن.
14	+	+	ت.ن.
15	+	+	+

+ : عدم رشد باکتریایی در سطح تماس - : رشد باکتریایی در سطح تماس ت.ن. : تعیین نشده



شکل 3. نانوکامپوزیت های 8، 9 و 12 اعمال شده روی محیط‌های آلوده به سالمونلا، استافیلوکوکوس، اشریشیا (به ترتیب)؛ در نهایت سطح زیرین نانوکامپوزیت نمونه 8 (مرکز پلیت) که بر روی محیط آلوده به استافیلوکوکوس اعمال شده بود و عدم رشد را نشان داد نیز ارائه شده است.

جدول 5. تأثیر بازدارندگی نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز بر روی باکتری‌های بومی گوشت چرخ کرده بر حسب شمار جمعیت باکتریایی (لگاریتم واحدهای تشکیل کلنی/میلی‌لیتر) و pH نمونه‌ها بعد از اعمال شرایط معین انباری

شرایط انبارداری										کمیت اندازه گیری شده
25 درجه سانتی گراد					3 درجه سانتی گراد					
6 (روز)	4 (روز)	2 (روز)	صفر	6 (روز)	4 (روز)	2 (روز)	صفر			
2/36	[5/32] 3/07	[5/02] 5/04	2/48	[4/99] 3/94	4/68	4/00	2/48	-	اسیدلاکتیک باکتری	
[5/44]					[5/31]	*[5/30]			ها	
5/98	[5/44] 5/32	[5/2] 5/32	5/79	[5/51] 5/71	[5/6] 5/79	[5/7] 5/88	5/79		pH	
[6/18]										

* مقادیر مربوط به نمونه‌های گوشت چرخ کرده بسته‌بندی شده در نایلون (کنترل) درون کروزه نشان داده شده است.

• بحث

غلظت‌های بالاتر گلیسرول در نانوکمپوزیت کیتوزان-نانوسلولز، منجر به افزایش حجم خالی ماتریکس پلیمر و متعاقباً افزایش تحرک مولکول‌ها، تغییر ساختار فیزیکی فیلم و کاهش دمای انتقال شیشه‌ای شد (19). با افزایش درصد نانوسلولز، آنتالپی ذوب و نیز دمای انتقال شیشه‌ای روند نزولی نشان داد؛ علت این عملکرد را می‌توان به افزایش تحرک زنجیره‌های پلیمری کیتوزان در اثر فعل و انفعال با لایه‌های نانوسلولز نسبت داد (20). با افزایش نانوسلولز دمای ذوب کاهش یافت در نتیجه ساختار کریستالی کاهش یافته بود که موید این مطلب شدت پیک کمتر نانوکامپوزیت شماره‌ی 4 در مقایسه با نانوکامپوزیت شماره‌ی 2، به دست آمده توسط آزمون پراکنش اشعه ی ایکس، بود. حضور فیبرهای نانوسلولز منجر به کاهش تراکم زنجیره‌های کیتوزان و در نتیجه حصول ساختاری با درجه‌ی کریستالی پایین‌تر شد (21، 22).

در تحقیق حاضر، مقدار 1/3-1 درصد (وزنی/0/6 حجمی) کیتوزان قادر بود به طور کامل از رشد میکروارگانیسم‌ها بازدارد؛ به طور مشابه، Park و همکاران نیز در سال 2010 گزارش کردند که ورود مقادیر 0/3 و 0/7 درصد (وزنی/وزنی) کیتوزان به درون پلی‌اتیلن با دانسیته کم، نتوانست شمار جمعیت باکتری‌های/شریشیا کلای، لیستریا مونوسیتوجنس و سالمونلا/اتریتیدیس را به صفر برساند در حالی که ورود 1/4-2/1 درصد (وزنی/وزنی) کیتوزان بعد از 48 ساعت به طور کامل حضور این دو باکتری در محیط را به صفر رساند (23). همان طور که در منابع ذکر شده است خاصیت ضد میکربی کیتوزان مستقیماً تحت تأثیر خاصیت آبدوستی/آب‌گریزی آن است (24)؛ اگرچه، در این تحقیق، افزایش میزان نانوسلولز و گلیسرول باعث افزایش قابلیت انحلال در آب نانوکامپوزیت شد ولی تأثیری افزایشی یا کاهشی بر میزان فعالیت ضد میکربی کیتوزان نگذاشت.

با اعمال نانوکامپوزیت کیتوزان-نانوسلولز پس از یک هفته، تعداد اسیدلاکتیک باکتری‌های گوشت چرخ کرده در یخچال با دمای 1 درجه سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه کنترل کاهش یافت؛ Ouattara و همکاران در سال 2000 گزارش کرده بودند که در دمای 3 درجه و روی محصول گوشتی "پاسترامی" میزان کاهش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک توسط فیلم کیتوزانی (در مقایسه با کنترل) معادل 0/6 سیکل لگاریتمی بود. کاهش جمعیت نمونه

میکربی (نسبت به کنترل) در دمای یخچالی در ابتدای دوره سریع‌تر از انتهای دوره بود؛ آزادسازی اسیدهای آلی از ماتریکس کیتوزان در ابتدای دوره که شیب غلظت یون میان درون ماتریکس پلیمری و محیط بیرون، زیاد است سریع می‌باشد اما با پیشرفت واکنش، سرعت آزادسازی کاهش می‌یابد. نانوکامپوزیت پژوهش حاضر، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و طی یک هفته معادل 3 سیکل لگاریتمی جمعیت هدف را نسبت به نمونه کنترل کاهش داد. در دماهای بالا نسبت به دماهای پایین انبارداری، آزادسازی اسید استیک - که از عوامل بازدارنده‌ی رشد میکروارگانیسم‌ها است - از ماتریکس پلیمری سریع‌تر رخ می‌دهد. کاهش pH معادل 0/2 در نمونه‌ی پوشانده‌شده با نانوکامپوزیت در مقایسه با کنترل در این دما نیز صحت نظریه تأثیر اسیداستیک آزادشده از فیلم کیتوزانی در بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌ها را تأیید کرد.

از مباحث ارائه شده در این مقاله، نتیجه‌گیری می‌شود که نانوکمپوزیت‌های کیتوزان-نانوسلولز علاوه بر این مزیت آشکار که از مواد فراوان در طبیعت بوده و دارای قابلیت زیست‌تخریب‌پذیری نهایی بالایی نیز داشته، پایداری حرارتی مناسب‌تری نسبت به سایر پلیمرهای زیستی و قابلیت‌های بازیافتی بهتری نسبت به پلیمرهای سنتزی دارند. در ضمن، خاصیت ضد میکربی قوی این نانوکمپوزیت متمایزکننده‌ی این فیلم خوراکی از سایر پلیمرهای متداول در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد و بیانگر این حقیقت است که این نوع بسته‌بندی را می‌توان به عنوان گزینه‌ای مناسب برای بسته‌بندی مواد با سرعت فساد بالا و مدت ماندگاری کم، جایگزین کرد.

سپاسگزاری

از ستاد ویژه توسعه فناوری نانو به جهت همکاری‌های حمایت تشویقی، قدردانی می‌گردد. این پژوهش با همکاری مشترک دانشگاه‌های علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام گردید که از دو دانشگاه مذکور و مسئولین مرتبط قدردانی می‌شود. آزمایش‌های عملی پژوهش حاضر در آزمایشگاه پدیده‌های انتقال پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد که از مسئولین دست‌اندرکار این آزمایشگاه سپاسگزاری صمیمانه به عمل می‌آید.

• References

- Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Intl J Food Micmbiol*. 2000;62:139-48.
- Yalpani M, Johnson F, Robinson LE. Antimicrobial activity of some chitosan derivatives. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP, editors. *Advances in chitin and chitosan*. London: Elsevier Applied Science; 1992. p. 543.
- Klemm D, Heublein B, Fink HP. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed*. 2005;44:3358-93.
- Dadashi S. The effect of adding Nanoparticles on mechanical and thermal properties of PLA films [dissertation]. Karaj: University of Tehran, University College of Agriculture & Natural Resources, Faculty of Agronomy Engineering & Technology; 2011 [in Persian].
- Kim KW, Min BJ, Kim Y-T, Kimmel RM, Cooksey K, Park SI. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44(2):565-9.
- No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Intl J Food Micmbiol*. 2002;74:65-72.
- Korkeala HJ, Bjorkroth KJ. Microbial spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages. *J Food Prot*. 1997;60:724-31.
- Holley RA. Asymmetric distribution and growth of bacteria in sliced vacuum-packaged ham and bologna. *J Food Prot*. 1997;60:510-19.
- Siragusa GA, Dickson JS. Inhibition of *Listeria mono-cytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *J Food Sci*. 1992;57:293-6.
- Torres JA, Motoki M, Karel M.. Microbial stabilization of intermediate moisture food surfaces. I. Control of surface preservative concentration. *J Food Proc Pres*. 1985;9:75-92.
- Ouattara B, Simard RE, Piette G, Begin A, Holley RA. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan based antimicrobial packaging films. *J Food Sci*. 2000;65(5):768-73.
- Rhim JW, Hong SI, Ha CS. Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT- Food Science and Technology*. 2009;42:612-17.
- Cerqueira MA, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. *Food Hydrocolloids*. 2012;27(1):175-84.
- Mucha M, Pawlak A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*. 2005;427(1-2):69-76.
- Li B, Li J, Xia J, Kennedy JF, Yie X, Liu TG. Effect of gamma irradiation on the condensed state structure and mechanical properties of konjac glucomannan/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83(1):44-51.
- Zong Z, Kimura Y, Takahashi M, Yamane H. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer*. 2000;41(3):899-906.
- Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*. 2005;38(8):859-65.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Meat and meat products—Measurement of pH—Reference test method. ISIRI no 1028. 1st revision, Karaj: ISIRI; 1999 [in Persian].
- Roos Y, Karel M. Plasticizing effect of water of thermal the behaviour and crystallization of amorphous food models. *J Food Sci*. 1991;56(1):38-43.
- Kubies D, Scudla J, Puffr R, Sikora A, et al. Structure and mechanical properties of poly(L-lactide)/layered silicate nanocomposites. *Eur Polym J*. 2006;42: 888-99.
- Hassan M, Hassan E, Oksman K. Effect of pretreatment of bagasse fibers on the properties of chitosan/microfibrillated cellulose nanocomposites. *J Mater Sci*. 2011;46(6):1732-40.
- Noushivani N, Ghanbarzadeh B, Entezami A. Effect of cellulose nanocrystal and polyvinyl alcohol on the physical properties of starch based bionanocomposite films. *Iran J Nutr Sci Food Technol*. 2012;7(1):63-74 [in Persian].
- Park S-i, Marsh KS, Dawson P. Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. *Meat Sci*. 2010;85(3):493-9.
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Intl J Food Micmbiol*. 2010;144(1):51-63.

Assessing thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose nanocomposites to enhance the shelf life of ground meat

Dehnad D¹, Mirzaei H^{*2}, Emam-Djomeh Z³, Jafari S.M.⁴, Dadashi S⁵

- 1- M.Sc student in Food Science and Technology, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran
- 2- *Corresponding author: Associate prof, Dept. of Food Material and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran. Email: habibmirzaei@yahoo.ca
- 3- prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran
- 4- Assistant prof, Dept. of Food Material and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.
- 5- Ph.D. student in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Karaj, Iran

Received 23 May, 2013

Accepted 11 Sept, 2013

Background and Objectives: Chitosan is a natural antimicrobial compound against bacteria, yeast, and fungi. Cellulose nanoparticles have high biodegradability rates and are less expensive than other nanofillers. The present research prepared nanocomposites with high thermal stability that could significantly improve the shelf life of ground meat.

Materials and Methods: Chitosan-nanocellulose nanocomposites were prepared using chitosan powder with a molecular weight of 600-800 kDa, nanocellulose (20-50 nm in diameter) and absolute glycerol. The nanocomposites were examined using differential scanning calorimetry, x-ray diffraction, and agar disc diffusion tests. The performance of the edible film on improving the shelf life of ground meat was studied. The experiments were designed using Design-Expert software, response surface methodology and the Box-Behnken design.

Results: Results showed that increasing the nanocellulose level from 0 to 2% (w/w_{CHT}) decreased the melting point and glass transition temperature of the nanocellulose. Chitosan-nanocellulose nanocomposites provided antimicrobial effects against gram-positive and gram-negative bacteria throughout the contact area. The application of chitosan-nanocellulose nanocomposites to ground meat decreased the lactic acid bacteria population of the product up to 3 logarithmic cycles over the control sample.

Conclusions: The distinctive features of chitosan-nanocellulose nanocomposite (high thermal stability and antimicrobial properties) recommend this polymer as packaging for products that experience high spoilage rates and short shelf lives, such as meat products.

Keywords: Edible film, Plasticizer, Crystalline structure, Shelf life