

پردیس یوسفی^۱، سپیده حامدی^{۲*}، اسماعیل رسولی گرمارودی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، سوادکوه، مازندران، ایران، پست الکترونیک: sep.hamed@sbu.ac.ir, 09129518628.pardisyousefi1@yahoo.com.

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، سوادکوه، مازندران، ایران 011-42451093-37، sep.hamed@sbu.ac.ir.

۳- عضو هیئت علمی، استادیار، گروه پالایش زیستی، دانشکده مهندسی فناوری های نوین، پردیس علمی تحقیقاتی زیراب، دانشگاه شهید بهشتی، سوادکوه، مازندران، ایران 011-42458043. e_rasooly@sbu.ac.ir.

اصلاح شیمیایی زایلان استخراج شده از مغز باگاس به منظور تهیه فیلم ضدباکتریایی کیتوسان/کربوکسی متیل زایلان

چکیده

پالایش زیستی شامل فناوری‌هایی است که قادر به تبدیل منابع زیست‌توده به محصولات با ارزش افزوده بالاتر می‌باشند. در این تحقیق، ابتدا همی سلولزهای غنی از زایلان از مغز باگاس نیشکر استخراج شده و سپس تحت فرایند کربوکسی متیلاسیون قرار گرفتند. درجه استخلاف زایلان کربوکسی متیل دار شده توسط دستگاه (ICP-OES)، ۰/۶۸ گزارش شد. ظهور باندهای جذب در 1580 و 1311 cm^{-1} در طیف FTIR همی سلولز اصلاح شده، مربوط به ارتعاش کششی پیوند C-O گروه های کربوکسی متیل است. فیلم های زایلان کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان با روش قالب ریزی و تبخیر حلال تهیه شدند. کاهش شدت پیک مشخصه کیتوسان پس از اختلاط با همی سلولز کربوکسیله شده در طیف XRD نشان داد که بلورینگی آن کاهش یافته است. آنالیز SEM نشان داد که سطح فیلم یکنواخت است. پیک آگزوترمیک دیده شده در نمودارهای حاصل از آنالیز DSC نشان داد که تخریب فیلم ها در دمای بیشتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس رخ می دهد. نتایج آزمون نفوذپذیری فیلم ها نسبت به بخار آب نشان داد که نفوذپذیری فیلم همی سلولز کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان $[0.1 \pm 0.84 \text{ g. mm/m}^2 \text{ h kPa}]$ می باشد. نتایج رنگ سنجی نشان داد، شاخص های سفیدی و زردی در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با زایلان/کیتوسان به ترتیب افزایش و کاهش یافته است. تورم فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان به ترتیب ۹۵/۷۱ و ۱۳۰/۴۲ گزارش شد. فیلم کربوکسی متیل همی سلولز/ کیتوسان نسبت به همی سلولز /کیتوسان دارای استحکام بیشتری است که ناشی از ایجاد اتصال بین گروه های آمین کیتوسان و گروه های کربوکسیل همی سلولز باشد. خاصیت ضدباکتریایی فیلم تهیه شده در برابر باکتری *اشریشیاکلی* در مقایسه با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* قوی تر است.

واژگان کلیدی: مغز باگاس، استخراج قلبایی زایلان، کربوکسی متیل زایلان، فیلم زایلان/کیتوسان، فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان، فعالیت ضدباکتریایی

مقدمه

رویکرد نوین پالایش زیستی شامل فناوری‌هایی است که قادر به تبدیل منابع زیست‌توده به محصولات با ارزش افزوده بالاتر مانند مواد شیمیایی زیست‌پایه و حامل‌های انرژی تبدیل می‌شوند. بر این اساس توجه بسیاری از

محققان به استفاده از زیست‌توده به عنوان منبع اولیه به منظور کاربرد در صنایع مختلف به‌ویژه صنایع غذایی و دارویی معطوف شده است (Anthony, Xiang et al. 2015). همی‌سلولزها یکی از سه مولکول ساختاری همراه با سلولز و لیگنین در ترکیبات سازنده زیست توده هستند که به طور گسترده در پسماندهای کشاورزی لیگنوسلولزی یافت می‌شوند. همی‌سلولزها ساختارهای ناهمگن متشکل از قندهای هگزوز و پنتوز می‌باشند (Guan, Zhang et al. 2014). در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات همی‌سلولزی به دلیل قابلیت‌های بالقوه آن در تشکیل فیلم، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، سهولت دسترس‌پذیری ضایعات کشاورزی و صرفه اقتصادی بسیار مورد استقبال واقع شده است (Guan, Zhang et al. 2014). همی‌سلولزها طبیعت آب‌دوست دارند و فیلم‌های بر پایه همی‌سلولز دارای خواص نیمه‌بلورین بوده، جاذب رطوبت هستند و از استحکام مکانیکی ضعیفی برخوردارند. کاربرد عملی فیلم‌های همی‌سلولزی به دلیل معایب ذکر شده به شدت محدود شده است (Chen, Qi et al. 2016). اصلاح شیمیایی پلی‌ساکاریدها، رایج‌ترین روش برای تغییر خواص آنها به منظور استفاده از این منابع تجدیدپذیر در مفهوم توسعه پایدار به شمار می‌رود. همی‌سلولزها دارای گروه‌های هیدروکسیل بی‌شماری هستند که در طول زنجیره اصلی و زنجیره‌های جانبی توزیع شده‌اند. این گروه‌های هیدروکسیل می‌توانند پیوندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی زیادی را تشکیل دهند (Chen, Qi et al. 2016). گروه‌های هیدروکسیل بطور بالقوه پتانسیل فرایندهایی نظیر استری شدن، اتری شدن، اکسیداسیون و واکنش‌های دیگر مانند هیدرولیز و احیاء را دارا می‌باشند. مشتقات همی‌سلولزی کربوکسی‌متیل‌دار شده برای افزایش حلالیت در آب مرسوم هستند (Sukhbaatar, Hassan et al. 2014). در میان این مشتقات عامل‌دار شده، کربوکسی‌متیل‌همی‌سلولزها که سبب بروز عملکرد آنیونی پلیمر می‌شوند، به طور گسترده‌ای در صنایع نساجی، کاغذسازی، حذف فلزات سنگین و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Peng, Ren et al. 2011). تحقیقات پیشین نشان داده که مغز باگاس موجود در تفاله باقی مانده از کارخانجات تولید نیشکر در ایران سرشار از همی‌سلولز است (شفیعی ۱۳۹۶). با توجه به اینکه میزان ضایعات حاصل از کارخانجات تولید نیشکر در ایران قابل توجه است و در حال حاضر نیز استفاده بهینه‌ای از این تفاله نمی‌شود، هدف این تحقیق، استخراج زایلان مغز باگاس و استفاده از آن در تهیه فیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مغز باگاس به عنوان منبع زایلان از شرکت کاغذسازی پارس در هفت تپه خوزستان تهیه شد. اتانول ۹۹٪ از شرکت تقطیر خراسان، متانول ۹۹٪ از شرکت آروین شیمی، ایزوپروپانول از شرکت دکتر مجلی، پتاسیم هیدروکسید از شرکت لوبامی، سدیم هیدروکسید و سدیم مونوکلرو استات از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. محیط‌های کشت جامد و مایع نوترینت آگار و نوترینت برات نیز از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شدند.

استخراج زایلان به روش تیمار قلبایی: نمونه‌های مغز باگاس نیشکر در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شدند و به وسیله آسیاب خانگی و مطابق با استاندارد TAPPI آیین نامه شماره T257cm-02 به پودر تبدیل شدند. سپس به کمک دستگاه غربال لرزشی آزمایشگاهی غربال شدند. پودر مغز باگاس (بر مبنای وزن خشک) پس از اختلاط با محلول سدیم هیدروکسید (با نسبت ۸٪ وزنی / وزنی) به مدت ۵ دقیقه در مخزن پخت در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس پیش تیمار شد (شفیعی ۱۳۹۶). سپس خمیر حاصل با ۰/۳ گرم سدیم کلریت و ۰/۱ میلی لیتر اسید استیک (به ازای یک گرم وزن خشک خمیر) رنگبری گردید (Ahlgren and Goring 1971). خمیر رنگبری شده با پتاسیم هیدروکسید ۱۰٪ (با نسبت جامد به مایع ۲۰:۱) مخلوط و توسط هم زن با سرعت ۲۵۰rpm به مدت ۱ ساعت هم زده شد و سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. مخلوط حاصل در معرض فیلتراسیون خلا قرار گرفته و جزء صاف شده غنی از همی‌سلولز پس از خنثی سازی با اسید استیک (تا رسیدن به pH ۴/۵) با محلول اتانول ۹۵٪ (معادل سه برابر حجم صاف شده) به منظور ایجاد رسوب مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مخلوط حاصل مجدداً از صافی عبور داده شد و جزء جامد باقی مانده روی کاغذ صافی به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک شد و به عنوان منبع غنی از زایلان مورد استفاده قرار گرفت (Ren, Sun et al. 2008).

کربوکسی‌متیل‌دار کردن زایلان: ابتدا حدود ۲ گرم پودر زایلان (معادل ۱۵ میلی مول) در ۱۶/۴ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۲۵٪ w/v (معادل ۶۱/۵ میلی مول) کاملاً حل شد. سپس به آن ۲۰ میلی لیتر ایزوپروپانول اضافه شد

و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه به شدت هم زده شد. حدود ۳/۵ گرم سدیم مونوکلرواستات (معادل ۳۰ میلی مول که در ۱۰ میلی لیتر ایزوپروپانول حل شده)، قطره قطره به محلول فوق اضافه شد و دوغاب حاصل به مدت ۷۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس با سرعت زیاد به شدت هم زده شد. بعد از به پایان رسیدن فرآیند و خنک شدن سوسپانسیون، خنثی سازی با استیک اسید ۵۰٪ انجام شد. جزء جامد حاصل از عملیات فیلتراسیون (کربوکسی متیل زایلان) چندین بار با متانول ۸۰٪ و در نهایت با متانول خالص شستشو داده شد و به مدت ۲ روز در هوای آزاد خشک شد (Šimkovic, Kelnar et al. 2014).

تعیین درجه استخلاف: میزان یون سدیم موجود در نمونه کر بوکسی متیل دار شده با استفاده از طیف‌سنجی پلاسمای جفت‌شده القایی_ اسپکترومتری نوری (ICP-OES) مدل (Varian-Inc, USA, VISTA-PRO model) مشخص شد. ابتدا هضم اسیدی نمونه (حدود ۰/۱ گرم) توسط اسید نیتریک تحت تابش میکروویو انجام شد و پس از اندازه گیری میزان یون سدیم توسط دستگاه، درجه استخلاف از طریق رابطه ۱ محاسبه شد (Hettrich, Drechsler et al. 2017).

$$DS = \frac{132 \times \%Na}{2300 - 80 \times \%Na} \quad \text{رابطه ۱}$$

کروماتوگرافی ژل تراوایی (GPC): توزیع وزن مولکولی و میانگین وزن مولکولی زایلان استخراج شده با استفاده از دستگاه GPC (مدل Shimadzu LC-20A, USA) مجهز به آشکارساز ضریب شکست (RT) اندازه گیری شد. شرایط عملیاتی دستگاه شامل فاز متحرک نیترات سدیم، ۰/۱ مولار، سرعت جریان تزریق ۱ ml/min و دمای ستون ۳۵ °C بود. برای آماده سازی نمونه برای تزریق به دستگاه، ۰/۰۱ mg زایلان در ۱۰ cc آب حل شد. تهیه فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان: ابتدا محلول های آبی ۱٪ زایلان و کربوکسی متیل زایلان تهیه شدند. محلول ۱٪ کیتوسان نیز در استیک اسید ۱٪ تهیه شد. برای تهیه فیلم های زایلان/کیتوسان، محلول های کیتوسان و زایلان با نسبت جرمی برابر مخلوط شده و به مدت یک شبانه روز روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. فیلم های کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نیز از اختلاط محلول های کربوکسی متیل زایلان و کیتوسان با نسبت های جرمی برابر تهیه شدند. محلول های تهیه شده در معرض فرا آواهی^۱ به مدت ۲۰ ثانیه با شدت ۲۰ آمپلی تود قرار گرفته و در نهایت فیلم‌ها به روش قالب‌ریزی و تبخیر حلال تهیه شدند و در مجاورت هوای آزاد خشک شدند (Zhu Ryberg, Edlund et al. 2011).

آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR): برای شناسایی گروه‌های عاملی درگیر و پایش کربوکسی متیلاسیون زایلان از طیف سنج تبدیل فوریه قرمز (مدل پرکین-المر آلمان) با محدوده‌ی طیف روبشی $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و با دقت 4 cm^{-1} استفاده شد.

آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD): برای شناسایی ترکیب فازی نمونه‌های تهیه شده از روش پراش پرتو ایکس استفاده شد. الگوهای ساختاری زایلان و فیلم های تهیه شده با استفاده از دستگاه XRD (مدل فیلیپس پی دیبلو-۱۷۳، هلند) حاصل شدند. این دستگاه مجهز به لامپ مس (Cu) در طول موج ۱/۷۸۸۹ آنگستروم، جریان ۳۰ میلی آمپر و ولتاژ ۴۰ کیلو ولت عمل می‌کند الگوهای پراش نمونه‌ها در محدوده زاویه $2\theta = 5-60^\circ$ ثبت شدند.

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی- طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (SEM-EDX): مورفولوژی فیلم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل اس بیو، هیتاچی، ژاپن) با بزرگنمایی $30 \mu\text{m}$ و با ولتاژ ۱۵ Kv مورد بررسی قرار گرفت. جهت آماده سازی، نمونه‌ها با لایه نازکی از طلا پوشانده شدند.

آنالیز گرماسنجی روبشی دیفرانسیلی (DSC): آنالیز حرارتی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه کالریمتری DSC (مدل Testonix، شرکت صنایع آریا، ایران) انجام شد. نمونه‌ها از دمای اتاق تا دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس با نرخ حرارت دهی ۱۰ درجه سلسیوس بر دقیقه گرمادهی شده و آنتالپی به طور پیوسته اندازه گیری شد. تمام آزمون‌ها تحت جو نیتروژن با نرخ جریان ۳۶ میلی لیتر بر دقیقه انجام شدند.

اندازه گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP): برای اندازه گیری سرعت انتقال بخار آب فیلم ها از استاندارد ASTM E9 استفاده شد. برای انجام این کار، از ظروف شیشه ای کوچک با قطر دهانه ۲ سانتی متر و ارتفاع ۴/۵ سانتی متر استفاده شد. ابتدا، ۱۰ گرم سیلیکا ژل به منظور ایجاد رطوبت نسبی معادل صفر درون ظروف قرار گرفت. سپس، قطعه ای از فیلم های تهیه شده به عنوان درپوش ظروف روی آنها ثابت شدند. ظروف شیشه ای همراه با محتویات آن ها پس از توزین، درون دسیکاتور حاوی محلول اشباع شده کلرید سدیم (رطوبت نسبی ۷۰٪) قرار گرفتند. به مدت یک هفته هرچند ساعت یکبار، ظروف شیشه ای توزین شدند. مقدار بخار آب انتقال یافته از فیلم ها، از روی افزایش وزن ظروف شیشه ای تعیین گردید. نمودار افزایش وزن ظروف شیشه ای به صورت تابعی از زمان رسم شد و نفوذپذیری میزان بخار بعد از محاسبه شیب خط از رابطه ۲ محاسبه گردید. با استفاده از رابطه ۲ تقسیم شیب خط بر سطح مقطع فیلم در معرض بخار آب حاصل شد. R_1 و R_2 به ترتیب نشان دهنده رطوبت های نسبی درون دسیکاتور و ظروف هستند. P فشار بخار آب خالص در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بر حسب کیلوپاسکال است.

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \quad \text{رابطه ۲}$$

آنالیز رنگ سنجی: فیلم های تهیه شده با استفاده از دستگاه رنگ سنج مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان رنگ با استفاده از پارامترهای هانتر بر حسب روشنائی (L^*)، سرخی-سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) بیان شد (Koosha and Hamedi 2019). ابتدا دستگاه با صفحات استاندارد سفید و سیاه کالیبره شد. نتایج اختلاف رنگ نهائی (ΔE)، شاخص زردی (YI) و شاخص سفیدی (WI) به صورت میانگین حاصل از پنج اندازه گیری از نقاط مختلف فیلم ها (یک نقطه مرکزی و چهار نقطه پیرامونی) گزارش شدند.

درجه تورم: قطعاتی از فیلم ها در ابعاد $1 \times 1 \text{ cm}^2$ برش داده شدند و بعد از ثبت وزن اولیه در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شدند (Akhgari, Farahmand et al. 2010). نمونه ها پس از خروج و حذف آب اضافی مجدداً توزین شده و درجه تورم آنها از رابطه ۳ حاصل شد.

$$\text{درجه تورم} = \frac{\text{وزن ثانویه} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}}$$

رابطه ۳

خواص مکانیکی: استحکام کششی (TS) و درصد کشیدگی در نقطه شکست (E%) فیلم ها بر طبق استاندارد (ASTM D882) با استفاده از دستگاه رئومتر (مدل ۱۷۰۲-Z، شرکت شیباکو، ژاپن) اندازه گیری شد.

فعالیت ضد باکتریایی: برای تعیین قابلیت ضدباکتریایی فیلم های تهیه شده از باکتری های *اشریشیاکلی* (گرم منفی) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) استفاده شد. به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی، یک لوپ کامل از کلونی های رشد یافته روی بشقابک حاوی محیط کشت جامد به ارلن حاوی محیط کشت مایع سترون نوترینت برات تلقیح شده و به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C و دور 150 rpm گرمگذاری شد. سپس فیلم ها به قطعات $1 \times 1 \text{ cm}^2$ بریده شده و پس از سترون شدن (مجاورت با اشعه ماوراء بنفش به مدت ۴۰ دقیقه) در فالكون های حاوی ۱۵ ml محیط کشت مایع سترون غوطه ور شدند. مایه تلقیح باکتریایی پس از تنظیم در کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند به فالكون ها اضافه شد (حدود ۵ درصد حجمی نسبت به حجم محیط کشت مایع). در پایان همه فالكون ها به مدت یک شبانه روز در دمای 37°C و دور 150 rpm گرمگذاری شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر محیط مایع از هر فالكون خارج شده و به صورت سریالی تا رقت 10^7 رقیق سازی شد. حدود ۵۰ میکرولیتر از رقت های 10^0 ، 10^1 و 10^7 از هر فالكون روی بشقابک های نوترینت آگار به صورت یکنواخت کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمگذاری شدند. تعداد واحدهای کلونی (CFU) از طریق شمارش تعداد کلونی ظاهر شده روی هر پلیت و در نظر گرفتن عدد رقت محاسبه شد. قابلیت ضدباکتریایی فیلم ها بر اساس کاهش جمعیت باکتریایی در حضور فیلم ها در مقایسه با جمعیت باکتریایی کنترل و از رابطه ۴ محاسبه شد. آزمون ها با سه بار تکرار انجام شده و فالكون های حاوی محیط کشت و مایه تلقیح شده (بدون حضور فیلم) نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

$$E (\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

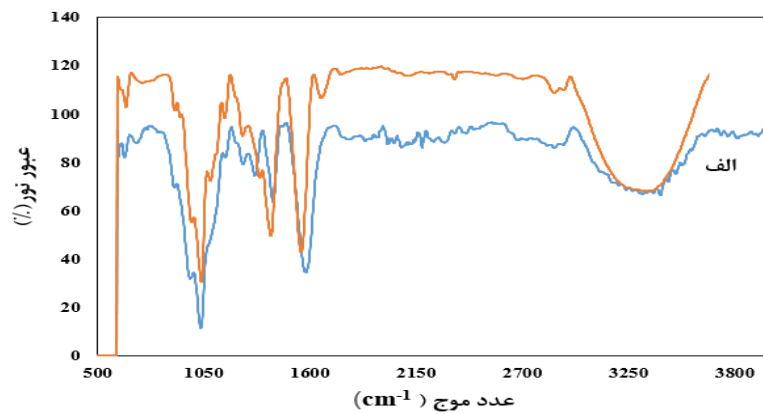
رابطه ۴

پارامترهای A و B در معادله بالا به ترتیب نشان دهنده تعداد کلونی های رشد یافته در محیط کشت کنترل و محیط کشت حاوی فیلم های تهیه شده می باشند.

نتایج

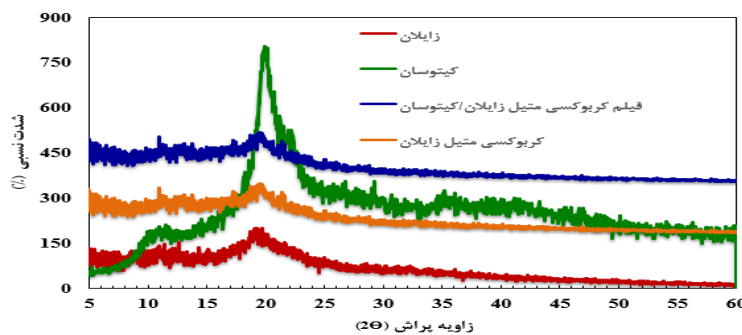
نتایج درجه استخلاف و GPC: با استفاده از آنالیز آزمایشگاهی ICP مقدار یون سدیم موجود در کربوکسی متیل زایلان، ۹۳۰۰۰ ppm گزارش شد. با استفاده از معادله تعیین درجه استخلاف، DS بدست آمده ۰/۶۸ می باشد. میانگین وزن مولکولی (Mw) زایلان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی ژل تراوایی ۷۶۰ کیلو دالتون محاسبه شد. (Veisi, Azizi et al. 2018)

نتایج FTIR: طیف های حاصل از FTIR نمونه های زایلان و زایلان کربوکسی متیل دار شده در شکل ۱ ارائه شده است.



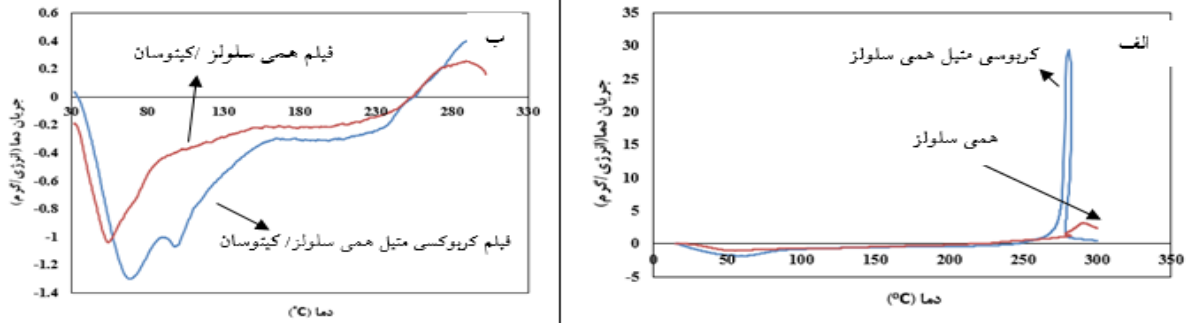
شکل ۱: نمودارهای FTIR (الف) زایلان، (ب) کربوکسی متیل زایلان

نتایج XRD: شکل ۲، طیف های پراش اشعه ایکس زایلان، کربوکسی متیل زایلان، کیتوسان و فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان را نشان می دهد. طیف زایلان در $2\theta = 19/4^\circ$ دارای پیک مشخصه پهنی است که پس از عامل دار شدن پهن تر می شود. برای طیف پراش کیتوسان پیک های مشخصه در زوایای پراش $19/4^\circ$ ، $21/2^\circ$ و $20/2^\circ$ به ترتیب مطابق با صفحات بلورین (۰۲۰) و (۱۱۰) مشاهده شد (Huang, Liu et al. 2017). همانگونه که در شکل ۳ مشخص است، پیک های مشخصه کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان به دلیل نزدیکی زوایای پراش ($\sim 20^\circ$) با یکدیگر همپوشانی دارند.

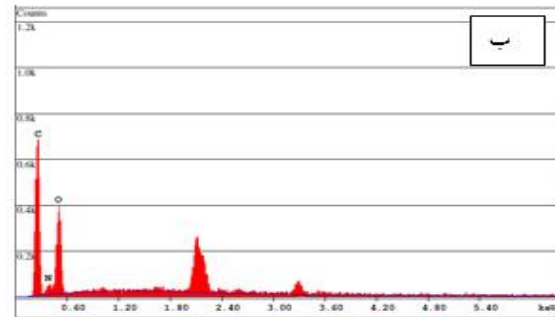
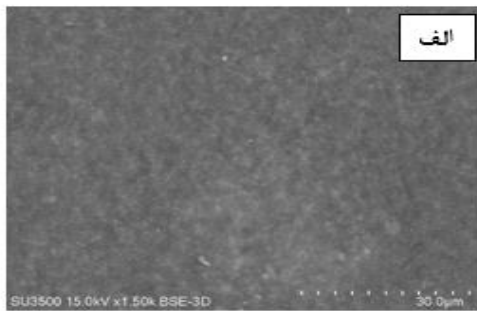


شکل ۲: طیف های XRD زایلان، کربوکسی متیل زایلان، کیتوسان و فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

نتایج SEM/EDX: تصویر سطح فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۳-الف نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر مشخص است سطح فیلم یکنواخت می باشد که نشان دهنده اختلاط همگن پلیمرها می باشد. طیف EDX فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۳-ب نشان داده شده است.



شکل ۴: نمودارهای DSC (الف) همی سلولوز، کربوکسی متیل همی سلولوز (ب) فیلم همی سلولوز/کیتوسان، فیلم کربوکسی متیل همی سلولوز/کیتوسان



EDAX ZAF Quantification (Standardless)
Element Normalized
SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	34.05	40.14	0.1777	1.0107	0.5161	1.0007
N K	14.60	14.76	0.0281	1.0018	0.1916	1.0012
O K	50.07	44.31	0.1117	0.9939	0.2246	1.0000
NaK	1.28	0.79	0.0045	0.9305	0.3742	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	257.69	4.16	2.22	61.88
N K	48.62	7.47	5.74	6.51
O K	388.61	11.64	1.83	33.40
NaK	22.78	31.23	14.18	0.73

شکل ۳: (الف) تصویر فیلم کربوکسی متیل همی سلولوز / کیتوسان (ب) تصویر EDAX فیلم کربوکسی متیل همی سلولوز / کیتوسان

نتایج DSC: با توجه به شکل ۴-الف، تجزیه حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان به ترتیب در دمای ۲۹۵ و ۲۸۰ درجه

سلسیوس رخ داده است. همانطور که در شکل ۴-ب مشخص است، هر چند تخریب فیلم زایلان/کیتوسان در دمای بالاتری رخ می دهد، لیکن دمای تخریب دو فیلم به هم نزدیک می باشند. بنابراین مقاومت حرارتی فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان اندکی کاهش یافته است.

نتایج wvp: نتایج نفوذپذیری فیلم های تهیه شده در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول ۱، نفوذپذیری فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان افزایش چشمگیری یافته است. **جدول ۱:** نفوذپذیری فیلم های زایلان/کیتوسان و زایلان کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان

فیلم	نفوذپذیری بخار آب [g. mm/m ² h kPa]
زایلان/کیتوسان	0/62 ± 0/05
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	0/84 ± 0/1

نتایج رنگ سنجی: پارامترهای رنگ سنجی فیلم ها در جدول ۲، نشان داده شده است. شاخص روشنایی (L*) بیانگر شفافیت است، پارامترهای b* و YI که نشانگر شدت زردی فیلم می باشند در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نسبت به فیلم زایلان/کیتوسان، کاهش یافته است. از طرفی شاخص سفیدی (WI) در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان افزایش یافته است.

جدول ۲: پارامترهای رنگ سنجی فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

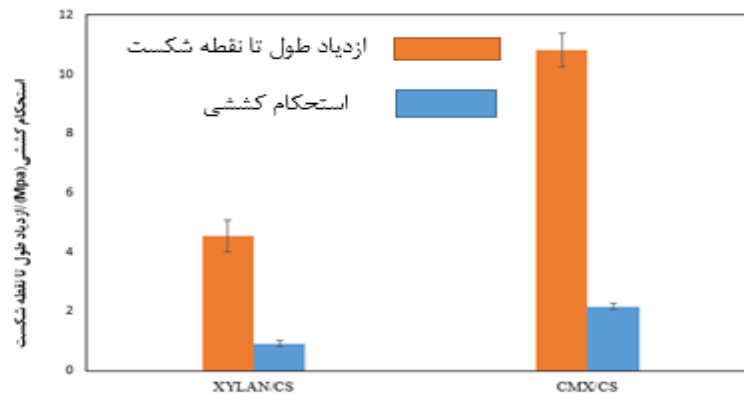
فیلم	L*	a*	b*	*ΔE	YI	WI
زایلان/کیتوسان	65/88 ± 0/44	0/26 ± 0/47	1/15 13/166	431/8 ± 0/85 ±	30/946 ± 2/04	58/07 ± 0/36
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	65/61 ± 2/86	0/41 ± 0/46	5/86 ± 0/53	435/03 ± 0/11	15/792 ± 0/5	58/63 ± 0/28

نتایج تورم: میزان تورم در فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در جدول ۳ نشان داده شده است. همانگونه که از نتایج مشخص است، میزان تورم در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان بیشتر است.

جدول ۳: تورم فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان

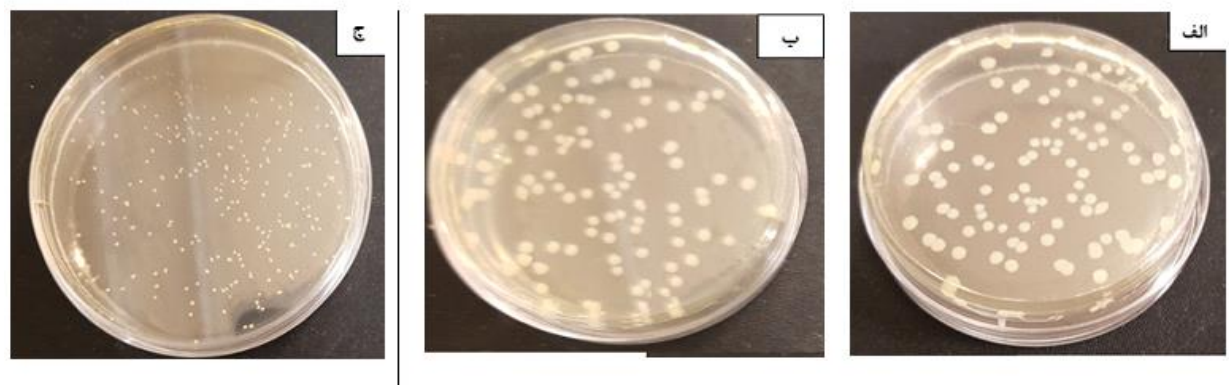
فیلم	تورم
زایلان/کیتوسان	95/71
کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان	130/42

نتایج خواص مکانیکی: خواص مکانیکی (استحکام کششی و درصد کشیدگی) فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۵ ارائه شده است. استحکام کششی در فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نسبت به فیلم زایلان/کیتوسان افزایش یافته است



شکل ۵: استحکام فیلم های همی سلولز /کیتوسان و کربوکسی متیل همی سلولز/کیتوسان

فعالیت ضد باکتریایی: میزان بازدارندگی رشد باکتری های *S. aureus* و *E. coli* در حضور فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۶ نشان داده شده است. همانگونه که در شکل مشخص است حضور فیلم سبب کاهش جمعیت هر دو گونه باکتریایی در مقایسه با جمعیت کنترل می شود. درصد بازدارندگی میزان رشد باکتری های *S. aureus* و *E. coli* در حضور فیلم به ترتیب ۶۵٪ و ۵۷٪ محاسبه شد.



شکل ۶: شمارش تعداد کلونی های تشکیل شده از سوسپانسیون های باکتریایی (الف) *E. coli* و (ب) *S. aureus* در حضور فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان. (ج) تعداد کلونی های ظاهر شده در محیط کنترل

بحث

درجه استخلاف کربوکسی متیل زایلان حاصل از زایلان استخراج شده از خمیر کرافت درخت توس در محدوده ۰/۱-۳۶/۱۳ گزارش شده است (Alekhina, Mikkonen et al. 2014). درجه استخلاف کربوکسی متیل سلولز باگاس در محدوده ۰/۹۲- ۰/۸۷ گزارش شده است (Kamthai. 2016). در تحقیقات مختلف، میانگین وزن مولکولی زایلان بامبو، برابر 1340 g/mol (Chen, Qi et al. 2016) و نیز 9420 g/mol (Guan, Qi et al. 2016) گزارش شده است. همچنین، در گزارشی دیگر، میانگین وزن مولکولی زایلان باگاس $40/8 \text{ g/mol}$ (Carvalho 2015) و نیز $23766-12820 \text{ g/mol}$ گزارش شده است. پیک های مشاهده شده در طیف های زایلان و زایلان کربوکسی متیل دار شده

در محدوده ۳۱۰۰-۳۴۰۰ مربوط به حضور گروه‌های هیدروکسیل هستند (Rivas, Galletti et al. 2015). همچنین حضور باندهای جذب در طول موج های 1643 cm^{-1} - 1043 cm^{-1} و 984 cm^{-1} در هر دو نمونه به ترتیب مربوط به گروه‌های C=O و C-O متعلق به گروه های بتا- گلیکوزیدی می باشند. در زایلان کربوکسی متیل دار شده، حضور باند جذب در 1640 cm^{-1} نشان دهنده حضور گروه‌های کربوکسیل است. این مشاهدات تأییدی بر عامل دار شدن زایلان می باشند (Queirós, Sousa et al. 2017). وجود پیک پهن در زاویه $19/2$ درجه در نتایج XRD نشان دهنده ی خاصیت نیمه بلورین زایلان است. نتایج مشابهی برای ساختار زایلان ذرت گزارش شده است (Kong, Huang et al. 2016). پهن تر شدن پیک مشخصه زایلان پس از عامل دار شدن (کربوکسی متیل زایلان) تأییدی بر افزایش نواحی آمورف آن می باشد. کاهش شدت و پهنای پیک مشخصه کیتوسان پس از تشکیل فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نشان دهنده کاهش بلورینگی فیلم در مقایسه با کیتوسان می باشد. پیک های مشاهده شده در طیف EDX در نواحی Kev ۰/۲۷۷، ۰/۵۲۵ و ۰/۳۹ به ترتیب حضور اتم های کربن، اکسیژن و نیتروژن را در ساختار فیلم نشان می دهد. همچنین وجود نیتروژن در طیف EDX تأییدی بر حضور کیتوسان در ساختار فیلم می باشد. نمودارهای حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان، فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان که در شکل ۵ نشان داده شده است. بیانگر پیک های اندوترمیک مشاهده شده در دمای کمتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس در نمودارها ناشی از تبخیر آب سطحی و جذب شده موجود در نمونه ها می باشد. پیک های اگزوترمیک دیده شده کاهش پایداری حرارتی کربوکسی متیل زایلان در مقایسه با زایلان می تواند به کاهش درجه کریستالینته ی زایلان در اثر فرآیند کربوکسی متیل کردن از طریق جانشینی گروه های کربوکسیل در ساختار زایلان باشد (Casaburi, Montoya Rojo et al. 2018). در نمودارها در دمای بیشتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس ناشی از تخریب پلیمر است (Saeed, Fatehi et al. 2014). نمودارهای حرارتی زایلان و کربوکسی متیل زایلان، فیلم های زایلان/کیتوسان و کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در شکل ۵ نشان داده شده است. پیک های اندوترمیک مشاهده شده در دمای کمتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس در نمودارها ناشی از تبخیر آب سطحی و جذب شده موجود در نمونه ها است. پیک های اگزوترمیک دیده شده در نمودارها در دمای بیشتر از ۲۰۰ درجه سلسیوس ناشی از تخریب پلیمر است (Saeed, Fatehi et al. 2014). افزایش نفوذپذیری فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان می تواند به دلیل افزایش ویژگی آبدوستی کربوکسی متیل زایلان نسبت به زایلان باشد. در تحقیقی ابتدا کربوکسی متیل زایلان با درجه های استخلاف متفاوت (۱/۱۳-۰/۳۶) از زایلان استخراج شده از خمیر کرافت رنگبری شده توس تهیه شد و سپس نفوذپذیری فیلم های حاصل از زایلان کربوکسیله شده با درجه استخلاف متفاوت بررسی شد. نتایج نشان داد که افزایش درجه استخلاف کربوکسی متیل زایلان سبب افزایش نفوذپذیری فیلم ها نسبت به بخار آب شد (Lefnaoui and Moulai-Mostefa 2015). هر دو فیلم کربوکسی متیل دار شده/کیتوسان و فیلم زایلان/کیتوسان دارای روشنایی و شفافیت یکسانی می باشند (Koosha and Hamed 2019). این مشاهدات می تواند به فرآیند کربوکسی متیل دار کردن زایلان (تولید پودر شفاف تر پس از کربوکسیله شدن) نسبت داده شود (Koosha and Hamed 2019). در یک تحقیق، شاخص روشنایی فیلم حاصل از کیتوسان و PVA، در مقایسه با فیلم شاهد (PVA) به دلیل حضور کیتوسان، کاهش یافته است (Suman, Mancini et al. 2010).

افزایش میزان تورم فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان نسبت به فیلم زایلان/کیتوسان می تواند به حضور گروه های کربوکسی متیل در زنجیره پلیمری زایلان کربوکسی متیل دار شده که سبب افزایش ویژگی آبدوستی آن در مقایسه با زایلان و همچنین میزان جذب و نگهداری آب در فیلم می شود، نسبت داده شود (Li, Lin et al. 2019). افزایش استحکام فیلم کربوکسی متیل زایلان/کیتوسان در مقایسه با فیلم زایلان/کیتوسان می تواند به دلیل تشکیل پلی الکتروولیت از طریق ایجاد اتصال بین گروه های آمین کیتوسان و گروه های کربوکسیل زایلان باشد. در یک تحقیق گزارش شده که مقاومت به پاره شدن و استحکام کششی در فیلم کربوکسی متیل سولز/کیتوسان نسبت به فیلم سولز/کیتوسان افزایش یافته است (Valizadeh, Naseri et al. 2019). با توجه به اینکه در منابع ذکر شده که زایلان و مشتقات آن دارای خواص ضد میکروبی نمی باشند، بنابراین خاصیت ضدباکتریایی فیلم از حضور کیتوسان ناشی می شود (Chang, Frias et al. 2019). با توجه به تشکیل گروه‌های آمینی با بار مثبت (NH_3^+) پس از انحلال کیتوسان در محلول اسیدی رقیق، بروز خاصیت ضد میکروبی می تواند به برهم کنش میان این ساختار پلی کاتیونی و گروه‌های با بار منفی روی غشاء سلول های باکتریایی نسبت داده شود. این جاذبه الکترواستاتیک از یک سو سبب تغییر در نفوذپذیری دیواره سلولی و عدم توازن اسمزی می شود که در نتیجه از رشد میکروارگانیسم ها

جلوگیری می کند. از سوی دیگر سبب هیدرولیز پپتیدوگلوکان های دیواره سلولی شده که سبب نشت الکتروولیت های داخل سلولی و ترکیبات پروتئینی می شود و مانع تکثیر و رشد سلولی باکتری ها می شود (Shanmugam, Kathiresan et al. 2016). نتایج تحقیق نشان می دهد که خاصیت ضدباکتریایی فیلم تهیه شده در برابر باکتری اشریشیاکلی در مقایسه با باکتری استافیلوکوکوس اورئوس قوی تر است. با توجه به قطبیت سطح باکتری ها، غشاء خارجی باکتری های گرم منفی از لیپوپلی ساکاریدها شامل گروه های فسفات و پیروفسفات تشکیل شده که سبب ایجاد بارهای منفی بیشتری در مقایسه با باکتری های گرم مثبت که دیواره آنها از لایه پپتیدوگلوکان تشکیل شده، می شود (Kumar, Deepak et al. 2016).

منابع:

- Ahlgren, P. A. and D. A. I. Goring (1971). "Removal of Wood Components During Chlorite Delignification of Black Spruce." *Canadian Journal of Chemistry* 49(8): 1272-1275.
- Akhgari, A., F. Farahmand, H. Afrasiabi Garekani, F. Sadeghi and T. Vandamme (2010). "The effect of pectin on swelling and permeability characteristics of free films containing Eudragit RL and/or RS as a coating formulation aimed for colonic drug delivery." *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 18(2): 91-96.
- Alekhina, M., K. S. Mikkonen, R. Alén, M. Tenkanen and H. Sixta (2014). "Carboxymethylation of alkali extracted xylan for preparation of bio-based packaging films ".*Carbohydrate Polymers* 100: 89-96.
- Anthony, R., Z. Xiang and T. Runge (2015). Paper coating performance of hemicellulose-rich natural polymer from distiller's grains.
- Carvalho, D. M. D. (2015). "Study on the structure and properties of xylan extracted from eucalyptus, sugarcane bagasse and sugarcane straw".
- Casaburi, A., Ú. Montoya Rojo, P. Cerrutti, A. Vázquez and M. L. Foresti (2018). "Carboxymethyl cellulose with tailored degree of substitution obtained from bacterial cellulose." *Food Hydrocolloids* 75 :147-156.
- Chang, A. K. T., R. R. Frias, L. V. Alvarez, U. G. Bigol and J. P. M. D. Guzman (2019). "Comparative antibacterial activity of commercial chitosan and chitosan extracted from *Auricularia* sp." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17: 189-199.
- Chen, G.-G., X.-M. Qi, Y. Guan, F. Peng, C.-L. Yao and R.-C. Sun (2016). "High Strength Hemicellulose-Based Nanocomposite Film for Food Packaging Applications." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4(4): 1985-1993.
- Chen, G.-G., X.-M. Qi, Y. Guan, F. Peng, C.-L. Yao and R.-C. Sun (2016). High Strength Hemicellulose-Based Nanocomposite Film for Food Packaging Applications.
- Guan, Y., X.-M. Qi, G.-G. Chen, F. Peng and R.-C. Sun (2016). "Facile approach to prepare drug-loading film from hemicelluloses and chitosan." *Carbohydrate polymers* 153: 542-548.
- Guan, Y., B. Zhang, X. Tan, X.-M. Qi, J. Bian, F. Peng and R.-C. Sun (2014). "Organic-Inorganic Composite Films Based on Modified Hemicelluloses with Clay Nanoplatelets." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2(7): 1811-1818.
- Hettrich, K., U. Drechsler, F. Loth and B. Volkert (2017). "Preparation and Characterization of Water-Soluble Xylan Ethers." *Polymer*9(4).
- Huang, B., M. Liu and C. Zhou (2017). Chitosan Composite Hydrogels Reinforced with Natural Clay Nanotubes.
- Kong, W., D. Huang, G. Xu, J. Ren, C. Liu, L. Zhao and R. Sun (2016). Graphene Oxide/Polyacrylamide/Aluminum Ion Cross-Linked Carboxymethyl Hemicellulose Nanocomposite Hydrogels with Very Tough and Elastic Properties.
- Koosha, M. and S. Hamed (2019). "Intelligent Chitosan/PVA nanocomposite films containing black carrot anthocyanin and bentonite nanoclays with improved mechanical, thermal and antibacterial properties." *Progress in Organic Coatings* 127: 338-347.
- Kumar, S., V. Deepak, M. Kumari and P. K. Dutta (2016). "Antibacterial activity of diisocyanate-modified chitosan for biomedical applications." *International Journal of Biological Macromolecules* 84: 349-353.
- Lefnaoui, S. and N. Moulai-Mostefa (2015). "Synthesis and evaluation of the structural and physicochemical properties of carboxymethyl pregelatinized starch as a pharmaceutical excipient." *Saudi Pharmaceutical Journal* 23(6): 698-711.
- Li, Z., S. Lin, S. An, L. Liu, Y. Hu and L. Wan (2019). "Preparation, characterization and anti-aflatoxigenic activity of chitosan packaging films incorporated with turmeric essential oil." *International Journal of Biological Macromolecules* 131: 420-434.

Peng, X.-W., J.-L. Ren, L.-X. Zhong, X.-F. Cao and R.-C. Sun (2011). "Microwave-Induced Synthesis of Carboxymethyl Hemicelluloses and Their Rheological Properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(2): 570-576.

Queirós, L. C. C., S. C. L. Sousa, A. F. S. Duarte, F. C. Domingues and A. M. M. Ramos (2017). "Development of carboxymethyl xylan films with functional properties." *Journal of Food Science and Technology* 54(1): 9-17.

Ren, J.-L., R.-C. Sun and F. Peng (2008). "Carboxymethylation of hemicelluloses isolated from sugarcane bagasse." *Polymer Degradation and Stability* 93(4): 786-793.

Rivas, S., A. Galletti, C. Antonetti, V. Santos and J. Carlos Parajó (2015). Sustainable Production of Levulinic Acid from the Cellulosic Fraction of Pinus Pinaster Wood: Operation in Aqueous Media Under Microwave Irradiation.

Saeed, A., P. Fatehi and Y. Ni (2014). Thermal Degradation Behavior of Lignin-Based Complexes Derived from Pre-Hydrolysis Liquor of Kraft-Based Dissolving Pulp Process.

Shanmugam, A., K. Kathiresan and L. Nayak (2016). "Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan and phosphorylated chitosan from cuttlebone of *Sepia kobeensis* (Hoyle, 1885)." *Biotechnology Reports* 9: 25-30.

Šimkovic, I., I. Kelnar, I. Uhliaríková, R. Mendichi, A. Mandalika and T. Elder (2014). "Carboxymethylated-, hydroxypropylsulfonated- and quaternized xylan derivative films." *Carbohydrate Polymers* 110: 464-471.

Sukhbaatar, B., E. B. Hassan, M. Kim, P. Steele and L. Ingram (2014). Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses.

Suman, S. P., R. A. Mancini, P. Joseph, R. Ramanathan, M. K. R. Konda, G. Dady and S. Yin (2010). "Packaging-specific influence of chitosan on color stability and lipid oxidation in refrigerated ground beef." *Meat Science* 86(4): 994-998.

Valizadeh, S., M. Naseri, S. Babaei, S. M. H. Hosseini and A. Imani (2019). Development of bioactive composite films from chitosan and carboxymethyl cellulose using glutaraldehyde, cinnamon essential oil and oleic acid.

Zhu Ryberg, Y. Z., U. Edlund and A. C. Albertsson (2011). "(Conceptual Approach to Renewable Barrier Film Design Based on Wood Hydrolysate." *Biomacromolecules* 12(4): 1355-1362.

Chemical Modification of the xylan extracted from bagasse pith to prepare antibacterial carboxymethyl xylan/chitosan film

Abstract

Bio-refinery includes technologies which can convert biomass resources to valuable products. In this study, carboxymethylation of the xylan-rich hemicelluloses extracted from sugarcane bagasse pith was performed. DS of the carboxymethyl xylan (CMX) was determined 0.68 using ICP-OES analysis. The presence of absorption bands at 1580 and 1311 cm^{-1} in the FTIR spectrum of the modified xylan are associated to the stretching vibration of C-O bonds of carboxymethyl groups. The carboxymethyl xylan/chitosan (CMX/CS) films were then prepared by casting method. XRD pattern showed that the intensity of the characteristic peaks of the chitosan reduced after film preparation which may be due to decreasing the crystalline nature of the film. SEM images showed that the surface of the film is uniform. The observed exothermic peak in DSC thermograms showed that the films degraded at higher than 200°C. Water vapor permeability (WVP) of the carboxymethyl xylan/chitosan film was measured $0.84 \pm 0.1 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$. Colorimetric analysis proved that the white index (WI) of the CMX/CS film increased as compared with xylan/chitosan film. In contrary, the yellow index (YI) of the CMX/CS film decreased. Swelling ratios of the CMX/CS and xylan/CS films were measured as 130.42 and 95.71 respectively. The prepared CMX/CS films exhibited higher tensile strength in compared to xylan/chitosan film. This may be resulted from the interactions between amine groups of chitosan and carboxyl groups of CMX. CMX/CS film exhibited the higher antibacterial activity against *E. coli* that *S. aureus*.

Keywords: bagasse pith, alkaline extraction of xylan, carboxymethyl xylan, xylan/chitosan film, carboxymethyl xylan/chitosan film, antibacterial activity

