



تولید نانوالیاف کامپوزیت پروتئین گاودانه-کیتوزان به روش الکتروریسی به منظور ریزپوشینه کردن اسانس نعناع

نوشین افشار^۱، هاجر شکرچی زاده^{۲*}، مهدی کدیور^۲، میلاد فتحی^۲

۱. کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۴، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۷/۵/۱۷، تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۴)

چکیده

یکی از مشکلات عمده در زمینه تولید نانو الیاف خالص از کیتوزان ویسکوزیته بالای آن است که یکی از روش‌های غلبه بر این مشکل مخلوط کردن آن با پلیمرهای طبیعی دیگر مانند پروتئین‌ها است. گاودانه منبعی ارزان از پروتئین و انرژی است. هدف از این تحقیق تولید نانو الیاف ترکیبی از کیتوزان و پروتئین گاودانه به روش الکتروریسی می‌باشد. لذا نانوالیاف کمپلکس کیتوزان-پروتئین به روش الکتروریسی با ولتاژ ۲۰ kV، فاصله سوزن تا صفحه جمع‌کننده ۱۵ cm و نرخ تغذیه ۰/۳ mL/h تهیه شد. نانو الیاف تهیه شده تحت بررسی شکل الیاف، طیف مادون قرمز تبدیل فوریه و پراش پرتو ایکس قرار گرفت. نانوالیاف حاصل میانگین قطر ۱۰۰ تا ۲۵۰ nm داشتند. نتایج به دست آمده از پراش پرتو ایکس نشان داد ساختار کریستالی بعد از تولید نانوالیاف کاهش پیدا کرده است. در ادامه امکان ریزپوشینه کردن اسانس نعناع در نانو الیاف کیتوزان-پروتئین بررسی شد. برای این منظور ۲۰٪ اسانس نعناع به محلول کمپلکس پروتئین-کیتوزان اضافه و همانند قبل الکتروریسی برای تولید نانوالیاف انجام شد. بررسی شکل الیاف، طیف مادون قرمز، پراش پرتو ایکس، رهائش اسانس و پایداری اسانس طی انبارداری بر روی نانوالیاف حاوی اسانس انجام شد. نتایج FTIR حضور اسانس نعناع در نانوالیاف تهیه شده را تایید کرد. راندمان ریزپوشینه دار کردن اسانس نعناع ۷۱٪ بود. ریزپوشانی کردن اسانس نعناع در نانوالیاف کیتوزان-پروتئین زمان ماندگاری اسانس را از ۴ به ۱۶ روز افزایش داد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان از نانو الیاف حاصل از کیتوزان و پروتئین گاودانه طی فرایند الکتروریسی به عنوان بستری مناسب برای ریز پوشینه کردن ترکیبات آب‌گریز مانند اسانس نعناع استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: نانو کامپوزیت، گاودانه، کیتوزان، الکتروریسی، نانوالیاف، اسانس نعناع.

۱. مقدمه

طبق تعریف انجمن بین المللی ابتکارات نانو تکنولوژی، نانو تکنولوژی درک و کنترل ماهیت ماده در ابعادی به اندازه ۱ تا ۱۰۰ nm است که با پدیده‌های منحصر به فرد کاربردهای جدیدی را پیش رو می‌گذارند [۱]. در میان نانو ساختارهای مختلف، نانو الیاف‌ها مناسب‌تر هستند، زیرا قادرند به راحتی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی مختلفی تهیه شده و تولید آن‌ها قابل کنترل است به نحوی که خصوصیات عملکردی آن‌ها در طی تولید قادر به تغییر و دستکاری می‌باشد و می‌توانند به عنوان سیستم‌های حامل برای انتقال عوامل ضد میکروبی، داروها، رنگ‌ها، طعم دهنده‌ها، آنتی اکسیدان‌ها و دیگر ترکیبات عملگر استفاده شوند. هم‌چنین نانو الیاف برای رهایش کنترل شده ترکیبات به کار می‌روند. نانو الیاف به صورت الیاف با قطر کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر تعریف می‌شود.

نانو کامپوزیت راهکار جدیدی برای بهبود خواص پلیمرها است. خواص ممانعت‌کنندگی، استحکام مکانیکی، ممانعت از نفوذ گازها و نیز مقاومت حرارتی نانو کامپوزیت‌ها در مقایسه با کامپوزیت‌های عادی مرسوم بهبود یافته است. از جمله نانو کامپوزیت‌ها می‌توان به نانو کامپوزیت‌های تقویت شده با نانو الیاف اشاره نمود. این نانو الیاف‌ها به روش‌های مختلفی تولید می‌شوند که از جمله این روش‌ها الکتروریسی است [۲، ۳].

الکتروریسی به عنوان یک روش ریزپوشینه دار کردن، توانایی به دام انداختن مواد درون نانو الیاف برای انتقال آن‌ها به درون سیستم‌های غذایی را دارد. الکتروریسی شامل کشش دادن سیالی که به صورت پلیمر مذاب و یا محلول پلیمر است می‌باشد. در روش الکتروریسی از بارهای الکتریکی استفاده می‌کنند. این بارها بر سیال اعمال می‌شود تا یک نیروی کششی به سمت صفحه جمع‌کننده الیاف ایجاد شود. به عبارت دیگر اختلاف پتانسیل بین نوک سوزن و این صفحه جمع‌کننده برقرار می‌شود. زمانی که یک ولتاژ بالای کافی به کار برده شود، یک جریان مداوم از قطرات محلول پلیمر که در نوک سوزن قرار دارد ساخته خواهد شد. زنجیره‌های پلیمر که در محلول با هم درگیر هستند مانع از انفصال رشته بیرون آمده از جت الکتروریسی می‌شوند. پارمترهای فرایند مانند ولتاژ اعمال شده، نرخ جریان و فاصله بین سرنگ و جمع‌کننده، ویژگی‌های محلول مانند ویسکوزیته، غلظت، رسانایی، کشش سطحی و فرارایت حلال و پارامترهای محیطی

مانند رطوبت، دما و جریان هوا، تاثیرات مشخصی بر خصوصیات نانو الیاف می‌گذارند.

ما و همکاران کامپوزیتی از ایزوله پروتئین لوبیا و کیتوزان به روش الکتروریسی در محیط اسیدی تهیه کردند و از آن به عنوان بستر مناسبی برای حمل آنتی بیوتیک‌هایی مثل نایسین استفاده کردند [۴]. چن و همکاران کامپوزیتی از کلاژن-کیتوزان و پلی اتیلن اکسید به روش الکتروریسی تهیه کرده و گزارش دادند می‌توان از کامپوزیت ایجاد شده در تولید فیلم خوراکی استفاده کرد [۵]. چن و همکاران کامپوزیتی از نشاسته و استات سلولز به منظور تولید فیلم خوراکی به روش الکتروریسی تهیه کردند [۶]. وانگ سانگ و همکاران کامپوزیتی مرکب از پروتئین زئین-کیتوزان و پلی اتیلن اکسید به روش الکتروریسی تهیه و از آن برای ریزپوشانی آلفا توکوفرول استفاده کردند [۷].

یکی از جذاب‌ترین گونه‌های حبوبات برای تولید دانه و علف خشک گاودانه است. دانه‌های گاودانه از نظر کشت و برداشت محصولی فوق‌العاده به شمار می‌آید، زیرا در خاک‌های خیلی سطحی و قلیایی می‌تواند رشد کند. گاودانه منبعی ارزان از پروتئین و انرژی است.

کیتوزان یک پلی ساکارید کاتیونی ضعیف است که در اثر استیل زدایی از کیتین تهیه می‌گردد. به‌طور عمده از پیوندهای (۴ و ۱) ۲-آمینو ۲-دئوکسی-D-گلوکان تشکیل شده است. کیتوزان چندین گروه قطبی مانند OH و NH₂ دارد که می‌تواند به عنوان گیرنده الکترون عمل کند. تحقیقات اخیر نشان داده که تشکیل نانو الیاف از کیتوزان خالص به روش الکتروریسی مشکل است. مشکل اصلی تهیه محلول کیتوزان مناسب برای فرایند الکتروریسی با غلظت بالا و ویسکوزیته کم است [۵، ۸، ۹].

با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون کامپوزیتی از پروتئین گاودانه و کیتوزان تهیه نشده است. لذا در این بررسی ابتدا این کامپوزیت تهیه و سپس نانو الیاف کامپوزیت حاصل به روش الکتروریسی ساخته شد. در مرحله دوم از نانو الیاف تهیه شده برای ریزپوشینه دار کردن اسانس نعناع استفاده شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. مواد

گاودانه از بازار محلی خمینی شهر، اسانس نعناع از شرکت پگاه اصفهان و کیتوزان از شرکت سیگما خریداری و سایر مواد

۶.۲. الکتروریسی محلول

در ابتدا الکتروریسی محلول پروتئین گاودانه-کیتوزان با نسبت‌های مختلف در شرایط محیط و شرایط مختلف دستگاهی مورد بررسی قرار گرفت. شرایط محیط دمای 25°C و رطوبت نسبی ۳۰٪ بود. شرایط مختلف دستگاهی شامل ولتاژ در محدوده ۱۲ تا ۲۰ kV، نرخ تغذیه محلول الکتروریسی در محدوده ۰/۱۲۵ تا ۰/۵ mL/h و فاصله سر سوزن تا سطح جمع‌کننده نانوالیاف در محدوده ۹ تا ۱۵ cm بود. برای انتخاب شرایط دستگاهی بهینه در هر بار دو پارامتر ثابت در نظر گرفته شد و پارامتر سوم در محدوده ذکر شده تغییر داد. تمام نمونه‌ها پس از الکتروریسی توسط میکروسکوپ نوری کون مدل اسلیپس E600، ساخت کشور ژاپن مورد بررسی قرار گرفت تا شرایط مناسب برای دستیابی به الیافی با کم‌ترین گره و بیش‌ترین یکنواختی تعیین شود.

۷.۲. بررسی خواص نانوالیاف تهیه شده

ساختار نانو الیاف با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ و میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل هیتاچی S-4160، ساخت کشور کره مورد بررسی قرار گرفت. پس از عکس برداری قطر الیاف تولیدی توسط نرم افزار Image اندازه‌گیری و سپس میانگین قطری نانوالیاف به کمک نرم افزار Excell تعیین شد. همچنین از طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه مدل JASCO، ساخت کشور ژاپن و پراش پرتو ایکس مدل فیلیپس ایکسپرت، ساخت کشور هلند برای بررسی خواص نانوالیاف تهیه شده استفاده شد.

۸.۲. ریزپوشینه دار کردن اسانس نعنای

از نسبت بهینه انتخاب شده در مرحله قبل جهت تهیه محلول استفاده گردید. در این مرحله از نسبت‌های مختلف اسانس نعنای به میزان ۱۰، ۲۰ و ۳۰٪ جهت تشخیص نسبت بهینه برای ریزپوشانی کردن اسانس نعنای استفاده شد. بعد از افزودن اسانس، محلول حاصل به مدت ۲ h در شرایط محیطی همزده و بلافاصله الکتروریسی گردید. به منظور بررسی خواص محلول تهیه شده ویسکوزیته و هدایت الکتریکی آن اندازه‌گیری شد.

۹.۲. بررسی ویژگی‌های نانوالیاف حاوی اسانس نعنای

ویژگی‌های نانوالیاف حاوی اسانس نعنای با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰، میکروسکوپ الکترونی

شیمیایی مورد استفاده شامل تری فلئورو استیک اسید، هیدرو کلریک اسید و هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲.۲. استخراج پروتئین از دانه گاودانه

ابتدا دانه‌های گاودانه به صورت دستی کاملاً تمیز و عاری از هر گونه ناخالصی شد. دانه‌ها با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی کاملاً آسیاب و به منظور یکنواختی هر چه بیش‌تر ذرات از الک مش ۴۰ استفاده شد. پودر حاصل در آب مقطر قلیایی $\text{pH} = 11$ با نسبت ۱ به ۱۰ وزنی- حجمی خیسانده شد. مخلوط به مدت ۱ h به هم زده شد تا پروتئین به صورت کاملاً محلول در آمده و از ترکیبات غیر پروتئینی جدا شود. سپس مخلوط در ۳۲۰۰ g به مدت ۱۰ min سانتریفوژ و بعد از آن محلول رویی جمع آوری و pH آن با ۰/۱ N HCL به ۵/۴ رسانده شد. در ادامه سانتریفوژ دوباره انجام و رسوبات حاصل در شرایط خلا در دمای 40°C خشک گردید.

۳.۲. تهیه محلول کیتوزان-پروتئین

برای این منظور از نسبت‌های مختلف کیتوزان و پروتئین جهت ایجاد محلول بهینه استفاده شد. از تری فلئورو استیک اسید به عنوان حلال استفاده گردید. بعد از آماده سازی، محلول در شرایط محیطی به مدت ۱۲ h بر روی هم زن مغناطیسی هم زده شد و سپس به مدت یک هفته در ظرفی درب بسته و تیره در شرایط محیطی نگهداری گردید.

۴.۲. اندازه‌گیری ویسکوزیته محلول پلیمری

اندازه‌گیری ویسکوزیته محلول‌های پروتئین گاودانه، کیتوزان و کمپلکس پروتئین-کیتوزان در دمای اتاق و با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد R VDV-II، ساخت کشور آمریکا و اسپیندل شماره ۲۱، سرعت چرخش ۵۰ rpm، زمان ۲ min و حجم نمونه ۱۰ mL انجام شد [۳].

۵.۲. اندازه‌گیری هدایت الکتریکی محلول پلیمری

هدایت الکتریکی محلول‌های پروتئین، کیتوزان و کمپلکس پروتئین-کیتوزان با استفاده از هدایت سنج دیجیتال مدل ۱۰۳، ساخت کشور تایوان برای تمام محلول‌های تهیه شده اندازه‌گیری شد [۳].



ابتدا ۲۴ mg از نانوالیاف حاوی اسانس تهیه و به صورت نمونه‌های ۲ mg در ۱۲ عدد اپندورف توزین شد. سپس اپندورف‌ها با درب نیمه باز داخل دسیکاتور با رطوبت نسبی ۳۳٪ قرار گرفتند. دسیکاتور در آون با دمای 25°C قرار گرفت. در هر روز از آزمایش ۲ عدد اپندورف مربوط به نمونه‌ها از آون خارج و در ۵ mL اتانول حل شدند. بعد از فیلتر کردن آن‌ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی با قطر منفذ $0.45\ \mu\text{m}$ ، جذب در طول موج ۲۸۲ nm خوانده شد. هم‌چنین به منظور مقایسه پایداری اسانس در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده، مقدار ۱۰ μL از اسانس به همان صورت نمونه-های نانوالیاف، در اپندورف‌های مجزا قرار گرفته و داخل آون قرار داده شدند. در زمان‌های اشاره شده ۲ عدد اپندورف برداشته و کل محتوی اپندورف در اتانول حل و سپس جذب آن خوانده شد و با استفاده از رابطه (۳) درصد رهایش اسانس طی انبارداری محاسبه شد [۱۲].

۳. نتایج و بحث

۳.۱. تهیه محلول پلیمر برای الکتروریسی

به منظور تهیه نانوالیافی با کم‌ترین قطر و گره، درصد‌های مختلف کیتوزان و پروتئین گاودانه و غلظت‌های مختلف کمپلکس در اسید تهیه و مورد الکتروریسی قرار گرفت. نانوالیاف‌های تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت استفاده از محلول حاوی ۲٪ کیتوزان و ۵٪ پروتئین گاودانه و در نتیجه غلظت ۷٪ کمپلکس در اسید به‌عنوان بهترین محلول برای الکتروریسی و تهیه نانوالیاف انتخاب شد. در انتخاب بهترین درصد اسانس نعنای نیز، غلظت ۲۰٪ برای دستیابی به نانوالیافی مناسب از نظر شکل ظاهری و یکنواختی و میزان گره‌ها به‌عنوان درصد بهینه انتخاب شد.

۳.۲. بررسی ویژگی‌های محلول پلیمری

۳.۲.۱. بررسی ویسکوزیته محلول

مطابق جدول (۱) ویسکوزیته محلول کیتوزان به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از محلول پروتئین است که می‌توان آن را به وزن ملکولی بیش‌تر پلیمر کیتوزان نسبت داد. بعد از تهیه کمپلکس پروتئین گاودانه با کیتوزان ویسکوزیته کمپلکس حاصل نسبت به ویسکوزیته پروتئین افزایش و نسبت به

رویشی، طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه و پراش اشعه ایکس مورد بررسی قرار گرفت.

۳.۲.۱. راندمان ریزپوشینه دار کردن اسانس نعنای

۱۰ mg از نمونه الیاف حاوی اسانس در ۱۰ mL اتانول در ظرف درب بسته به مدت ۱۵ min کاملاً مخلوط و سپس با استفاده از فیلتر سرسرنگی صاف و جذب آن در طول موج ۲۸۲ nm خوانده و با استفاده از رابطه‌های زیر راندمان و میزان بارگیری اسانس محاسبه شد [۱۰].

$$(1) \text{ راندمان ریزپوشینه دار کردن} =$$

$$100 \times (\text{مقدار اسانس اولیه} / \text{مقدار اسانس ریزپوشینه دار شده})$$

$$(2) \text{ میزان بارگیری اسانس} =$$

$$100 \times (\text{وزن نانوالیاف حاوی اسانس} / \text{وزن اسانس ریزپوشینه دار شده})$$

۳.۲.۱۱. بررسی رهایش اسانس نعنای در مدل سیستم شبیه

سازی شده معده

برای بررسی رهایش، نانوالیاف به دقت از سطح ورقه آلومینیوم جداسازی شده و به قطعاتی با وزن حدود ۱۰ mg بریده شدند. هر قطعه در ۲۵ mL از محیط شبیه سازی شده معده قرار داده شد و به‌طور مداوم در دور ۱۰۰ rpm با استفاده از یک همزن مغناطیسی هم زده شد. برای تهیه محیط شبیه سازی شده معده، از کلریدریک اسید ۰/۲ M و پتاسیم کلرید ۰/۲ M استفاده شد تا pH محیط به ۱/۲ برسد. برای بررسی رهایش در زمان‌های مختلف ۳ mL از محلول برداشته شده و بعد از صاف کردن با صافی ۰/۴۵ میکرون، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۸۲ nm جذب آن خوانده شد. درصد رهایش با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد [۱۱].

$$(3) \text{ درصد رهایش اسانس} =$$

$$100 \times (\text{مقدار کل اسانس ریزپوشینه شده} / \text{مقدار اسانس رها شده})$$

۳.۲.۱۲. میزان پایداری اسانس نعنای در نانو الیاف طی

انبارداری

انبارمانی به مدت ۲۰ روز در فواصل ۴ روزه یعنی در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۰ ارزیابی شد. روش کار بدین صورت بود که

جدول (۱) هدایت الکتریکی و ویسکوزیته محلول‌های تهیه شده جهت الکترورسی.

Table 1 Electrical conductivity and viscosity of prepared solutions for electrospinning.

ویسکوزیته viscosity (centipoise)	هدایت الکتریکی electrical conductivity (microsiemens/cm)	محلول solution
16	0.4	پروتئین گاودانه Bitter Vetch protein
1020	1.5	کیتوزان Chitosan
530	0.92	پروتئین-کیتوزان Chitosan-Protein
520	0.9	پروتئین-کیتوزان-اسانس Chitosan-Protein-Essential oil

شد. پس از افزودن اسانس نعنای به محلول کمپلکس پروتئین-کیتوزان، مجدداً شرایط دستگاهی تغییر داده شد تا بهترین نمونه توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شود. شرایط دستگاه برای الکترورسی نانوالیاف حاوی اسانس نعنای عبارت بودند از: ولتاژ ۲۰ kV، فاصله نوک سوزن تا جمع‌کننده ۱۵ cm و نرخ جریان ۰/۲ mL/h.

۴.۳. بررسی قطر و ساختار نانو الیاف

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف حاصل از الکترورسی پروتئین-کیتوزان و نانوالیاف حاوی اسانس نعنای در نسبت بهینه در شکل (۱) نشان داده شده است. قطر الیاف پروتئین-کیتوزان به‌طور متوسط بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ nm اندازه‌گیری شد. چن و همکاران بعد از الکترورسی کلاژن و کیتوزان در تری فلئورو استیک اسید میانگین قطر را بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ nm گزارش کردند. هم‌چنین گزارش کردند با افزایش میزان کیتوزان قطر الیاف کاهش می‌یابد ولی به دلیل ایجاد ویسکوزیته بالا در غلظت-های بیش‌تر کیتوزان الکترورسی امکان پذیر نبوده است [۵]. افزودن اسانس موجب کاهش هدایت الکتریکی و در نتیجه کاهش جت پلیمر در حین الکترورسی شده و همین امر سبب افزایش قطر الیاف شده است. قطر الیاف به‌طور متوسط در محدوده ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ nm افزایش یافته است. هدایت الکتریکی محلول تأثیر به‌سزایی بر قطر نانو الیاف دارد. افزایش هدایت محلول باعث افزایش توزیع بار در جت الکترورسی می‌شود. در نتیجه نیروهای کششی بیش‌تری بر نانوالیاف وارد شده و این عامل سبب تولید الیاف باریک‌تر و یکنواخت‌تر می‌شود در صورتی که الکترورسی محلول با هدایت الکتریکی پایین سبب افزایش قطر می‌شود. این

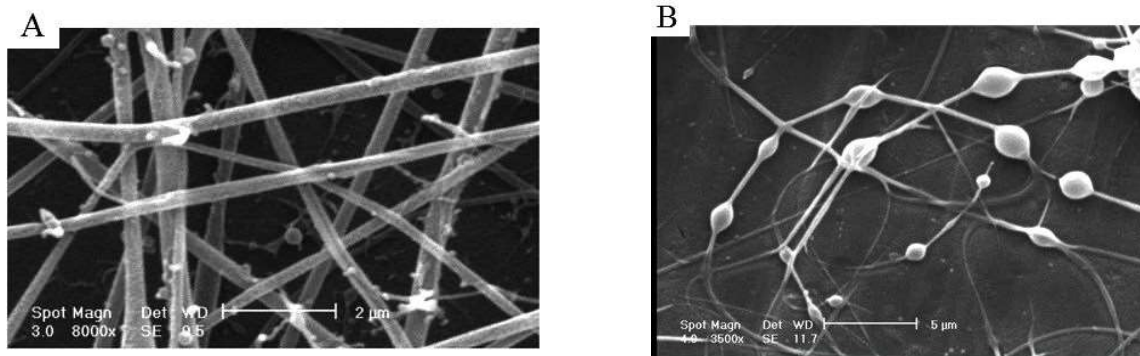
ویسکوزیته کیتوزان کاهش یافت که این تغییر نشان دهنده برهمکنش بین ملکولی این دو ماده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بعد از افزودن اسانس تغییر محسوسی در ویسکوزیته ایجاد نشد که به دلیل حجم بسیار کم اسانس اضافه شده می‌باشد. به‌طور معمول با افزایش ویسکوزیته، قطر الیاف نیز افزایش می‌یابد. احتمال دارد که این امر به دلیل مقاومت بیش‌تر محلول در مقابل کشیده شدن توسط بارهای سوار شده بر روی جریان شتابدار محلول اتفاق می‌افتد [۵، ۹].

۲.۲.۳. بررسی هدایت الکتریکی محلول

همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود، کیتوزان هدایت الکتریکی بالاتری نسبت به پروتئین گاودانه دارد. با توجه به گروه‌های آمینه قابل پروتونه شدن، کیتوزان یک پلیمر کاتیونی است و از نظر الکتریکی هادی است. مشاهده می‌شود که بعد از افزودن اسانس، هدایت الکتریکی کاهش پیدا کرده است که به دلیل غیر یونی بودن ساختار اسانس نعنای می‌باشد. افزایش هدایت الکتریکی محلول منجر به کاهش چشمگیری در قطر نانوالیاف می‌شود.

۳.۳. الکترورسی محلول‌های پروتئین-کیتوزان و پروتئین-کیتوزان-اسانس نعنای

در انتخاب بهترین شرایط دستگاه الکترورسی، ولتاژ، فاصله نوک سوزن تا جمع‌کننده و نرخ تغذیه مورد بررسی قرار گرفت. در انتخاب بهترین شرایط از میکروسکوپ نوری استفاده شد. با توجه به نتایج، ولتاژ ۲۰ kV، فاصله نوک سوزن تا جمع‌کننده ۱۵ cm و نرخ جریان ۰/۳ mL/h به‌عنوان شرایط بهینه انتخاب



شکل (۱) تصویر میکروسکوپ الکترونی (a) نانوالیاف پروتئین گاودانه-کیتوزان (b) نانوالیاف حاوی اسانس

Fig. 1 SEM of a) bitter vetch protein-chitosan nanofibers, b) nanofibers containing essential oil

و تا مرز گزارش کردند بعد از افزودن اسانس وانیل به نانوالیاف دکسترین و پلی و نیل الکل ساختار کریستالی به سمت آمورف پیش رفت [۱۴].

۶.۳. طیف سنجی مادون قرمز

آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز برای بررسی هر گونه بر هم کنش بین پروتئین گاودانه و کیتوزان و اسانس نعناع در نانوالیاف الکترونیسی شده انجام شد. شکل (۳) طیف مادون قرمز پروتئین گاودانه، کیتوزان، نانوالیاف کمپلکس کیتوزان-پروتئین و نانوالیاف کمپلکس کیتوزان-پروتئین حاوی اسانس نعناع را در محدوده عدد موج‌های 400 تا 4000 cm^{-1} نشان می‌دهد.

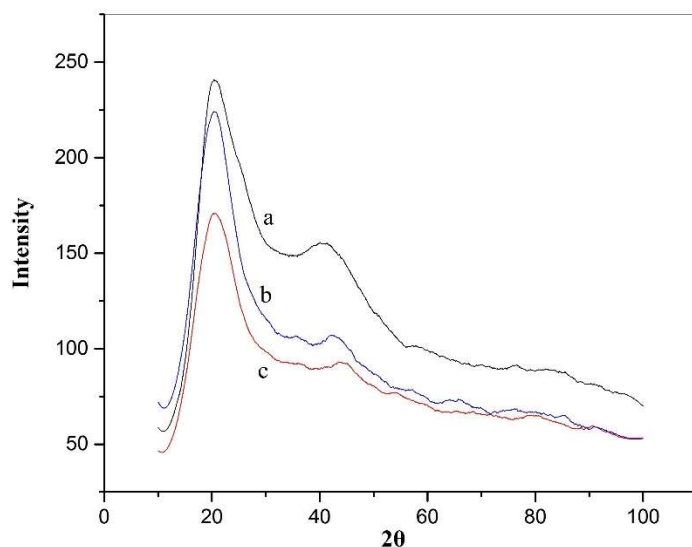
در طیف کیتوزان نوارهای مربوط به عدد موج‌های 1640 ، 1540 و 1240 cm^{-1} به ترتیب مربوط به آمید (۱) آمید (۲) و آمید (۳) می‌باشد. هم‌چنین نوارهایی در محدوده 3200 تا 3400 cm^{-1} ترکیبی از نوارهای مربوط به گروه‌های کششی OH و پیوندهای هیدروژنی درون ملکولی هستند. عدد موج در محدوده 1000 cm^{-1} مربوط به پیوند C=O و نوارهای ظاهر شده در محدوده 500 تا 1500 cm^{-1} شاخص‌های کربوهیدرات‌ها می‌باشد.

در نمونه پروتئین نوارهای مربوط به عدد موج‌های 1640 ، 1540 و 1240 cm^{-1} مشاهده می‌شود که به‌طور تقریبی مشابه کیتوزان است و به ترتیب مربوط به آمید (۱)، آمید (۲) و آمید (۳) می‌باشد. آمید (۱) شاخص‌ترین طیف در شناسایی ساختمان دوم پروتئین‌هاست. عدد موج محدوده 3000 cm^{-1} مربوط به گروه آلکان‌ها است.

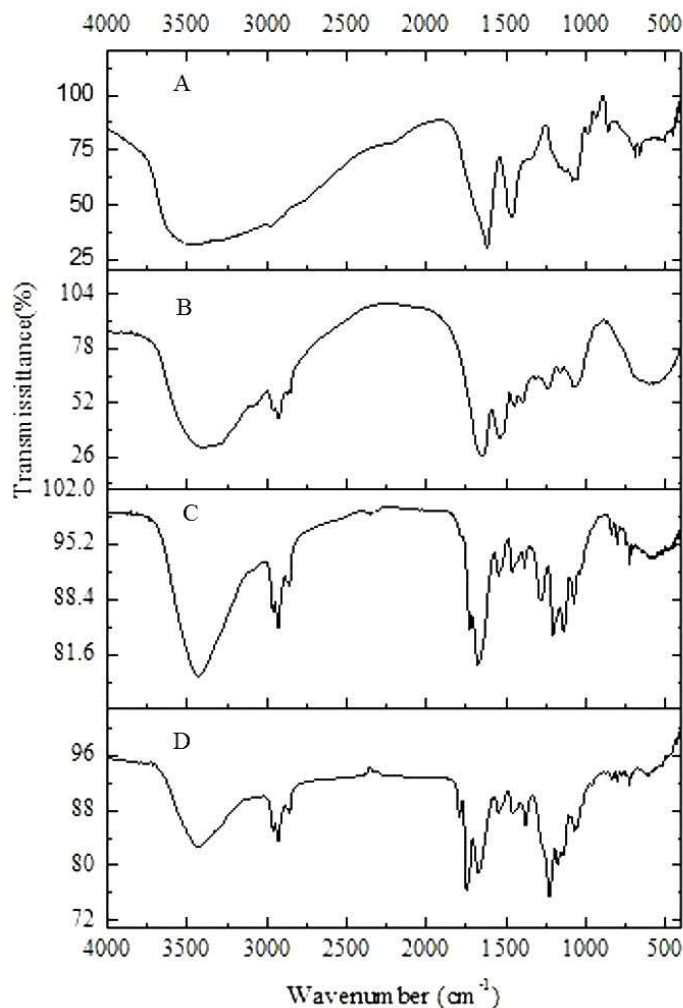
بدان علت است که ازدیاد طول جت توسط نیروی الکتریکی کافی نبوده و تولید الیاف یکنواخت امکان‌پذیر نیست. این نتایج با نتایج منگ و همکاران مطابقت داشت [۱۳]. وان سالک و همکاران از کامپوزیت ایجاد شده از زئین و کیتوزان برای ریز پوشانی کردن آلفاتوکوفرول استفاده کردند و میانگین قطر به‌دست آمده را بین 500 تا 700 nm گزارش کردند [۷].

۵.۳. آنالیز پراش اشعه ایکس

در این پژوهش از پراش اشعه ایکس برای نمونه‌های پروتئین گاودانه، نانوالیاف پروتئین-کیتوزان و نانوالیاف حاوی اسانس استفاده شد (شکل ۲). همانطور که مشخص است این الگوها برای هر سه نمونه تقریباً مشابه و در محدوده $2\theta = 20$ و $2\theta = 42$ پیک نشان داده‌اند که بیانگر ساختار نیمه بلوری هر سه نمونه می‌باشد. آنالیز پراش اشعه ایکس با استفاده از نرم افزار اوربجین درصد تبلور را برای نمونه‌ها مشخص کرد. پروتئین گاودانه درصد تبلور $61/2$ ، نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان درصد تبلور $58/8$ و نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان دارای اسانس نعناع درصد تبلور $56/2$ را دارا می‌باشند. درصد تبلور با تشکیل کمپلکس پروتئین-کیتوزان کاهش یافته است. در واقع با تشکیل کمپلکس در هر مرحله پیک پهن تر و شدت آن کم‌تر شده است. به عبارتی دیگر ساختار کریستالی به سمت ساختار آمورف پیش رفته است. در مورد نانوالیاف حاوی اسانس به دلیل آمورف بودن اسانس نعناع کاهش بیش‌تر درصد تبلور رخ می‌دهد. چن و همکاران گزارش کردند در هنگام الکترونیسی کامپوزیت کلاژن و کیتوزان با اسید تری فلئورو استیک اسید، کیتوزان و کلاژن نتوانستند کریستاله شوند و نانوالیاف حاصل ساختار آمورف داشت [۵]. کایا



شکل (۲) الگوی پراش اشعه ایکس (a) پروتئین گاودانه، (b) نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان، (c) نانوالیاف حاوی اسانس
Fig. 2. XRD patterns. a) bitter vetch protein, b) protein-chitosan complex nanofibers and c) nanofibers containing essential oil



شکل (۳) آنالیز طیف سنجی مادون قرمز (a) پروتئین گاودانه، (b) کیتوزان، (c) نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان و (d) نانوالیاف حاوی اسانس نعناع
Fig. 3. FTIR a) bitter vetch protein, b) chitosan, c) protein-chitosan complex nanofibers and d) nanofibers containing peppermint essential oil



و به تدریج رهایش افزایش یافته است. به طوری که پس از ۱ h، ۶۰٪ از اسانس از ساختار نانوالیاف خارج شده است. این در حالی است که پس از یک ساعت فرایند رهایش ثابت مانده و اسانس در ساختار نانوالیاف حفظ شده است. رهایش به‌طور نسبتاً سریع در ۱۰ دقیقه اول احتمالاً به اسانس موجود در سطح نانوالیاف مربوط است. پس از یک ساعت نیز بیش از ۴۰٪ اسانس درون نانوالیاف باقی مانده است که نشان از عدم تخریب کامل نانوالیاف در محیط شبیه سازی شده معده است و لذا نسبت خوبی از اسانس در برابر شرایط اسیدی معده سالم مانده و به‌طور دست نخورده به روده وارد می‌شود. این نتایج کارامدی نسبتاً خوب نانوالیاف تولید شده در ریزپوشانی کردن اسانس نعنای را نشان می‌دهد. رهایش فرولیک اسید ریزپوشینه شده در محیط معده بررسی و مشاهده شده است که ۶۰٪ از آنتی‌اکسیدان‌ها در مدت ۳۰ دقیقه رهایش می‌یابد [۱۱].

۹.۳. آزمون پایداری اسانس موجود در نانوالیاف طی

انبارداری

شکل (۵) پایداری اسانس نعنای ریزپوشانی شده در نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان و اسانس آزاد را نشان می‌دهد. سرعت آزاد شدن در ۹۶ ساعت اول خیلی سریع و حدود ۶۰٪ از اسانس بعد از ۹۶ h آزاد می‌شود. بخشی از دلیل بالا بودن مقدار اسانس آزاد شده می‌تواند به واسطه اسانس سطحی باشد. بعد از ۹۶ h، سرعت رهایش کند و بعد از ۳۵۰ h کل اسانس آزاد می‌شود. این در حالی است که اسانس آزاد پس از ۱۰۰ h به دلیل فراریت بالا، به‌طور کامل از بین می‌رود [۱۲]. پائولا و همکاران اسانس روغنی را در کیتوزان و صمغ کاشیو ریزپوشانی کردند و شاهد رهایش ۶۷ درصدی آن طی ۲۴ h بودند [۱۵].

۴. نتیجه گیری

به منظور تهیه نانوالیافی با کم‌ترین قطر و گره، استفاده از محلول حاوی ۲٪ کیتوزان و ۵٪ پروتئین گاودانه و در نتیجه غلظت ۷٪ کمپلکس در اسید به‌عنوان بهترین محلول برای الکترورسی و تهیه نانوالیاف انتخاب شد. در انتخاب بهترین درصد اسانس نعنای نیز، غلظت ۲۰٪ به‌عنوان درصد بهینه انتخاب شد. به منظور تهیه نانوالیاف، الکترورسی در ولتاژ ۲۰ kV، فاصله نوک سوزن تا جمع‌کننده ۱۵ cm و نرخ جریان ۰/۳ mL/h انجام

در مقایسه نانوکامپوزیت ایجاد شده از پروتئین و کیتوزان با طیف‌های پروتئین و کیتوزان، به جز جابه‌جایی پیک مربوط به آمید (۱) در ناحیه 1640 cm^{-1} به ناحیه 1680 cm^{-1} ، در آمید (۲) و (۳) جابه‌جایی پیک مشاهده نشد. اتصال پروتئین و کیتوزان از طریق گروه NH_2 کیتوزان و C=O پروتئین انجام شده که سبب جابه‌جایی آمید (۱) از ناحیه 1640 cm^{-1} به ناحیه 1690 cm^{-1} می‌شود. چن و همکاران گزارش کردند هنگام الکترورسی کیتوزان و کلاژن به دلیل مشابهت گروه‌های عاملی در هر دو ترکیب نوارهای جذبی مشابهی دیده می‌شود [۵، ۱۳، ۱۵].

شاخص اسانس نعنای گروه کربونیل (C=O) در محدوده عدد موج 1630 cm^{-1} می‌باشد [۱۶]. گروه کربونیل شاخص خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در نانوالیاف حاوی اسانس، نوار جدید در محدوده 1640 cm^{-1} دلیل اثبات حضور اسانس نعنای می‌باشد. هیچ نوار جدیدی در طیف نانوالیاف اسانس در مقایسه با طیف نانوالیاف فاقد اسانس مشاهده نمی‌شود که نشان دهنده عدم واکنش اسانس با کامپوزیت پروتئین-کیتوزان می‌باشد.

۷.۳. راندمان ریزپوشینه دار کردن و بارگذاری اسانس در

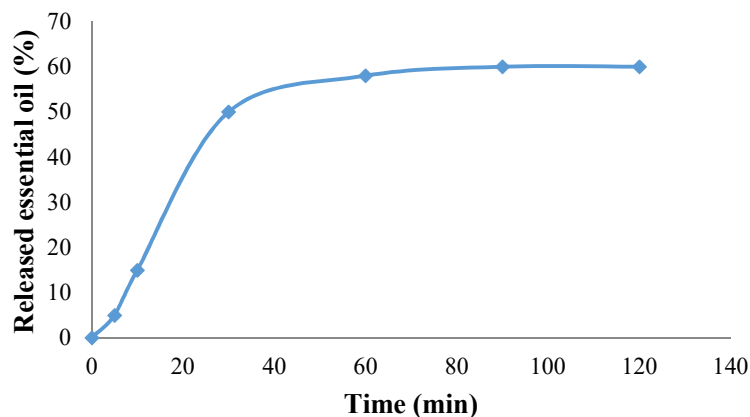
نانوالیاف

راندمان ریزپوشینه دار کردن اسانس نعنای ۷۱٪ و میزان بارگیری اسانس نعنای در نانوالیاف کمپلکس پروتئین-کیتوزان ۱۴٪ محاسبه شد. هازل و همکاران اسانس رزماری را در پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین ریزپوشینه دار کردند و نشان دادند که به دلیل خاصیت امولسیفایری پروتئین راندمان ریزپوشینه دار کردن اسانس افزایش یافت [۱۰]. وان سالک و همکاران درصد بارگذاری آلفاتوکوفرول در نانوالیاف کامپوزیت کیتوزان-زئین را ۱۷/۴٪ [۷] و قادری و همکاران نیز درصد بارگذاری اسانس آویشن و دارچین در نانوذرات کیتوزان را به ترتیب ۸/۵۱ و ۱۵/۸۳٪ گزارش کردند [۱۷]. نتایج مختلف نشان می‌دهد که ساختار ماده پوشش دهنده و نوع ماده پوشش داده شده تعیین کننده میزان راندمان و بارگذاری هستند.

۸.۳. نتایج آزمون رهایش اسانس در محیط شبیه سازی

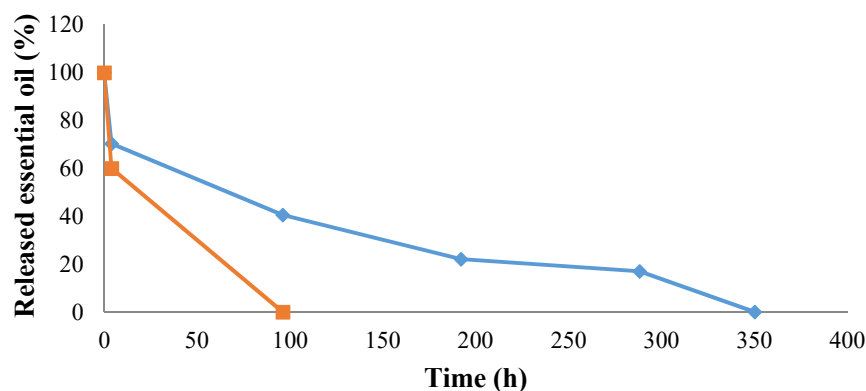
شده معده

نتایج آزمون رهایش (شکل ۴) نشان می‌دهد که در شرایط شبیه سازی شده معده در ۱۰ دقیقه اول ۱۵٪ رهایش اتفاق افتاده



شکل (۴) رهایش اسانس در محیط شبیه سازی شده معده

Fig. 4 Essential oil release in simulated stomach



شکل (۵) پایداری اسانس آزاد (دایره) و نانوالیاف حاوی اسانس (مربع)

Fig. 5 Stability of free essential oil (circle) and nanofibers containing essential oil (square)

شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف حاصل از الکتروریسی پروتئین- کیتوزان قطر الیاف را به طور متوسط بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ nm نشان داد. افزودن اسانس موجب کاهش هدایت الکتریکی و در نتیجه کاهش جت پلیمر در حین الکتروریسی شده و همین امر سبب افزایش قطر الیاف شد. نتایج XRD نشان داد که درصد تبلور با تشکیل کمپلکس پروتئین- کیتوزان کاهش یافته است. در مورد نانوالیاف حاوی اسانس نیز به دلیل آمورف بودن اسانس نفع کاهش بیش تر درصد تبلور رخ می دهد. نتایج FTIR حضور اسانس نفع در نانوالیاف تهیه شده را تایید کرد. راندمان ریزپوشینه دار کردن اسانس نفع ۷۱٪ و میزان بارگیری اسانس نفع در نانوالیاف کمپلکس پروتئین- کیتوزان ۱۴٪ محاسبه شد. ریزپوشانی کردن اسانس نفع در نانوالیاف کیتوزان- پروتئین زمان ماندگاری اسانس را از ۴ به ۱۶ روز افزایش داد. آزمون رهایش در شرایط شبیه سازی شده معده نشان داد که اسانس در محیط شبیه سازی شده معده تا حدود ۶۰٪ رهایش پیدا می کند.

شده. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوالیاف حاصل از الکتروریسی پروتئین- کیتوزان قطر الیاف را به طور متوسط بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ nm نشان داد. افزودن اسانس موجب کاهش هدایت الکتریکی و در نتیجه کاهش جت پلیمر در حین الکتروریسی شده و همین امر سبب افزایش قطر الیاف شد. نتایج XRD نشان داد که درصد تبلور با تشکیل کمپلکس پروتئین- کیتوزان کاهش یافته است. در مورد نانوالیاف حاوی اسانس نیز به دلیل آمورف بودن اسانس نفع کاهش بیش تر درصد تبلور رخ می دهد. نتایج

منابع

- polyvinyl alcohol nanoweb: prolonged shelf-life and high temperature. *J. Food Chem.*, 133, 641-649.
- [15] Paula, H.C.B., Sombra, F.M., M., Cavalcante, R.F., Abreu, O.M.S., Paula, R.C.M. (2011) Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with lippid sidoides essential oil. *Mater. Sci.*, 31, 173-178.
- [16] Ghayempur, S., Mortazavi, S.M. (2015). Microwave curing for applying polymeric nanocapsules containing essential oils on cotton fabric to produce antimicrobial and fragrant textiles. *Cellulose*, 22, 4065-4075.
- [۱۷] قادری قهفرخی، م. (۱۳۹۴) ریزپوشانی اسانس‌های آویشن و دارچین در نانو ذرات کیتوزان و بررسی اثرات نگهدارندگی آنها در همبرگر. پایان نامه دکترا. دانشگاه تربیت مدرس.
- [1] Lagaron, J.M., Lopez-Rubio, A. (2011). Nanotechnology for bioplastics: opportunities, challenges and strategies. *Trends Food Sci. Tech.*, 22, 611-617.
- [2] Megelski, S., Stephens, J.S., Chase, D.B. (2002). Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macro.*, 35, 4856-8466.
- [۳] دادگر، م. و مراتی، ع.ا. (۱۳۸۷) مقدمه‌ای بر الکتروسیسی و نانوالیاف. انتشارات جهاد دانشگاهی، ص ۱۷۳-۲۱۹.
- [4] Ma, W., Tang, C.H., Xiao, Q.Y. (2013). Fabrication and characterization of kidney bean protein isolate-chitosan composite films at acidic pH. *J. Food Hedro.*, 31, 237-247.
- [5] Chen, Z.G., Wang, P.W., Wei, B., Mo, X.M., Cui, F.Z. (2010). Electrospun collagen-chitosan nanofibr A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscell cell. *Acta Biomaterialia.*, 6, 372-382.
- [6] Chen, Q., Wang, S. (2009). Poly (vinyl alcohol) nanocomposites based on cellulose/starch by electrospinning. *J. Food Eng.*, 40, 218-226.
- [7] Wengasulak, S.W., Pathumban, S. (2014). Effect of entrapped alfa-tocopherol on mucoadhesivity and evaluation of the release degradation and swelling characteristics of zein-chitosan composite electrospun fibers. *J. Food Eng.*, 120, 110-117.
- [8] Geng, X., Kwon, O.H., Jang, J. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomat.*, 26, 5427-5432.
- [9] Kriegel, Ch., Arrechi, A., kit, K., Mcclements, D.J. (2012). A review on fabrication, functionalization and application of electrospinning biopolymer nanofibers. *Food Sci.*, 48, 775-797.
- [10] Huang, Z.M., Zhang, Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, 63, 2223-2253.
- [11] Aceituno-Medina, M., Sandra, M., Beatriz, A. Rodriguez, J. Ampara, L.R. (2015). Improved antioxidant capacity of quercetin and ferulic acid during in-vitro digestion through encapsulation within food-grade electrospun fibers. *J. Func Food*, 12, 332-341.
- [12] Li, Y., Yokoyama, L.A.W., Shoemaker, C.F., Wei, D., Ma, J., Zhong, F. (2013). Properties of chitosan-microencapsulated orange oil prepared by spray-drying and its stability to detergent. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 3311-3319.
- [13] Meng, J.Q., Yang-fang, Q., Yu ping, Z., Wei, J. (2015). Thermal behavior of electrospun gelatin and chitosan complex. *J. Therm. Sci.*, 19, 1323-1326.
- [14] Kaya, F., Tamer, U. (2012). Encapsulation vanillin/cyclodextrin inclusion complex in electrospun