

# افزایش زمان ماندگاری خاویار ایرانی با استفاده از لفاف‌های نانو نقره بر پایه دی اکسید تیتانیوم و تعیین میزان باقی ماندگی ذرات به روش تیتراسیون

سیما مرادی<sup>۱</sup>، عباسعلی مطلبی<sup>۲</sup>، سیدامیرعلی انوار<sup>۳</sup>، حامداهری<sup>۳\*</sup>، حامد بهشتی هاشیرازی<sup>۴</sup>، نوردهر رکنی<sup>۲</sup>، نکیسا سهرابی حقدوست<sup>۲</sup>، علیرضا مختاری<sup>۲</sup>، سوگند وحید<sup>۱</sup>، هدی رحمان‌نیا<sup>۵</sup>، نیوشا علیمحمدی<sup>۵</sup>

## چکیده

نانوپکیجینگ یکی از راهکارهای جدید بسته بندی برای افزایش کیفیت و امنیت مواد غذایی است که استفاده از پوشش های بسته بندی نانو تحولی بزرگ در صادرات محصولات فسادپذیر است. در این تحقیق تعداد ۳۸ بسته خاویار (۵ گرمی) که به ترتیب ۴ بسته در پوشش های عاری از نانو ۴ بسته در پوشش های ppm ۶۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ۴ بسته در پوشش های ppm ۵۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ۴ بسته در پوشش های ppm ۴۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ۴ بسته در پوشش های ppm ۲۰۰۰ با پایه نانوسیلور و ۴ بسته در پوشش های ppm ۱۰۰۰ با پایه نانوسیلور در دو تکرار مورد بررسی باکتریایی و قارچی قرار گرفتند.

بعد از انجام آزمایشات میکروبی و بعد از تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم و تشخیص باکتری گرم مثبت از نظر مورفولوژی بررسی و رنگ آمیزی گرم و برای بررسی بیشتر و تعیین نوع باکتری و قارچ بر روی محیط های اختصاصی برده و کشت گردیده شد که بعد از بررسی ۲۴ ساعت، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی و اسپرزیلوس فلاووس و پنی سیلیوم در نمونه های عاری از پوشش نانو مشاهده گردیده شد و لیکن در پوشش پوشش های ppm ۶۰۰۰ و ۵۰۰۰ بصورت معنی داری در کاهش رشد قارچی و باکتریایی موثر بوده، در نهایت به روش تیتراسیون به بررسی میزان نقره موجود در خاویارهای بسته بندی شده پرداخته شد که از طریق تیتراسیون با دستگاه تیترازور و اسید سولفوریک غلیظ، میزان باقی ماندگی نقره معادل صفر درصد بود.

استفاده از پوشش های ppm ۶۰۰۰ و ۵۰۰۰ با، کمتر از ۰/۰۵ بصورت معنی داری در کاهش رشد قارچی و باکتریایی موثر بوده، لذا با توجه به نتایج بدست آمده و عدم راهسازی ذرات نانو به درون خاویار می توان از این فن آوری جهت افزایش زمان ماندگاری این محصول ارزنده و همچنین ارتقاء صادرات در دنیا استفاده نمود.

واژگان کلیدی: زمان ماندگاری، خاویار ایرانی، تیتراسیون

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۱۹

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

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

۳\* استادیار، عضو هیئت علمی، دانشکده علوم مهندسی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد

اسلامی، تهران، ایران Dr.h.ahari@gmail.com

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

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

## مقدمه

تحقیقات اخیر در زمینه توسعه زمان ماندگاری و افزایش کیفیت مواد غذایی همسو با کاهش ضایعات مواد بسته بندی، منجر به تولید بسته بندی هایی با پایه زیستی نظیر فیلم های خوراکی و تجزیه ناپذیر از منابع قابل تجدید شده است. استفاده از این مواد به خاطر خاصیت تجزیه پذیر بودن آنها باعث حل بعضی از مشکلات در زمینه ضایعات شده است. نظیر هر بسته بندی دیگری، بسته بندی های زیستی نیز بایستی یک سری عملکردهای مهم شامل نگهداری و حفاظت از غذا، حفظ کیفیت حسی و ایمنی و دادن اطلاعات به مصرف کنندگان را داشته باشند (۱).

امروزه بسته بندی غذا به خصوص روی کنترل و تنظیم متمرکز شده است. در تکنولوژی های پیشرفته بسته بندی با استفاده از نانو موادی هوشمند انجام می شود که می توانند نسبت به شرایط محیطی پاسخ دهند و خود را ترمیم کنند و مصرف کننده را نسبت به آلودگی یا حضور پاتوژن آگاه کنند (۳).

بسته بندی های هوشمند در صنایع غذایی به محض شروع فساد در ماده غذایی در داخل بسته، از خود ماده نگهدارنده آزاد کرده و تغییرات دمایی، ترشح رطوبت و مایعات را از ماده غذایی

بالاست. بعلاوه خاویار غنی از ترکیبی به نام "ctacosand" است که نوعی الکل چرب با زنجیره بلند است و در بدن به اسیدهای چرب تبدیل می‌شود. این اسیدهای چرب به دست آمده در سنتز میلین (پوشش سلول عصبی) نقش بسزایی ایفا می‌کند. به همین دلیل مصرف خاویار در سلامت سلول‌های عصبی بسیار موثر است. در کشورهایی که ماهی و خاویار در عادات غذایی مردم جایگاه ویژه‌ای دارد، میزان ابتلا به افسردگی بسیار کمتر از دیگر کشورها است. وجود اسیدهای چرب "امگا ۳" در خاویار مانع از افزایش کلسترول خون و به دنبال آن باعث پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود. بعلاوه مصرف خاویار در پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های آرتريت روماتوئید (التهاب مفاصل)، بیماری‌های دستگاه گوارش و بعضی از انواع سرطان بسیار موثر است. خاویار از نظر عنصر آهن نیز غنی است و به همین دلیل مصرف آن در افراد مبتلا به کم‌خونی ناشی از فقر آهن نیز توصیه می‌شود. خاویار، تخم ماهیان خاویاری و از گران‌ترین غذاهای جهان است. دریای مازندران به عنوان بزرگ‌ترین منبع ماهیان خاویاری در جهان بیش از ۹۰ درصد خاویار جهان را تأمین می‌کند (همانگونه که در نگاره ۱ مشاهده می‌گردد). فیل ماهی یا بلوگا، تاس ماهی روسی یا چالباش، تاس ماهی ایرانی یا قره برون، ماهی شیب و ماهی ازون برون یا سوروگا، گونه‌های اصلی ماهیان خاویاری دریای خزر هستند (۵).



نگاره ۱- استحصال تخم خاویار بلوگا دریای خزر

داخل بسته تشخیص داده و به مصرف‌کننده اعلام می‌کنند. فیلم پلاستیکی شفاف‌ی به نام دورتان که حاوی نانو مواد رسی است در سراسر پلاستیک پراکنده است و قادر است که اکسیژن، دی‌اکسید کربن و رطوبت را برای حفظ خاویار و سایر غذاها مسدود کند. این ماده می‌تواند پلاستیک‌های روشن‌تر و مقاوم به حرارت ایجاد کند (۶).

همچنین در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی نوع دیگری از پلاستیک‌ها موجود است. در تولید این پلاستیک‌ها از فناوری نانو ذرات استفاده شده است. اکسیژن مسئله‌سازترین عامل در بسته‌بندی مواد غذایی است زیرا این عنصر باعث فساد چربی مواد غذایی و همچنین تغییر رنگ آنها می‌شود. در این پلاستیک جدید نانو ذرات به صورت زیگزاگ قرار گرفته‌اند و مانند سدی مانع از نفوذ اکسیژن می‌شوند.

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

پژوهشگران روی بطری‌های پلاستیکی برای بسته‌بندی نوشیدنی‌ها در حال تحقیق‌اند. این مواد عمر ماندگاری شش ماهه به نوشیدنی‌ها خواهند داد. با استفاده از نانوآکرها می‌توان پلاستیکی تولید کرد که عمر ماندگاری نوشیدنی‌ها را تا حدود ۱۸ ماه افزایش دهد (۴).

خاویاریک ماده غذایی پرانرژی است که طعم و بویی بسیار خوشایند دارد. به‌طور عمده پروتئین موجود در خاویار متشکل از اسیدهای آمینه آرژنین، هیستامین، ایزولوسین، لیزین و میتونین است. چربی موجود در خاویار نیز به دو دسته عمده تقسیم می‌شود که عبارتند از "۲۵ درصد کلسترول" و "۷۵ درصد لستین". مصرف خاویار از ابتلا به بیماری افسردگی و بیماری‌های قلبی عروقی پیشگیری می‌کند؛ چرا که در خاویار غلظت اسیدهای چرب از نوع امگا ۳ بسیار

## مواد و روش کار

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

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

## بررسی میکروبی خاویار

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

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

## ❖ بررسی اثر کیسه‌های حاوی رقت های نانو بر روی

### قارچ های تلقیح شده در نمونه خاویار

- ۱- ابتدا کیسه های مورد نظر در اندازه های مساوی ۵×۵ بریده شد و تعداد مورد نیاز در اتوکلاو استریل گردید.
- ۲- میزان ۱ گرم از نمونه خاویار در داخل کیسه های اتوکلاو شده بسته بندی گردید.

۳- تهیه رقت یک دهم از بسته های مورد نظر بعد از گذشت ۴ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۴°C (۱ گرم از خاویار موجود در پوشش مربوطه به لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی سی آب مقطر استریل اضافه و ورتکس گردید).

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

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

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

۱- ابتدا از پوشش‌های مورد نظر ابعاد مساوی ۵×۵ بریده و توسط اتوکلاو استریل گردید. برای جلوگیری از چسبیدن پوشش‌های پلاستیکی باید مابین آنها کاغذ صافی قرار داد. تعداد پوشش‌های پلاستیکی نانو شامل ۵ نوع رقت ppm ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰، ۶۰۰۰ بوده است.

۲- از سوش های باکتریایی مورد نظر، رقت های مختلف مورد استفاده در تحقیق را تهیه کرده که این کار با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند بوده که کدورتی معادل  $10 \times 1/5$  دارد انجام گردید.

۳- در این تحقیق از رقت های  $10^2$  تا  $10^8$  استفاده گردید.

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

۵- پوشش‌های بسته بندی شده در یخچال در دمای ۴°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید.

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

جهت آماده‌سازی نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی، ابتدا آماده سازی ذرات پوشش‌های بسته‌بندی درصدهای مختلف از طریق تهیه سوسپانسیون در حلال استونیتریل درون فالدکون‌های آزمایشگاهی انجام گردیده و مقدار ۳ ml از محلول حاصله را روی پایه دارای چسب گذارده تا حلال تبخیر گردد و سپس در دستگاه Spotter Coater که حاوی گاز آرگون می‌باشد بمنظور تثبیت روکش آب طلا (به روی نمونه‌های موجود برپایه) انتقال داده تا بعد از ۱۰ دقیقه نمونه‌ها به محفظه دستگاه میکروسکوپ انتقال یابند و در نهایت بعد از تنظیم میکروسکوپ SEM (*scanning electron microscope*) به روی بزرگنمایی ۱۰X تصاویر نمونه به روی مانیتور ظاهر گردید (۲).

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

#### تیتراسیون

نمونه‌های خاویار بسته بندی شده برای تست ماندگاری با دوزهای ppm ۱۰۰۰ و ppm ۲۰۰۰ و ppm ۴۰۰۰ و ppm ۵۰۰۰ و ppm ۶۰۰۰ بعد از انجام تست Shelf Life جهت ارزیابی اندازه گیری میزان نقره باقی مانده در آن نمونه‌ها به آزمایشگاه شیمی مواد غذایی ارسال گردید.

#### نمونه سازی

ابتدا نمونه‌ها را وزن کرده و بعد به نسبت وزن برداشته شده از نسبت ۱/۱ آب و اسید سولفوریک غلیظ برای حل کردن نقره درون خاویار استفاده شد، ظرف محتوی مواد را بسته و مدت ۴۸ ساعت نگه داری شد تا کاملاً نقره موجود آزاد گردد، سپس نمونه را صاف و پخاله‌های خاویار را دور ریخته و محلول صاف شده به حجم ۱۰۰cc رسانده شد.

#### انجام تست نقره

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

۶- بعد از ۴۸ ساعت محتویات پوشش‌های بسته بندی شده به داخل لوله‌های آزمایش منتقل گردید. تعداد ۷ عدد لوله مربوط به ۷ پوشش پلاستیکی نانو با محتویات داخل که شامل خاویار و ۷ رقت از باکتری که به طور جداگانه در هر پوشش به نمونه تلقیح گردید، مورد استفاده قرار گرفت و از محتویات این پوشش‌ها سوسپانسیونی با رقت یک دهم تهیه گردید.

۷- ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷<sup>o</sup> انکوبه گردید (۶).

#### ❖ بررسی رشد قارچ در پوشش‌های بسته‌بندی

۱- ابتدا کیسه‌های مورد نظر در اندازه‌های مساوی ۵x۵ بریده شد و در اتوکلاو استریل گردیده شد.

۲- میزان ۱۰ گرم از نمونه خاویار در داخل کیسه‌های اتوکلاو شده بسته‌بندی گردید.

۳- تهیه رقت یک دهم از بسته‌های مورد نظر بعد از گذشت ۴ روز انکوباسیون در دمای ۴ درجه

بدین صورت که ۱ گرم از خاویار موجود در پوشش مربوطه به لوله‌های آزمایش حاوی ۹ سی سی آب مقطر استریل اضافه و ورتکس گردید.

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

۵- گرمخانه‌گذاری پلیت‌های مورد نظر در دمای بین ۲۵ تا ۳۰ درجه انجام گردیده و بعد از گذشت ۴ روز قارچ رشد کرده در محیط شناسایی شد که شامل اسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم بود. میزان کلنی‌های جدا شده مربوط به هر پوشش متفاوت بودند. بدین معنی که رشد کلنی در پوشش نانو از ۱۰۰۰ تا ۶۰۰۰ کاهش داشته و در پوشش ppm ۶۰۰۰ قارچ اسپرژیلوس فلاووس جدا نشد.

#### ❖ بررسی مورفولوژی ذرات با میکروسکوپ الکترونی

SEM

صورتی که در پوششش ۶۰۰۰ کلنی قارچی در ۲۰ در صد سطح پلیت رویت شد (نگاره ۲).



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

جدول ۱: رقت‌های متعدد پوشش‌های بسته‌بندی در برابر رشد Ecoli

Nano film	۱۰ <sup>۲</sup>	۱۰ <sup>۳</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۵</sup>	۱۰ <sup>۶</sup>	۱۰ <sup>۷</sup>	۱۰ <sup>۸</sup>
۱۰۰۰	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
۲۰۰۰	۸۸۰	۱۰۵۰	.....	.....	.....	.....	.....
۳۰۰۰	۵۶۰	۱۱۰۰	۱۲۸۰	.....	.....	.....	.....
۴۰۰۰	۳۲۲	۶۲۸	۸۹۰	.....	.....	.....	.....
۵۰۰۰	۱۸۹	۲۹۰	.....	.....	.....	.....	.....
۶۰۰۰	۰	۲۸	۲۸۶	.....	.....	.....	.....

تکرار دوم:

Nano film	۱۰ <sup>۲</sup>	۱۰ <sup>۳</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۵</sup>	۱۰ <sup>۶</sup>	۱۰ <sup>۷</sup>	۱۰ <sup>۸</sup>
۱۰۰۰	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
۲۰۰۰	۸۶۸	۱۰۱۹	.....	.....	.....	.....	.....
۳۰۰۰	۵۵۴	۱۱۲۷	۱۲۸۱	.....	.....	.....	.....
۴۰۰۰	۳۲۶	۶۷۷	۸۷۸	.....	.....	.....	.....
۵۰۰۰	۱۸۲	۲۹۳	.....	.....	.....	.....	.....
۶۰۰۰	۰	۲۸	۲۸۸	.....	.....	.....	.....

نتایج این تحقیق برای بررسی تعداد کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت به صورت کیفی انجام گردید.  
.....= غیرقابل شمارش و عدم رشد =۰

ابتدا ۵CC از محلول آماده شده را با مقداری آب مقطر مخلوط، تا جایی که الکتروود و لوله ورودی KCL کاملاً درون محلول باشد، دستگاه را روشن کرده، میزان نمونه‌ای را که برداشته و نوع تست که بدست آوردن میزان نقره به PPM می‌باشد را توسط دستگاه تنظیم کرده، دستگاه بعد از واکنش Cl با Ag (تاجاییکه Ag در محیط می‌باشد) نقره موجود را به PPM نشان می‌دهد که برای اطمینان از Curve آن (نمودار نشان دهنده واکنش) میزان KCL مصرف شده را یاد داشت نموده و توسط فرمول  $M_1V_1=M_2V_2$  نرمالیه محلول بدست آورده شد (۶).  
\*نمونه خاویار ۱۰۰۰ PPM = باقی مانده نشان داده شده توسط دستگاه به ازای ۱۰۰ گرم محلول PPM ۷۰ بود.

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

میزان نرمالیه نقره موجود در محلول  $X = 0.00648$  PPM

$= 1000 \text{ gr/L} \times 0.00648 \text{ gr/mol} = 108 \text{ Mol/L} \times 0.00648$

$69/9 \text{ mgr/L} = 69/9$

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

## نتایج

### نتایج رشد قارچی پلیت‌ها

- میزان کلنی‌های جدا شده مر بوط به هر پوشش متفاوت بودند. بدین معنی که رشد کلنی در پوشش نانو از ۱۰۰۰ تا ۶۰۰۰ کاهش داشته و در پوشش ۶۰۰۰ ppm قارچ آسپرژیلوس فلاووس جدا نشد.

و بعد از گذشت ۴ روز قارچ رشد کرده در محیط شناسایی شد که شامل آسپرژیلوس فلاووس و پنی سیلیوم بوده است. درپوشش‌های نانو با غلظت ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ رشد قارچ در تمام سطح پلیت مشاهده گردیده شد. در پوشش ۵۰۰۰ کلنی قارچی در ۸۰ صد سطح پلیت مشاهده گردید، در

جدول ۲- رقت‌های متعدد پوشش‌های بسته‌بندی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس

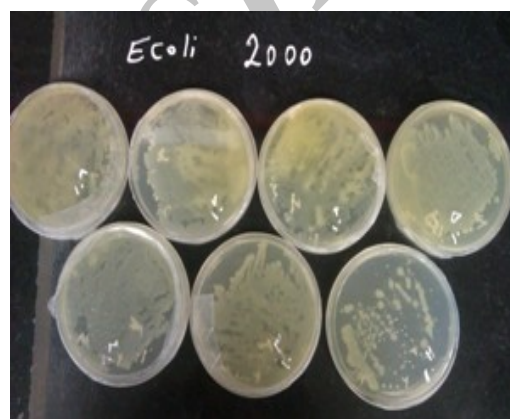
Nano film	۱۰ <sup>۲</sup>	۱۰ <sup>۳</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۵</sup>	۱۰ <sup>۶</sup>	۱۰ <sup>۷</sup>	۱۰ <sup>۸</sup>
۱۰۰۰	۴۷۰	۶۲۰	۷۵۰	۱۲۵۰	....	....	....
۲۰۰۰	۳۰۱	۵۰۲	۸۱۰	۹۷۶	.....	....	....
۳۰۰۰	۲۰۳	۳۱۳	۹۷۶	.....	.....	....	....
۴۰۰۰	۳۲۲	۷۰۰	۸۸۰	....	....	....	....
۵۰۰۰	۴۰	۱۷۰	۳۵۰	۵۰۰	....	....	....
۶۰۰۰	۰	۱۵	۱۲۲	۲۶۸	....	....	....

تکرار دوم استافیلوکوکوس اورئوس

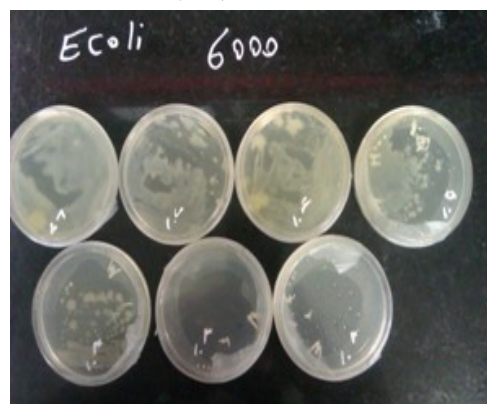
Nano film	۱۰ <sup>۲</sup>	۱۰ <sup>۳</sup>	۱۰ <sup>۴</sup>	۱۰ <sup>۵</sup>	۱۰ <sup>۶</sup>	۱۰ <sup>۷</sup>	۱۰ <sup>۸</sup>
۱۰۰۰	۴۷۸	۶۲۵	۷۵۰	۱۲۴۹	....	....	....
۲۰۰۰	۳۰۱	۵۱۰	۸۰۹	۹۷۰	.....	....	....
۳۰۰۰	۲۰۳	۳۲۳	۹۸۲	.....	.....	....	....
۴۰۰۰	۳۲۲	۷۰۸	۸۸۶	....	....	....	....
۵۰۰۰	۴۰	۱۷۳	۳۳۳	۵۱۱	....	....	....
۶۰۰۰	۰	۱۶	۱۰۲	۲۴۸	....	....	....



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



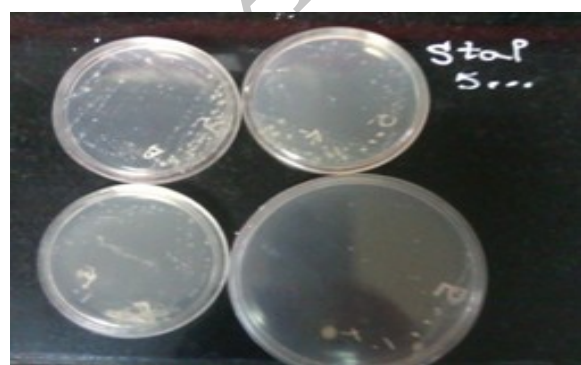
نگاره ۴: رشد باکتری E.coli در پوشش‌های ۲۰۰۰ ppm



نگاره ۵: رشد باکتری E.coli در پوشش‌های ۶۰۰۰ ppm



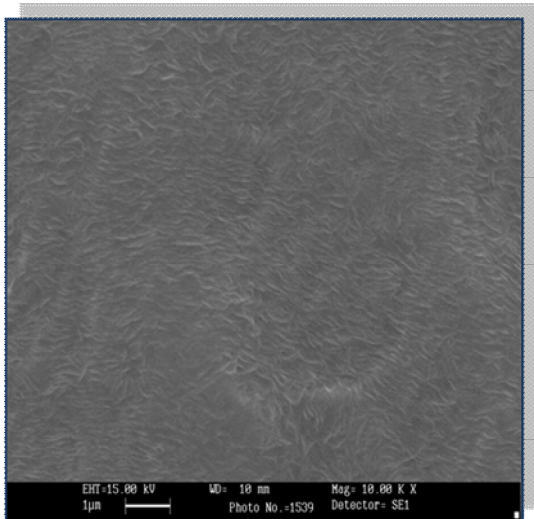
نگاره ۶: رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پوشش‌های ۴۰۰۰ ppm



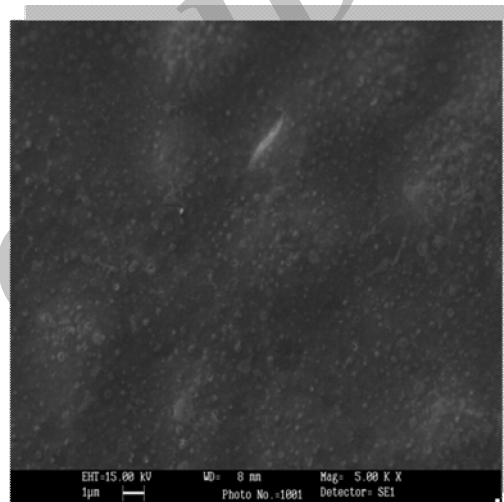
نگاره ۷: رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در پوشش‌های ۵۰۰۰ ppm

### نتایج تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی:

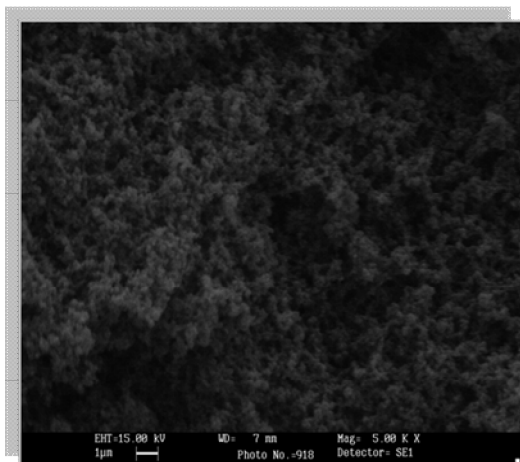
همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی مشاهده می‌گردد پراکنش ذرات با ۱۵ کیلو ولت و با ۱KX در محدوده مشخص شده معادل ۱-۱۰ میکرومتر می‌باشد، که بیانگر آنست که متوسط ذرات نانو نقره در پوشش‌های مصرفی ۸۰-۱۲۰ نانومتر می‌باشد، در خصوص انباشتگی‌های تیره رنگ در تصاویر به علت عدم انحلال نمونه‌های پوشش در حلال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



نگاره ۱۰: تصویر میکروسکوپ الکترونی پوشش‌های بسته بندی ۳ درصد با بزرگنمایی ۱۰ KX با قطر ذرات ۱ میکرومتر

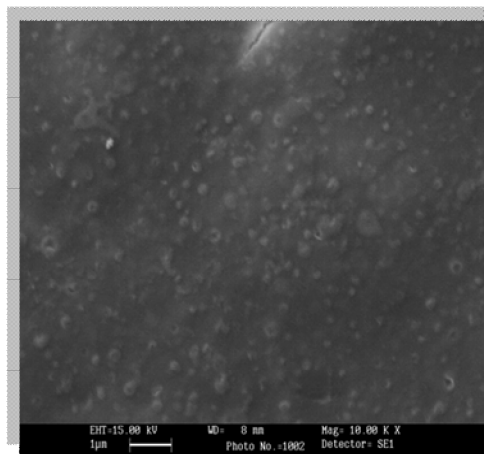


نگاره ۸: بسته بندی ۳ درصد با بزرگنمایی ۵ KX با قطر ذرات ۱ میکرومتر



نگاره ۱۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی پوشش‌های بسته بندی ۵ درصد با بزرگنمایی ۵ KX با قطر ذرات ۱ میکرومتر

همانگونه که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی ۱۲ تا ۱۶ مشاهده می‌گردد پراکنش ذرات با ۱۵ کیلو ولت و با ۱KX در محدوده مشخص شده معادل ۱-۱۰ میکرومتر می‌باشد، که بیانگر آنست که متوسط ذرات نانو نقره در پوشش‌های مصرفی ۲۰-۴۵ نانومتر می‌باشد، در خصوص انباشتگی‌های تیره رنگ در تصاویر به علت عدم انحلال نمونه‌های پوشش در حلال استونیتریل می‌باشد.



نگاره ۹: تصویر میکروسکوپ الکترونی پوشش‌های بسته بندی ۳ درصد با بزرگنمایی ۱ KX با قطر ذرات ۱ میکرومتر

رهایش ذرات به روش تیتراسیون: ۲۷/۳۹۴gr : ۲۰۰۰ ppm اسپری شده: ۲۷/۳۹۴gr  
 نمونه‌های تست شده با فیلم فاقد نقره بوده و نشان از ۲۶/۸۹gr : ۴۰۰۰ ppm اسپری شده: ۲۶/۸۹gr  
 عدم آزاد سازی نقره در خاویار دارد. ۲۸/۸۶۷ gr : ۵۰۰۰ ppm توسط فیلم  
 برطبق وزنی که در ابتدا گرفته شده بود: ۲۷/۳۳۸ gr : ۶۰۰۰ ppm توسط فیلم  
 خاویار ۱۰۰۰ ppm اسپری شده: ۲۶/۸۴۷gr

جدول ۳: میزان رهایش نمونه‌های بسته بندی شده خاویار با درصد های مختلف

Tiring	ppm		Tiring	ppm		Tiring	ppm	
.	۵۰۰۰	.۴۹	.	۳۰۰۰	.۲۵	.	۱۰۰۰	.۱
.	۵۰۰۰	.۵۰	.	۳۰۰۰	.۲۶	.	۱۰۰۰	.۲
.	۵۰۰۰	.۵۱	.	۳۰۰۰	.۲۷	.	۱۰۰۰	.۳
.	۵۰۰۰	.۵۲	.	۳۰۰۰	.۲۸	.	۱۰۰۰	.۴
.	۵۰۰۰	.۵۳	.	۳۰۰۰	.۲۹	.	۱۰۰۰	.۵
.	۵۰۰۰	.۵۴	.	۳۰۰۰	.۳۰	.	۱۰۰۰	.۶
۲	۵۰۰۰	.۵۵	.	۳۰۰۰	.۳۱	.	۱۰۰۰	.۷
.	۵۰۰۰	.۵۶	.	۳۰۰۰	.۳۲	.	۱۰۰۰	.۸
.	۵۰۰۰	.۵۷	.	۳۰۰۰	.۳۳	.	۱۰۰۰	.۹
.	۵۰۰۰	.۵۸	.	۳۰۰۰	.۳۴	.	۱۰۰۰	.۱۰
.	۵۰۰۰	.۵۹	.	۴۰۰۰	.۳۵	.	۱۰۰۰	.۱۱
.	۵۰۰۰	.۶۰	.	۴۰۰۰	.۳۶	.	۲۰۰۰	.۱۲
.	۵۰۰۰	.۶۱	.	۴۰۰۰	.۳۷	.	۲۰۰۰	.۱۳
۲	۵۰۰۰	.۶۲	.	۴۰۰۰	.۳۸	.	۲۰۰۰	.۱۴
.	۶۰۰۰	.۶۳	.	۴۰۰۰	.۳۹	.	۲۰۰۰	.۱۵
.	۶۰۰۰	.۶۴	.	۴۰۰۰	.۴۰	.	۲۰۰۰	.۱۶
.	۶۰۰۰	.۶۵	.	۴۰۰۰	.۴۱	.	۲۰۰۰	.۱۷
.	۶۰۰۰	.۶۶	.	۴۰۰۰	.۴۲	.	۲۰۰۰	.۱۸
۳	۶۰۰۰	.۶۷	.	۴۰۰۰	.۴۳	.	۲۰۰۰	.۱۹
.	۶۰۰۰	.۶۸	.	۴۰۰۰	.۴۴	.	۲۰۰۰	.۲۰
.	۶۰۰۰	.۶۹	.	۴۰۰۰	.۴۵	.	۲۰۰۰	.۲۱
.	۶۰۰۰	.۷۰	.	۴۰۰۰	.۴۶	.	۲۰۰۰	.۲۲
.			۱	۵۰۰۰	.۴۷	.	۲۰۰۰	.۲۳
.			.	۵۰۰۰	.۴۸	.	۳۰۰۰	.۲۴



نتیجه گرفت توزیع داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کند. به منظور مقایسه ذرات به روش Titrino در ۶ گروه مورد مطالعه از آزمون کروسکال والیس استفاده گردید.

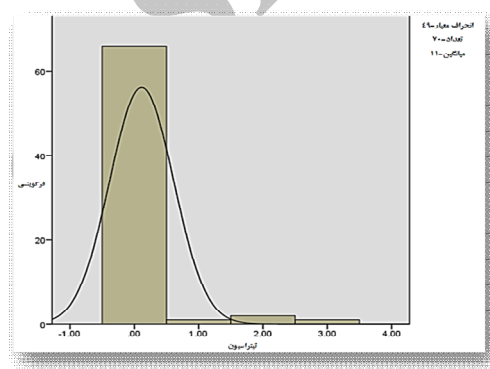
در ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف تک نمونه‌ای (مطابق جدول ۲)، توزیع داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که در این آزمون  $P < 0.05$  است می‌توان

جدول ۲: توزیع نرمال داده‌های آماری

	آزمون کولموگراف اسمیرنوف			شاپیروویلیک		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Titrino	.۰۵۳۴	۷۰	.۰۰۰/۰	۲۲۴.	۷۰	.۰۰۰/.
Lilliefors Significance Correction				.a		

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

در ابتدا تعداد کلنی در رقت‌های مختلف پوشش نانو در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در آنالیز آماری برای تعداد کلنی کدگذاری صورت گرفت (کد صفر: تعداد کلنی ۳۰۰-۳، کد ۱: تعداد کلنی بیش از ۳۰۰). به منظور مقایسه تعداد کلنی در رقت‌های مختلف پوشش نانو در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس از آزمون مربع کای استفاده شد. تفاوت معناداری در تعداد کلنی پوشش نانو ۱۰۰۰ تا ۶۰۰۰ در دو گروه اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس وجود ندارد



نمودار ۱: هیستوگرام داده‌های آماری

نتایج آزمون کروسکال والیس همانگونه که در نمودار ۱ هم تأیید می‌گردد نشان داد که تفاوت معناداری در رهایش ذرات به روش Titrino در ۶ گروه مورد مطالعه وجود ندارد ( $p = 0/141$ ).

## بحث

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

(/۱۴۲) P= در گروه های مختلف با ذرات مختلف پوشش نانو، نوع باکتری بر تعداد کلنی تاثیر معناداری ندارد به عبارت دیگر در هر رقت پوشش نانو هیچ ارتباطی بین نوع باکتری و تعداد کلنی وجود ندارد ولی در مقایسه تعداد کلنی در رقت های مختلف پوشش نانو، تفاوت به شدت معناداری بین پوشش های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ با ۵۰۰۰ وجود دارد (۰/۳۱) P= و به عبارتی بهتر با افزایش رقت پوشش نانو تعداد کلنی باکتری کاهش معناداری یافته است.

در تحقیق انجام شده سال ۱۳۸۹ سلطانی و همکاران (۱) زمان ماندگاری قزل آلاهی رنگین کمان با کاربری فیلم هائی با سایز ذرات متوسط ۴۰ نانومتر تغییر محسوسی نداشته برخلاف فیلم های نانو ppm ۵۰۰۰ که در این تحقیق ماندگاری را با ارزش معنی داری افزایش داده است این در حالی است که فیلم های وارداتی دارای ماندگاری بسیار محسوس تر بوده اند (۱).

نانو ذرات نقره به دلیل نسبت سطح به حجم بسیار بالا و بالا بودن تعداد زیادی از اتم های فلز در واحد سطح، تماس بهتری با میکروارگانیسم‌ها داشته و ویژگی‌های ضد میکروبی منحصر به فردی را نسبت به فلز نقره در ابعاد بزرگتر نشان می‌دهند (۱). از آنجایی که اکثر روشهای نگهداری معمول مواد غذایی در مورد غذاهای تازه و آماده مصرف قابل کاربرد نیست. برای نگهداری این قبیل محصولات از بسته بندی های ضد میکروب استفاده می‌شود. این بسته بندی ها نوعی بسته بندی فعال بوده که حاوی ترکیبات ضد میکروبی می باشد. به دلیل افزایش مقاومت میکروارگانیسم ها به آنتی بیوتیک ها، دانشمندان به دنبال یافتن ترکیبات جایگزین برای آنتی بیوتیک ها هستند. نانو ذرات فلزی مانند طلا، نقره و مس از این دسته مواد می‌باشند.

نقره به دلیل واکنش با گروه تیول آنزیم های میکروارگانیسم ها باعث دنا توزه شدن آنزیم و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. بسته بندی های حاوی نانو ذرات نقره با آزاد سازی یون های نقره باعث کاهش، جلوگیری و یا به تاخیر انداختن رشد میکروبها و در نتیجه افزایش زمان ماندگاری و حفظ کیفیت

محصول غذایی می‌شود. این ترکیبات در ساختار پدهای جاذب و یا در ترکیب با پلیمرهای پلی اتیلن، پلی پروپیلن، پلی استایرن به کار می‌رود.

خواص ضد میکروبی نانو ذرات نقره برای گروه‌های مختلف باکتریایی مورد مطالعه متفاوت و منحصر به فرد است. از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که بار الکتریکی منفی سطح باکتری‌ها موجب جذب شدن نانو ذرات نقره به خود می‌شود. بنابراین احتمالاً وجود اختلاف بار الکتریکی سطحی بین باکتری‌های گوناگون می‌تواند موجب اختلاف در میزان جذب نانو ذرات نقره به خود و در نهایت موجب تفاوت در خاصیت ضد باکتریایی نانو نقره علیه سوش‌های مختلف باکتریایی شود (۶).

عوامل مختلفی بر عملکرد میکروبیولوژی لفاف مورد نظر تاثیر می‌گذارد این لفاف از آلژینات سدیم به عنوان پایه اصلی و نانو سیلور به عنوان آنتی باکتریال تشکیل شده است آلژینات سدیم خود به تنهایی دارای خاصیت آنتی باکتریالی می‌باشد، یکی از مکانیسم‌های آن با پارگی لیپو پلی ساکارید غشای بیرونی باکتری های گرم منفی می‌باشد، این عملکرد آن همانند یک بازدارنده و مانع در برابر انتقال اکسیژن است. مکانیسم دیگر واکنش با گروهی آنیونی بر روی سطح سلول به دلیل ماهیت پلی کاتیونی اش می‌باشد که باعث تشکیل یک لایه غیر قابل نفوذ در اطراف سلول می‌شوند و از انتقال حلال‌های اصلی و مهار RNA و تولید پروتئین از طریق نفوذ به هسته سلولی جلوگیری می‌کند و در کنار این پلی ساکارید از نانو سیلور به عنوان آنتی باکتریال استفاده شد محلول نانو سیلور از یون نقره در اندازه ppm ۴۰۰۰ نانو متر تشکیل شده بود که در دزهای ۱، ۳، ۵ درصد به فیلم آلژینات سدیم اضافه شد با هم جواری نقره موجود در فیلم با دگرگون ساختن میکروارگانیسم به وسیله تبدیل پیوند های SH — به Sag — در این مکانیسم ذرات نانو سیلور فلزی به مرور زمان یونهای نقره از خود پراکنده می‌کنند. این یونها طی واکنش جانشینی، باندهای SH-را در

زندگی و نگرانی‌های اجتماعی و بهداشتی مصرف‌کننده جذاب باشند. با توجه به اینکه در فرآیند تولید پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر از درجه حرارت‌های بالا استفاده می‌شود، در نتیجه عملیات اکسید شدن رنگ قهوه‌ای نامطلوبی ایجاد می‌شود، که می‌توان با یافتن راهکارهایی به ارتقای خصوصیات بازاریابی این پوشش‌ها دست یافت.

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

### تشکر و سپاسگزاری

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

### فهرست منابع

۱. سلطانی، م.، اهری، ح.، عطایی، م. (۱۳۸۹): اثر ممانعت‌کنندگی ذرات نانونقره بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای ماهی: استرپتوکوکوس اینیایی: لاکتوکوکوس گارویه، یرسینیا راکری و آئروموناس هایدروفیلا. مجله طب دامی ایران (مجله بین‌المللی تحقیقات دامپزشکی). ۵۱(۱): ۲۹-۴۸.

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

با توجه به اینکه خاویار خاصیت فسادپذیری بالایی دارد، می‌توان از نانو حسگرهایی که به رهایش مواد شیمیایی ناشی از فساد غذاها و تغییرات شیمیایی و میکروبی حساس هستند در بسته‌بندی‌های هوشمند استفاده کرد، تا به محض شروع خراب شدن غذا، با تغییر رنگ بسته‌بندی، مصرف‌کننده را از تغییرات ماده غذایی درون بسته‌بندی مطلع کند. این سیستم به مراتب دقیق‌تر و مطمئن‌تر از فروش با تاریخ مصرف است. بنابراین در آینده نزدیک کارخانه‌ها از درج تاریخ تولید و انقضا بر روی بسته‌بندی‌ها بی‌نیاز شده و یک شاخص بسیار دقیق از آخرین وضعیت فساد ماده غذایی در داخل بسته‌بندی برای مصرف‌کننده وجود خواهد داشت. به عنوان مثال بر روی بسته‌بندی جمله‌ای را خطاب به مصرف‌کننده خواهید دید که: «مصرف‌کننده محترم رنگ بسته‌بندی این محصول در زمان مصرف باید به رنگ سفید باشد در صورت تغییر رنگ به رنگ قرمز از مصرف آن خودداری کنید.» بنابراین فساد ماده غذایی در هر مرحله‌ای از آن مشخص می‌شود، از طرفی تحقیقات مختلف بازاریابی نشان داده‌اند که طراحی بسته‌بندی، جزء مؤثرترین ابزار بازاریابی برای فروش است. محرک و عامل نهایی موفقیت، طراحی بسته‌بندی است. برخی بسته‌بندی‌ها، به‌ویژه برای محصولات غذایی طوری طراحی می‌شوند که برای سبک

2. Cozzolino, C.A, Nilsson, F. (2013): Exploiting the nano-sized features controlled-Release packaging. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 110: 208-16.
3. Hyeon, D.J., Kim, T.H. (2013): Effect of nano-silica filler on the uniform packaging of white light emitting diodes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13: 5976-81.
4. Lin, Q.B. Zhong, Zhao, Q., Xiao. D.H. (2014): Migration of Ti from nano-tio(2)-polyethylene composite packaging into food simulants. *Food Addit Contam Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 31: 1284-90.
5. Martinez-Abad, A. (2014): Development and characterization of silver-based antimicrobial ethylene-vinyl alcohol copolymer (EvoH) films for food-packaging applications. *J. Agric. Food Chem.* 60:5350-9.
6. Ramos, M. Peltzer. (2014): Development of novel nano-biocomposite antioxidant flms based on poly (Lactic Acid) and thymol for active packaging. *Food Che.* 162: 149-55.

Archive of SID