نانوذرات کیتوسان: روش‌های تولید و کاربرد در بسته‌بندی مواد غذایی

بهجت تاج‌الدین

موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

چکیده

سال‌های زیادی است که بسپارهای مصنوعی به‌دلیل قابلیت‌های بسیار زیاد، در علوم متفاوت از جمله بسته‌بندی مواد غذایی، استفاده می‌شوند. اما در سال‌های اخیر، برای رفع مسایل زیست‌محیطی و اقتصادی ناشی از کاربرد بسپارهای مصنوعی در صنعت، بسپارهای طبیعی به شکل‌های متفاوت چندسازه‌ها، فیلم‌ها، و پوشش‌های خوراکی و غیر خوراکی وارد صنایع بسته‌بندی شده‌اند. به‌دلیل برخی ویژگی کاربردی به نسبت ضعیف بسپارهای طبیعی، از نانوذرات برای تقویت شبکه بسپاری آن‌ها استفاده می‌شود که بهبود ویژگی مکانیکی، فیزیکی، و میکروبی فیلم‌های حاصل را در بر دارد. در میان مواد بسپاری طبیعی، کیتوسان یکی از بسپارهای زیست‌تخریب‌پذیری است که با موفقیت توسعه یافته است. کیتوسان، این پلی‌ساکارید طبیعی و نانوکیتوسان حاصل از آن، به‌دلیل داشتن ویژگی غیرسمی، مکانیکی و ضدمیکروبی مناسب، سازگاری طبیعی با بافت‌های زنده و تجزیه‌پذیری، توجه ویژه‌ای را به‌خود جلب کرده است. مقاله حاضر، به بحث پیرامون کیتوسان، نانوکیتوسان و اثر استفاده از نانوکیتوسان در تهیه مواد بسته‌بندی می‌پردازد. هم‌چنین، به مهم‌ترین روش‌های تهیه نانوکیتوسان اشاره می‌شود. نانوذرات کیتوسان وقتی به مقدار بهینه در ساختار انواع مواد بسته‌بندی استفاده شوند، ویژگی جدیدی مانند افزایش مقاومت کششی فیلم حاصل، کاهش نفوذپذیری پوشش یا فیلم بسته‌بندی نسبت به رطوبت و گازها، و ویژگی ضدمیکروبی قابل توجه‌ای را ایجاد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: *بسته‌بندی، کیتوسان، نانوذرات، نانوکیتوسان، عمر ماندگاری*

behjat.tajeddin@yahoo.com ; b.tajeddin@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۳/۲۲ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۰۶/۱۰

۱- مقدمه

پایداری زیست‌محیطی[1] و استفاده از مواد طبیعی قابل قبول از نظر زیست‌محیطی، موضوع مهم پژوهش‌های علمی و صنعتی است. در سال‌های اخیر، شناسایی و کاربرد بسپارهای طبیعی مناسب به‌جای بسپارهای معمول مشتق شده از نفت مانند پلی-اتیلن (PE)، پلی‌پروپیلن (PE)، پلی‌استایرن (PS)، پلی‌اتیلن ترفتالات (PET)، و پلی‌وینیل کلراید (PVC) یا کاهش سهم مشارکت آن‌ها، توجه بیشتری را به‌خود جلب کرده است. علیرغم ویژگی جذاب بسپارهای مصنوعی ازجمله دسترسي فراوان به ماده اولیه، هزینه نسبتاً پایین، ویژگي‌هاي مکانیکي مطلوب، بازدارندگي مناسب در برابر اکسیژن، دي‌اکسیدکربن و ترکیبات معطر؛ مهم‌ترین مشکل آن‌ها، زمان‌بر بودن فرایند تجزیه است که باعث آلودگي محیط‌زیست مي‌شود. هم‌چنین، آلودگي مواد غذایی به‌دلیل احتمال مهاجرت مواد بسته‌بندي پلاستیکي به غذا یا برعکس، از مشکلات دیگر این مواد است که باعث کاهش امنیت غذایي و تغییر طعم می‌شود. بنابراین، پلیمرهاي طبیعي مثل پلي‌ساکاریدها، پروتیین‌ها و چربی‌ها، تا حدودی مي‌توانند این مشکل را برطرف کنند است [۲ و۱].

البته، بسپارهای طبیعی نیز بیشتر به‌دلیل ماهیت آبدوستی و ویژگی فیزیکی و مکانیکی ضعیف خود، از پس تمام نیازهای یک عمل بسته بندی مطلوب مواد غذایی بر نمی‌آیند. از این رو، مواد طبیعی در مقیاس نانو به مواد بسته‌بندی متداول مثل فلز، شیشه، کاغذ، و بسپارهای مصنوعی افزوده می‌شوند. دلایل اصلی بسته‌بندی غذاها با این مواد، حفاظت ماده غذایی از گرد و خاک، گازها، نور، میکرب‌های بیماری‌زا، و رطوبت است. اصولا این مواد، ایمن، خنثی، ارزان و قابل دسترس هستند. علاوه بر این، خصوصیاتی مانند ویژگی‌های مکانیکی، الکتریکی، حرارتی، نوری، و الکتروشیمیایی نانومواد نسبت به ترکیبات معمولی، کاملا متفاوت است [۳ و۱]. جزئیات بیشتری از کاربرد بسپارهای طبیعی نانویی در صنعت بسته‌بندی توسط تاج‌الدین [۳]، ارائه شده است.

در میان بسپارهای بی‌شماری که برای ساخت نانوذرات بسپاری استفاده شده است، کیتوسان به‌دلیل ویژگی جذابی مانند زیست‌تخریب‌پذیری[2] و زیست‌سازگاری[3]، (۲) تایید FDA[4] برای کاربردهای غذایی و دارویی (از جمله پانسمان زخم)، (۳) غیرسمی بودن، (۴) گستره رهاسازی پایدار، (۵) امکان تغییر ویژگی‌های سطح، و (۶) گستره نانوذرات هدف به اندام‌ها یا سلول‌های خاص، توجه قابل توجهی را به‌خود جلب کرده است [۵ و۴]. ذرات کیتوسان در ابعاد نانو، برای تقویت شبکه بسپاری به‌دلیل ویژگی‌های مکانیکی منحصر به‌فرد و قابلیت اتصال بالا استفاده می‌شوند تا با کوچک‌تر شدن ذرات، نقص‌های تقویت‌کننده‌های ماکروسکوپی را کاهش دهند. نانوذرات و نانوچندسازه‌های حاصل از کیتوسان و مشتقات آن به‌دلیل ویژگی قابل توجه آن، بسیار امیدوارکننده بوده و کاربردهای زیادی در زمینه‌های متفاوت پزشکی، مواد غذایی، بسته‌بندی مواد غذایی و مراقبت‌های شخصی پیدا کرده‌اند. برای مثال، تأثیر کیتوسان فله[5]، نانوذرات کیتوسان، نانوذرات کیتوسان آمیخته با گلوتارآلدئید با اندازه متوسط ۳۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بر سلول‌های سرطانی روده بزرگ[6] برای بررسی قابلیت سمیت سلولی[7] و ضدسرطانی[8] آن‌ها بررسی شد و نتایج نشان داد که هرسه شکل کیتوسان مورد استفاده، اثر بسیار خوبی در درمان سرطان روده بزرگ دارند [۶]. همچنین، در مطالعه روش‌های متفاوت تهیه میکرو و نانوذرات کیتوسان[9]، و نقش مشتقات کیتوسان و نانوذرات فلزی کیتوسان به‌عنوان حامل دارو، چنین نتیجه‌گیری شد که این مواد از نظر درمانی، پایدارتر، نفوذپذیر، و فعال زیستی هستند [۷]. کیتوسان، به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی و مهندسی زیستی برای کپسوله‌کردن ترکیبات غذایی فعال، تثبیت آنزیم، حامل داروی کنترل شده، و در کشاورزی به‌عنوان عامل رشد استفاده می‌شود. همچنین، کیتوسان یک عامل دفاعی و ضد میکروبی است [۸]. مطالعات بسیاری نشان می‌دهد که نانوذرات کیتوسان و مشتقات آن، یکی از بهترین مواد با ویژگی سدکنندگی و فیلم پوششی برای حفظ کیفیت مواد غذایی و تهیه فراورده‌های مراقبت از پوست است که عمدتا به‌دلیل تجزیه‌پذیری و ویژگی ضد میکروبی آن‌ها است [۲]. نانوذرات کیتوسان برای محاصره مواد فعال زیستی و تثبیت[10] آنزیم‌ها از طریق فناوری کپسوله کردن (محصورسازی[1]) و تثبیت یا غیرفعال کردن آنزیم‌ها نیز بررسی شده است.

[1] Environmental sustainability

[2] Biodegradability
[3] Biocompatibility
[4] Food and Drug Administration
[5] Chitosan-bulk
[6] Human colorectal carcinoma cells
[7] Cytotoxic
[8] Anti-cancer
[9] Chitosan micro- and nanoparticles
[10] Immobilization

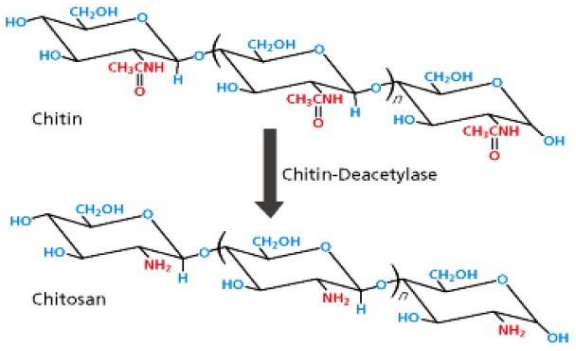
فناوری‌هایی که در صنایع غذایی و مهندسی زیستی، خیلی اهمیت دارند [۹].

باوجود بیشتر بودن مقاله‌ها در مورد کاربرد نانومواد برای تهیه مواد بسپاری طبیعی، و با توجه به موارد بالا، به‌نظر می‌رسد که استفاده از نانوکیتوسان در صنعت بسته‌بندی، در مراحل ابتدایی خود بوده و بررسی عمیق‌تری را می‌طلبد. از این رو، مقاله حاضر به بررسی پلی‌ساکارید کیتوسان، چگونگی تهیه نانوکیتوسان، ویژگی نانوکیتوسان و نقش آن در بسته‌بندی موادغذایی می‌پردازد.

۲- کیتوسان و ساختار شیمیایی آن

کیتوسان با فرمول مولکولی $(C_6H_{11}NO_5)_n$، برای اولین بار از یک نوع قارچ از خانواده موکور استخراج و شناسایی شد که در این قارچ، به‌طور طبیعی کیتین[۲] توسط آنزیم به کیتوسان تبدیل می‌شود [۱۰]. به‌طور کلی، کیتوسان پلی‌ساکارید کوبسپار خطی[۳] ازت‌دار طبیعی بوده و پس از سلولز، فراوان‌ترین بسپار موجود در طبیعت است که از کیتین موجود در پوست سخت‌پوستانی چون میگو و خرچنگ، حشرات، و میسلیوم و دیواره سلولی قارچ‌ها به‌دست می‌آید. کیتین از منابع طبیعی پیوندخورده با پروتئین‌ها و مواد معدنی است که برای تهیه کیتوسان، ابتدا بایستی طی فرایندهای اسیدی و بازی از آن‌ها جدا و خالص شود. سپس، کیتین خالص شده طی فرایند دی‌استیل شدن[۴] به کیتوسان تبدیل می‌شود (شکل ۱)، [۱۲-۱۱ و۴]. این فرایند را می‌توان با کنترل ویژگی‌های فراورده نهایی (از جمله متوسط وزن مولکولی (Mw[۵]) و ثابت تفکیک اسیدی (pKa) حدود ۷/۵-۶، به‌واسطه کنترل درجه دی‌استیلاسیون (DD[۶]) تحت‌تاثیر عواملی مانند شرایط واکنش (غلظت، نسبت‌های کیتین به باز، دما)، منبع کیتین و مقدار واکنش، اصلاح کرد. البته، افزون بر این روش‌های شیمیایی که در صنعت اجرا می‌شود، پژوهشگران درصدد یافتن روش‌های زیستی، آنزیمی یا ترکیبی از این‌ها، با کمک میکروارگانیسم‌ها هستند [۴]. به‌عبارت دیگر، شرایط مورد استفاده برای دی‌استیلاسیون، Mw و DD را تعیین می‌کند. معمولا، DD یک کیتوسان تجارتی بین ۷۰ تا ۹۵ درصد و Mw آن بین ۱۰ و ۱۰۰۰ کیلو دالتون (KDa) است. متوسط مقدار کشنده خوراکی۷ کیتوسان در موش‌ها، بالای ۱۶ گرم بر کیلوگرم گزارش شده است [۱۲].

ساختمان کیتوسان به سلولز خیلی شبیه است با این تفاوت که در موقعیت کربن شماره دو حلقه‌های گلوکز، در سلولز گروه‌های عاملی هیدروکسیل (OH) و در کیتوسان گروه عامل آمین (NH_2) قرار دارند (شکل ۱). به‌همین دلیل، کیتوسان یک آمینو پلی‌ساکارید کاتیونی است. در تبدیل کیتین به کیتوسان، گروه N-استیل موجود روی کربن شماره دو کیتین به گروه آمین (NH_2) تبدیل می‌شود. پس، کیتوسان دارای مقادیر متفاوتی از گروه‌های آمین آزاد است و می‌تواند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی و یونی، در واکنش‌ها شرکت کند [۱۰]. pKa آمین اولیه کیتوسان بسته به مقدار دی‌استیلاسیون، تقریبا ۶/۵ است. این گروه، به حلالیت کیتوسان در محیط‌های با pH اسیدی کمک می‌کند و خنثی‌سازی نسبی این آمین اولیه نیز ممکن است دلیل توجیه عملکرد کیتوسان در pH خنثی تا بالا باشد [۴].



شکل۱. تبدیل کیتین به کیتوسان [۱۳]

ویژگی کیتوسان برای دست‌یابی به اهداف متفاوت، به‌صورت فیزیکی یا شیمیایی قابل اصلاح است. بهبود فیزیکی کیتوسان با مخلوط‌کردن[۸] حاصل می‌شود که شامل اختلاط فیزیکی دو یا چند بسپار است. این یکی از قدیمی‌ترین و آسان‌ترین روش‌های بهبود و تغییر بسپار است. کیفیت و عملکرد مخلوط، بسته به نسبت بسپارهایی که با هم مخلوط می‌شوند، قابل تغییر است. مخلوط-کردن، اقتصادی‌ترین روشی است که با استفاده از آن می‌توان ویژگی بسپار را برای برنامه‌های خاص تنظیم کرد [۱۴ و ۴]. پلی-وینیل الکل (PVA)، پلی‌وینیل پیرولیدان (PVP[۹])، و پلی‌اتیل

[1] Encapsulation
[2] Deacetylation of chitin
[3] A linear copolymer polysaccharide
[4] Deacetylation of chitin
[5] Average molecular weight
[6] Degree of deacetylation
[7] Oral LD50
[8] Blending
[9] Poly (vinyl pyrrolidone)

اکساید (PEO[1])، برخی از بسپارهای آبدوست متداولی هستند که در ترکیب با کیتوسان برای کاربردهای دارویی استفاده می‌شوند. این ترکیب، ویژگی مکانیکی (مقاومت کششی) و نفوذناپذیری نسبت به بخار آب کیتوسان را افزایش می‌دهد [۱۵].

تهیه مشتقات متفاوت کیتوسان برای کاربردهای بالقوه آن‌ها به روش‌های شیمیایی نیز امکان‌پذیر است. مشتقات کیتوسان از طریق تغییر در گروه‌های عاملی[2] آمین یا هیدروکسیل تولید می‌شود. این تغییر، منجر به تغییر اسکلت بنیادی کیتوسان نمی‌شود بلکه مشتقات مشخص شده با ویژگی جدید یا بهبود یافته‌ای را به‌همراه می‌آورد [۷]. به‌عبارت دیگر، گروه‌های آمینی و هیدروکسیل اولیه موجود در ساختمان کیتوسان، امکان اصلاح شیمیایی آن را برای کنترل ویژگی فیزیکی کیتوسان فراهم می‌کند [۱۶]. برای مثال، در بررسی ویژگی زیست‌تخریب‌پذیری، فعالیت ضدمیکروبی و غیرسمی بودن کیتوسان توسط Dutta و همکارانش [۱۰]، مشخص شد که یکی از دلایل ویژگی ضدمیکروبی کیتوسان، وجود گروه آمین در موقعیت کربن شماره دو کیتوسان است که با داشتن بار مثبت، با بار منفی غشاهای سلول میکروبی واکنش داده و منجر به نشت مواد درون سلول میکروارگانیسم‌ها می‌شود. چنین توجیهی برای نقش کیتوسان در مقابل سلول‌های سرطانی نیز وجود دارد [۴].

۳- نانوکیتوسان

نانوذرات کیتوسان، به‌عنوان ذرات پراکنده یا ذرات جامد با اندازه در محدوده ۱-۱۰۰ نانومتر تعیین می‌شوند. به‌دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، یکی از جالب‌ترین ابزارها برای تعامل با سطوح پدید آمده‌اند. نانوذرات تهیه شده با کیتوسان و مشتقات کیتوسان نیز به‌طور معمول دارای بار سطحی مثبت هستند [۴]. از این رو، طی دهه‌های گذشته، علاقه زیادی به تحقیقات در زمینه استفاده از آن‌ها به‌عنوان جاذب[3] وجود داشته است [۱۷]. نانوذرات کیتوسان، با توجه به اندازه کوچک و نسبت سطح به حجم بزرگی که دارند ویژگی فیزیکوشیمیایی، ضدباکتری و زیستی بهتری نسبت به حالت توده متناظر را دارند، و به‌دلیل توانایی حمل انواع دارو به قسمت‌های متفاوت بدن در زمان مناسب، توجه زیادی را در دارورسانی به‌خود جلب کرده‌اند. نانوکیتوسان در تصفیه فاضلاب[4] [۱۷] و صنایع رنگ [۱۸] نیز خیلی مورد توجه است. هم‌چنین، این مواد به‌دلیل داشتن ویژگی تقویت‌کنندگی مناسب و پایداری، دسترس‌پذیری آسان و برخی از ویژگی‌های مانند سطح ویژه بالا و برقراری اتصالات اتمی بیش‌تر با شبکه، ویژگی‌های مکانیکی و حرارتی، الکتریکی و انعطاف‌پذیری و سختی مناسب در مقایسه با دیگر مواد تجاری موجود، از قابلیت بالایی برای کاربردهای متفاوت از جمله صنعت بسته‌بندی مواد غذایی دارند [۲۱-۱۹]. در حالت کلی، برای تهیه نانوذرات کیتوسان، ابتدا تعلیقه‌ای با افزودن حلال آلی به محلول کیتوسان با سورفکتانت بوسیله اولتراسونیکیشن[5] (فراصوت) آماده می‌شود. سپس، تعلیقه حاصل به محلول سورفکتانت افزوده شده و تا بخار شدن حلال آلی هم‌زده می‌شود؛ اما جزئیات روش‌های متفاوت تهیه آن در زیر بحث می‌شود.

۴- روش‌های تولید نانوذرات کیتوسان

همان‌طور که Grenha [۲۰] استناد کرده است، برای نخستین بار، نانوذرات کیتوسان در سال ۱۹۹۴ توسط Ohya و همکارانش [۲۲] از طریق امولسیفیکاسیون[6] و پیوند عرضی[7] به‌عنوان حامل داروی سرطان تشریح شد. پس از آن، به‌طور گسترده‌ای، روش‌های متفاوتی برای تولید نانوکیتوسان با کاربردهای گوناگون توسط بسیاری از پژوهشگران مطالعه و بررسی شد. روش‌های متفاوت تهیه نانوذرات کیتوسان از دیدگاه روش‌شناسی و مکانیکی، با توجه به ماده اتصال‌دهنده عرضی[8] شامل آلدهید، تری‌پلی‌فسفات (TPP)، ژنیپین[9] و سایر اتصال‌دهنده‌های عرضی و رفتار فیزیکوشیمیایی نانوذرات کیتوسان از جمله بارگیری دارو، رهاسازی دارو، اندازه ذرات، پتانسیل زتا[10]، و مقاومت، و شاخص پراکندگی (PDI[11]) توسط Naskar و همکارانش [۵] بررسی شده است و نشان می‌دهد که به‌درستی، کیتوسان برای طراحی نانوذرات در کاربردهای متفاوت دارویی انتخاب شده است. در تهیه نانوذرات کیتوسان بر اساس روش ژلاسیون یونی[12] توسط اصغری و همکارانش [۲۳] معلوم شد که اندازهٔ ذرات و پتانسیل زتا را می‌توان با تغییر شرایط، از جمله استفاده از نسبت‌های متفاوت وزنی و حجمی کیتوسان و تنظیم pH کنترل کرد.

[1] Poly (ethyl oxide)
[2] Functional groups
[3] Adsorbent
[4] waste water treatment

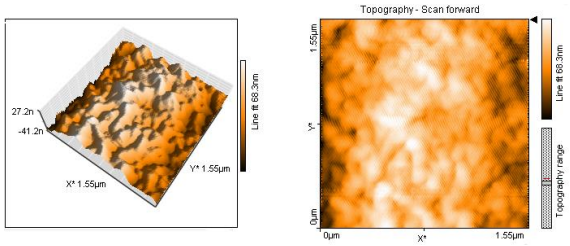
[5] ultrasonication
[6] Emulsification
[7] Cross-linking
[8] Crosslinking agent
[9] Genipin
[10] Zeta-potential
[11] Poly Dispersity Index
[12] Ionic (Ionotropic) gelation

به‌طور کلی، براي تهيه نانوذرات کيتوسان، حداقل چهار روش ژل يونی، ميکروتعليقه[1]، نفوذ حلال تعليقه[2]، و کمپلکس پلی-الکترولیت (PEC[3]) گزارش شده است. روش‌هایی مانند انعقاد قطرات تعليقه[4]، ميسيلاسيون معکوس[5]، و حلال‌پذيری[6] نيز از راه-های متفاوت تهيه نانوکيتوسان به‌حساب می‌آيند [۲۴ و ۱۷]. در ميان اين روش‌ها، روش ژله‌ای شدن، به‌دليل ساده بودن، عدم استفاده از حلال آلی و حرارت بالا بيشتر استفاده می‌شود. اين روش، بر پايه برهم‌کنش الکترواستاتيک بين گروه‌هاي آمين آزاد کيتوسان و گروه‌هاي با بار منفی پلی‌آنيونی مثل تري‌پلی‌فسفات (TPP) است و باعث تشکيل هيدروژلی از ميکروذرات يا نانوذرات می‌شود که ممکن است براي انکپسوله شدن و يا رهايش کنترل شدهٔ داروها و ترکيبات متفاوت استفاده شوند. در اين روش، ابتدا کيتوسان در اسيد استيک در حضور يا غياب عامل تثبيت‌کننده، حل می‌شود. سپس پلی‌آنيون به آن افزوده شده و نانوذرات به‌تدريج با هم‌زن مکانيکی تشکيل می‌گردند. در روش ميکروتعليقه، يک ماده فعال در سطح در يک حلال آلی مثل n-هگزان، حل می‌شود. سپس کيتوسان در محلول استيک اسيد و گلوتارالدئيد به مخلوط ماده فعال در سطح/ هگزان در شرايط هم‌زدن پيوسته در دمای اتاق، افزوده می‌شود. کمپلکس پلی-الکترولیت (PEC) يا پلی‌الکترولیت خودتجمع، اصطلاحی برای بيان کمپلکس‌های تشکيل‌شده با استفاده از خودتجمعی بسپارهای کاتيونی و DNA پلاسميد است. سازوکار تشکيل PEC شامل خنثی سازی بار بين بسپارکاتيونی و DNA منجر به کاهش آبدوستی جزء پلی‌الکترولیت خودتجمع می‌شود. در اين روش، نانوذرات به‌تدريج پس از افزودن محلول DNA به محلول کيتوسان در استيک اسيد در حين هم‌زدن مکانيکی و يا در دمای اتاق، تشکيل می‌شوند [۲۳ و ۲۰].

با توجه به پيشرفت سريع فناوری و تجهيزات نانو، ابزارهای ديگری نيز به کمک آمده‌اند. برای مثال، سوسپانسيون نانوذرات کيتوسان با پراکندگی مناسب، از ضايعات پوست خرچنگ به‌روش آسياب دانه‌ای[7] توليد شد. ماده فعال در سطح توين۸۰[8]، به‌عنوان عامل پراکندگی[9] برای بهبود پايداری پراکندگی[10] به کار رفت. سيستم معلق نانوذرات کيتوسان تک‌پراکنده[11] در زمان‌های آسياب[12] ۹۰ و ۱۲۰ دقيقه با تنظيم مقدار pH آن‌ها به‌دست آمد.

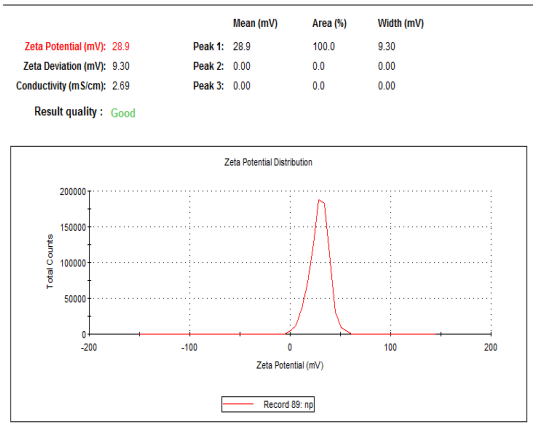
نتايج بررسی ويژگی‌های اندازه و توزيع اندازه[13]، ثبات ذرات، ويژگی‌های گروه‌های عاملی، و درجه دی‌استيلاسيون نشان داد که نانوذرات کيتوسان در فرايند آسياب ۹۰ دقيقه‌ای و محلول با pH پايين[14] به‌دست آمد. بنابراين، نتيجه گرفتند که فرايند آسياب-کردن دانه‌ای برای تهيه نانوذرات کيتوسان با تنظيم مناسب زمان آسياب، pH، و نوع و مقدار عامل پراکندگی مناسب است [۲۵].

برای تاييد اندازه نانومتری ذرات کيتوسان توليدی، از روش‌های متفاوتی مانند تصويربرداری نيروی اتمی (AFM)، ميکروسکوپ تونلي روبشي (STM)، ميکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و غيره استفاده می‌شود و در صورتی که اندازه ذرات بين ۱۰۰-۱ نانومتر باشد، آن ذرات به‌عنوان نانوذرات گزارش می-شوند. شکل ۲، نمونه‌ای از تصاوير AFM گرفته شده از نانو ذرات کيتوسان را نشان می‌دهد. با دستگاه تعيين اندازه نانوزتا نيز شاخص پتانسيل زتا که يکی از عوامل مهم در پايداری مواد کلوئيدی است، تعيين می‌شود. پتانسيل زتا، به بار سطح ذرات موجود در يک سيال گفته می‌شود. شکل ۳، مثالی از اندازه‌گيری شاخص پتانسيل زتا است.



شکل۲. گستره نانوذرات کيتوسانی که در لايه سطحی نشان شده است، بيش‌تر در ۷۰ نانومتر قرار گرفته است [۲۶]

[1] Microemulsion diffusion
[2] Emulsion solvent diffusion
[3] Polyelectrolyte complex
[4] Emulsion-droplet coalescence
[5] Reverse micellar (Reverse micellisation)
[6] Dissolvation
[7] Beads-milling method
[8] Tween 80 surfactant
[9] Dispersing agent
[10] Dispersion stability
[11] A mono-dispersed chitosan nanoparticle suspension
[12] Milling times
[13] Size and size distribution
[14] Low pH dispersion medium



شکل۳. پتانسیل زتای نانوذرات کیتوسان (با وزن مولکولی پایین) حاصل از نسبت ۲ به ۵ کیتوسان/تری‌پلی‌فسفات [۲۳]

۴- کاربرد نانوکیتوسان در بسته‌بندی مواد غذایی

در سراسر جهان، هر سال، میلیون‌ها تن سخت‌پوست تولید شده و به‌عنوان غذاهای دریایی سرشار از پروتئین مصرف می‌شوند. پوسته‌های سخت‌پوستان و سایر قسمت‌های غیرخوراکی تقریبی نیمی از جرم بدن آن‌ها را تشکیل می‌دهد که معمولاً دور ریخته می‌شوند. به‌طور متوسط، صنایع غذایی دریایی ۸۰،۰۰۰ تن در سال زباله تولید می‌کند [۸]. این زباله‌ها، منبع بزرگی از پلی-ساکارید (کیتین) و پروتئین هستند. از آنجایی که مصرف‌کنندگان همواره غذای سالم و ایمن با حداقل مواد مصنوعی را تقاضا می-کنند، کیتوسان به‌دست آمده از کیتین، گزینه سالمی برای کاربرد در صنعت غذا است. همان‌طور که بالاتر گفته شد، کیتوسان فرم دی‌استیله شده از کیتین حاصل از ضایعات بالا است که به‌دلیل ویژگی‌های خاص خود مانند حلالیت در اسیدهای ضعیف[1]، توانایی تشکیل فیلم، حساسیت به pH، زیست‌تخریب‌پذیری، و زیست‌سازگاری مورد توجه برنامه‌های کاربردی صنایع غذایی است. در زمینه صنایع غذایی، تمرکز اصلی روی ساخت و کاربرد فیلم‌ها و پوشش‌های چندسازهی مبتنی بر کیتوسان برای افزایش عمرماندگاری پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها قرار دارد. نانوچندسازه‌های کیتوسان نیز گزینه‌های ضد میکروبی در حال ظهور برای بسته‌بندی مواد غذایی از طریق روش‌های پاششی[2]، فرو بردن[3]، پوشش‌دهی[4]، یا لفاف پیچی فیلم‌ها[5] به‌منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی قابل فساد هستند [۲۷ و ۱۸].

Kumar و همکارانشش [۲۷]، در بررسی جامعی از پژوهش‌ها اعلام کردند که ترکیب نانو مواد در بسته‌بندی و نگهداری مواد غذایی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند، کیفیت و ایمنی مواد غذایی را بهبود می‌بخشد، و ماندگاری مواد غذایی را افزایش می‌دهد. استفاده از فیلم‌ها یا پوشش‌های مبتنی بر کیتوسان باعث افزایش ماندگاری محصولات تازه‌ای چون میوه-ها و سبزی‌ها، فرآورده‌های گوشتی، نان، و لبنیات از جمله پنیر شده است.

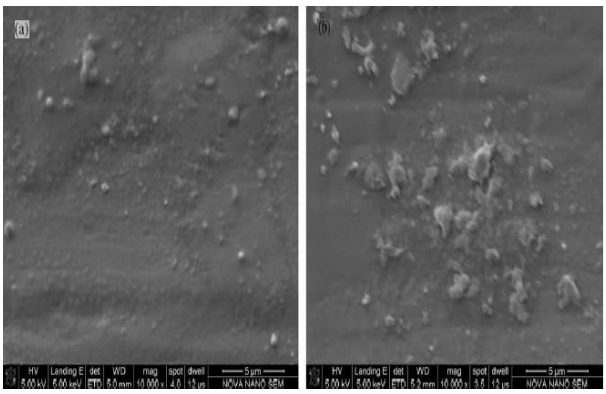
۴-۱- غلظت موثر نانوذرات کیتوسان

استفاده از مقدار معینی از نانوذرات به‌عنوان پرکننده، یکی از عوامل مهم در بحث نانو مواد طبیعی است. نانوذرات در غلظت بالا موجب تجمع ذرات و کلوخه‌ای شدن[6] می‌شود که باعث افت کیفیت فیلم بسته‌بندی و هم‌چنین کاهش سطح تماس نانوذره و بستر بسپار می‌گردد. غلظت پایین نانو ذرات نیز باعث ایجاد نقاط تمرکز تنش شده که نامطلوب است. نانو ذرات در غلظت بهینه دارای پخش‌پذیری مناسب بوده و موجب هم‌پوشانی بهتر در سطح شبکه می‌شوند و در نتیجه ویژگی مکانیکی و فیزیکی فیلم حاصل بهبود می‌یابد. عدم آگلومریزه شدن نانوذرات در سطح بسپار از اهمیت بالایی برخوردار است، چرا که بهبود نانوچندسازه‌های زیست‌تخریب‌پذیر در گرو پخش یکنواخت نانوذرات در تمامی سطح چندسازه است. از طرفی نانوذرات در مقدار مشخص و بهینه، اثر مثبت بر ویژگی‌های فیلم تهیه شده دارند و پایین‌تر و بالاتر از این مقدار، نتایج مورد انتظار را ایجاد نمی‌کند. برای مثال، پراکندگی نانوذرات کیتوسان در سطح شبکه نشاسته‌ای توسط Chang و همکارانش [۲۶] بررسی شد و معلوم گردید که پراکندگی نانوکیتوسان در شبکه نشاسته، در غلظت ۴ درصد کمترین تجمع ذرات و در غلظت ۸ درصد وزنی بالاترین تجمع ذرات و درنتیجه آگلومریزاسیون را دارد (شکل ۴). همچنین،در مطالعه‌ای فیلم‌های جدید بسته‌بندی پکتین/نانوکیتوسان با نسبت پکتین ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، و ۰؛ و نانوکیتوسان ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، و ۱۰۰ درصد وزنی/وزنی تهیه شد و برخی از ویژگی آن‌ها شامل ضخامت، ویژگی مکانیکی، نفوذپذیری بخار آب، حلالیت در آب، و نفوذپذیری اکسیژن

[1] Solubility in weak acids
[2] Spraying
[3] Dipping
[4] Coating
[5] Wrapping by films
[6] Agglomerization

ایجاد می‌شود [۲۶ و ۲۱]. همان‌طور که اشاره شد، غلظت بهینه نانوذره جاذب اهمیت است چرا که در نهایت در تعیین بسپاری از

تعیین شد. نتایج نشان داد که اختلاط پکتین با نانوکیتوسان با نسبت ۵۰:۵۰، مقاومت کششی فیلم حاصل را به ۸/۹۶ مگاپاسکال افزایش داد اما حلالیت در آب به ۳۷/۵ درصد، نفوذپذیری به بخار آب به ۰/۲۰۵۲ گرم میلی‌متر بر مترمربع در روز در کیلوپاسکال، و نفوذپذیری اکسیژن به ۴۷/۶۷ میلی‌لیتر میلی‌متر بر متر مربع در روز کاهش یافت. نتایج آزمون زاویه تماس[1] معلوم کرد که فیلم‌های پکتین/ نانوکیتوسان آبگریز بودند، و از رشد *Colletotrichum gloeosporioides*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Aspergillus niger*، و *Escherichia coli* ممانعت کردند. به‌طور کلی، نتیجه بررسی ویژگی از طرفی و مطالعات ریزساختاری با SEM و تداخل بین پکتین و نانوکیتوسان با ATR-FTIR[2] از طرف دیگر، مشخص کرد که فیلم‌های پکتین/نانوکیتوسان با نسبت ۵۰:۵۰ می‌تواند به‌عنوان فیلم فعال برای افزایش ماندگاری مواد غذایی استفاده شود [۲۸].



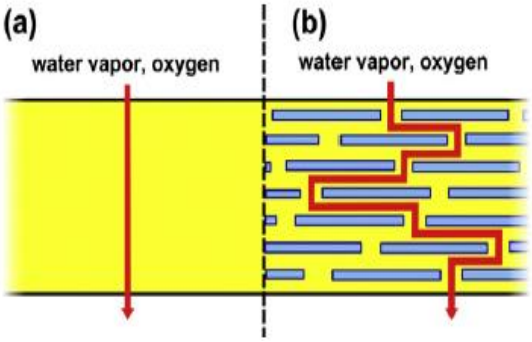
شکل۴. سطح بسپار طبیعی حاوی نشاسته و به‌ترتیب شامل ۴ (a) و ۸ درصد وزنی (b) نانوذرات کیتوسان [۲۶]

نانوذرات به‌دلیل پخش‌پذیری بالایی که دارند در گستره تداخل فاز (اینترفاز[3]) باعث کاهش تحرک و در نتیجه افزایش مقاومت نانو چندسازه می‌شوند. به‌طورکلی، کاهش اندازه ذرات تقویت‌کننده باعث افزایش تعداد ذرات در شبکه بسپاری شده و به‌این ترتیب، ذرات به‌یکدیگر بسیار نزدیک‌تر قرار گرفته و هم‌پوشانی هرچه بیش‌تری بین نانوذرات تقویت‌کننده و شبکه

ویژگی چندسازه‌ها موثر است. در پژوهش Chang و همکارانشش [۲۶] بر نانوچندسازه نشاسته حاوی نانوکیتوسان، مشخص شد که با افزایش مقدار نانوکیتوسان، مقاومت کششی چندسازه زیاد می‌شود اما ازدیاد طول تا نقطه شکست کاهش می‌یابد به‌طوری که با افزایش غلظت نانو ذره از ۱ به ۶ درصد وزنی، مقاومت کششی از ۲/۸۴ به ۱۰/۸۰ مگاپاسکال افزایش و ازدیاد طول تا نقطه شکست از ۵۹/۳ به ۲۲/۷ درصد می‌رسد. این موضوع، به‌دلیل برهم‌کنش نانوذرات کیتوسان و شبکه نشاسته به‌علت ماهیت پلی‌ساکاریدی هردو آن‌ها بوده و در غلظت ۸ درصد وزنی مقاومت کششی چندسازه به ۸/۹ مگاپاسکال کاهش می‌یابد که به‌دلیل کلوخه‌ای شدن نانوذرات است.

یکی از اهداف بسته‌بندی موادغذایی، حفاظت فراورده از رطوبت و گازها است. هدف عمده از کنترل رطوبت در بسته‌بندی، کاهش فعالیت آبی فراورده، به‌منظور جلوگیری از رشد میکروبی است. مقدار نفوذپذیری چندسازه، به مقدار فضاهای خالی موجود در سطح شبکه بستگی دارد. توزیع یکنواخت پرکننده‌ها در ابعاد نانو در شبکه بسپاری بر ویژگی‌های بازدارندگی تاثیر به‌سزایی دارد. سازوکار اثرگذاری نانوذرات به این شکل است که از یک طرف تحرک موضعی زنجیرهای بسپار کاهش می‌یابد و فضای خالی بین آن‌ها کم‌تر می‌شود و از طرف دیگر گازها و بخارات آب برای عبور از بسپار باید مسیر زیگزاگی طولانی را طی کنند که در شکل ۵، نشان داده شده است. ویژگی‌های نفوذپذیری نانوچندسازه نسبت به ویژگی زیست بسپار در غیاب نانوذرات متفاوت است. وجود مسیر پرپیچ و خم، مسیر انتشار گازها و رطوبت را طولانی‌تر کرده و در نتیجه منجر به افزایش عمرماندگاری غذاهای فسادپذیر می‌شود [۲۹].

[1] Contact angle test
[2] Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared
[3] Interphase



شکل۵. تاثیر نانوذرات بر ویژگی بازدارندگی بسپارهای طبیعی، فیلم تشکیل شده از بسپار (a) و نانوچندسازه (b) [۲۶]

فیلم‌های پلی‌ساکاریدی به‌دلیل ویژگی آب‌دوستی که دارند مقاومت ضعیفی در برابر رطوبت از خود نشان می‌دهند. حساسیت نسبت به رطوبت، باعث ایجاد تغییر در ویژگی کاربردی فیلم پلی‌ساکاریدی در شرایط محیطی متفاوت شده و در نتیجه کاربرد فیلم‌های پلی‌ساکاریدی را در شرایط متفاوت (به‌ویژه در رطوبت نسبی بالاتر) محدود می‌سازد. همان‌طور که در بالا شرح داده شد، با قرارگرفتن نانوذرات در میان شبکه بسپاری، بازدارندگی فیلم در مقابل مولکول‌های گازی شکل مانند اکسیژن، بخارآب و ترکیبات معطر افزایش می‌یابد. در نتایج حاصل از آزمایشات Martelli و همکارانشش [۲۱]، معلوم شد که افزوده کردن نانوذرات کیتوسان به فیلم حاصل از پوره موز، باعث کاهش نفوذپذیری به بخارآب (WVP[1]) به مقدار ۲۱ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد می‌شود. هم‌چنین، نتایج Chang و همکارانشش [۲۶] مشخص کرد که غلظت ۱- ۴ درصد وزنی نانو کیتوسان در چندسازه نشاسته‌ای، WVP را کاهش می‌دهد و در غلظت ۶ درصد مقدار آن به حداقل مقدار خود می‌رسد، اما با افزایش نانوکیتوسان به مقدار ۸ درصد وزنی، افزایش اندکی در مقدار WVP مشاهده می‌شود که دلیل آن ایجاد مسیرهای زیگزاگی خیلی زیاد و درنتیجه تخلخل فراوان در سطح شبکه بسپاری است (شکل ۵). هم‌چنین، تأثیر مواد افزودنی کیتوسان، کیتوسان مولکولی، و نانوکیتوسان بر خصوصیات مکانیکی و آبگریزی و نفوذپذیری نسبت به هوا در ورقه‌های کاغذی بررسی شد. کیتوسان مولکولی با حل کردن کیتوسان در اسید استیک ۱ درصد، و نانوکیتوسان با روش تخریب گرمازدایی[2] به‌دست آمد. مشخص شد که کیتوسان ویژگی مکانیکی ورقه‌های کاغذی را بهبود می‌دهد. کیتوسان مولکولی، شاخص کشش در حالت‌های خشک و مرطوب با افزایش دوز کیتوسان تا ۲/۵-۰/۳ درصد افزایش می‌یابد و سپس ثابت می‌ماند. واقعیت این است که کیتوسان با همی سلولز و سلولز، پیوندهای یونی و ترکیبات پلی‌الکترولیت تشکیل می‌دهد. در مقدار ۲/۵-۰/۳ درصد، همه پیوندهای یونی ممکن از قبل تشکیل شده‌اند و بعدا کیتوسان می‌تواند فقط با گروه‌های آمین و سلولز پیوندهای هیدروژن ایجاد کند. در مورد نانوکیتوسان، نانوذرات شکاف‌های ریز میکروسکوپی را در ساختار متخلخل کاغذ پر کرده و پیوندهای دیگری ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، افزودنی‌های کیتوسان باعث بهبود ویژگی آبگریزی (کاهش جذب آب، و افزایش زمان خیس شدن) و نفوذپذیری هوای ورقه‌های کاغذی می‌شوند [۳۰].

۴-۲- فیلم‌های فعال و ویژگی ضدمیکروبی نانوکیتوسان

به‌منظور کاهش رشد میکروبی و خطر بیماری‌های ناشی از غذا و مهار فساد میکروبی محصولات غذایی فاسدشدنی و در نتیجه بالا بردن سطح ایمنی و زمان ماندگاری مادهغذایی، فیلم‌های فعال حاوی مواد ضدمیکروبی در بسته‌بندی صنایع غذایی توسعه زیادی پیداکرده است [۳۳-۳۱ و ۲۷]. عوامل ضدمیکروبی به سه دسته عوامل شیمیایی، طبیعی و پروبیوتیک‌ها تقسیم می‌شوند که عوامل ضدمیکروبی طبیعی با توجه به تقاضای مصرف‌کننده برای موادغذایی عاری از نگه‌دارنده‌های شیمیایی، بیش‌تر مورد توجه هستند. نانوذرات کیتوسان علاوه بر این که ویژگی مکانیکی و فیزیکی را ارتقاء می‌بخشند، دارای ویژگی ضد میکروبی بی‌نظیری هستند که این موضوع در بسته‌بندی‌های ضدمیکروبی بسیار حایز اهمیت است.

برای مثال، Yien Ing و همکارانشش [۳۴]، ویژگی ضدقارچی نانوکیتوسان علیه قارچ‌های *آلترناریا آلترناتا*، *آسپرژیلوس نایجر*، *رایزوپوس استولونیفر* و ویژگی ضدباکتریایی آن علیه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *اشریشیا کلی* را اثبات کردند. ویژگی ضدقارچی این ماده زیستی به عوامل متفاوتی از جمله غلظت، وزن مولکولی، درجه استخلاف و نوع گروه‌های عاملی که به کیتوسان متصل می‌شود و همچنین، به نوع قارچ، بستگی دارد. هم‌چنین ویژگی ضدباکتریایی نانوذرات کیتوسان علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* توسط Shi و همکارانش [۳۵] ثابت شد. در ارزیابی ویژگی ضدمیکروبی نانوکیتوسان، وزن مولکولی بسیار حایز اهمیت است، هرچه وزن مولکولی نانوذرات کیتوسان پایین‌تر باشد، ویژگی ضدمیکروبی بیش‌تری را از خود نشان می‌دهند. Paz و همکارانش [۳۶] نیز با ارزیابی ویژگی بازدارندگی نانوذرات کیتوسان بر استرپتوکوکوس موتانس به این نتیجه رسیدند که نانوکمپلکس‌های تهیه شده با نانوکیتوسان دارای وزن مولکولی بالا، کم‌ترین ویژگی ضدمیکروبی را دارند و فقط به ۲۵-۲۰درصد از سلول‌های میکروارگانیسم آسیب می‌زنند ولی نانوذراتی با وزن مولکولی پایین، بیش از ۹۵ درصد میکروارگانیسم‌ها را از بین می‌برند. علاوه بر تاثیر وزن مولکولی نانوکیتوسان بر ویژگی ضدمیکروبی آن، شبکه بسپاری در برگیرنده‌ی نانوذره نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند. برای نمونه، در مطالعه‌ای توسط Martelli و همکارانش [۲۱]، با افزودن ۰/۲ درصد وزنی نانوکیتوسان به فیلم تهیه شده از پوره موز، اثر

[1] Water vapor permeability
[2] Thermocatalytic destruction method

ضدمیکروبی محسوسی در مقایسه با نمونه‌های شاهد روی دو باکتری گرم مثبت و گرم منفی اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد که علت این امر، غلظت کم نانوذرات استفاده شده و در نتیجه کاهش تماس فیزیکی بین سلول‌های باکتری و زنجیره‌های بسپار است. پوره موز، یکی از ترکیبات عمده فیلم که حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات مغذی است احتمالا موجب افزایش رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شود. هم‌چنین، ویژگی ضدمیکروبی فیلم نانوکیتوسان/آلژینات سدیم/سلولز میکروکریستالی (مستخرج از الیاف موز) به‌ترتیب به‌نسبت ۴، ۱۶، و ۱ در برابر *Bascillus subtilis* و *E. coli* بررسی شد. ابتدا خصوصیات فیلم با دستگاه‌های پیشرفته‌ای مانند FT-IR، XRD، TGA، DSC و SEM مطالعه شد. نتایج حاصل از مطالعات FT-IR به‌وضوح نشان داد که نانوکیتوسان به‌طور موثری با آلژینات سدیم و سلولز میکروکریستالی در تشکیل فیلم، اتصال برقرار کرده است. تغییر در تبلور و افزایش رفتار حرارتی به‌ترتیب از روش XRD و TGA مشخص شد. نتایج SEM نیز نشان داد که فیلم حاصل دارای ریخت‌شناسی سطحی زبر و ساختار شکنندگی بهبود یافته‌ای است. عمل ضد باکتریایی فیلم با استفاده از محیط‌کشت مولر هینتون‌آگار[1] روی دو گونه میکروبی *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* مشخص کرد که فیلم حاصل از قابلیت بیشتری برای کشتن میکروارگانیسم‌ها برخوردار است [۳۷]. در بررسی، محلول ۲ درصد حجمی/وزنی کیتوسان، و محلول ۲ درصد حجمی/وزنی نانوذرات کیتوسان آمیخته با ۲ درصد تری‌پلی‌فسفات سدیم به‌عنوان مواد پوشش‌دهنده فیله‌های ماهی *Cynoglossus arel* استفاده و در شرایط خیلی سرد نگهداری شدند. نتایج نشان داد که پوشش‌های کیتوسان و نانوکیتوسان به‌طور معنی‌داری در شمارش کل مزوفیل‌ها، باکتری‌های سرمادوست، و اینتروباکترها مؤثر بودند. تولید بازهای ازته فرار (TVBN [2]) و تری‌متیل‌آمین برای نمونه‌های دارای کیتوسان و نانوکیتوسان به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از نمونه‌های شاهد در طول نگهداری بود. اسید تیوباربیتوریک و اسیدهای چرب آزاد روند افزایشی نشان دادند در حالی که افزایش سولفیدریل کل با افزایش زمان نگهداری ($p < ۰/۰۵$) کاهش یافت. بنابراین، کیتوسان و نانوکیتوسان برای حفظ خصوصیات کیفی نمونه‌های ماهی قابل استفاده هستند. نانوکیتوسان در کاهش اکسیداسیون چربی فیله‌ها و آلودگی باکتریایی نسبت به نمونه‌های کیتوسان بهتر بود [۳۸].

۵- نتیجه‌گیری

بسپارها به دو دسته طبیعی ومصنوعی تقسیم می‌شوند. امروزه، بازگشت به طبیعت و تمایل به استفاده از مواد نوین مبتنی بر طبیعت، علاقه عموم جامعه و مصرف کنندگان است. کیتوسان، یکی از بسپارهای طبیعی است که کاربردهاي زیادي در دارورسانی، صنایع غذایی، صنایع بسته‌بندی و غیره دارد. کیتوسان، ماهیت پلی‌ساکاریدی داشته و نانوذره آن به‌عنوان پرکننده، اتصالات عرضی فیزیکی بین شبکه بسپاری ایجاد کرده و منجر به هم‌پوشانی بهتر مواد در شبکه و در نتیجه بهبود و افزایش ویژگی ماده جدید می‌شود. نانوذرات کیتوسان که به روش‌های متفاوت تولید می‌شوند، به‌عنوان ماده اولیه بسته‌بندی به‌شکل فیلم یا پوشش در بسته‌بندی موادغذایی کاربرد دارند. این مواد، وقتی به مقدار بهینه در ساختار چندسازه‌ها استفاده شوند، مزایای زیادی دارند از جمله مقاومت کششی فیلم حاصل را افزایش می‌دهند. نفوذپذیری پوشش یا فیلم بسته‌بندی به رطوبت و گازها را به‌دلیل ایجاد مسیرهای زیگزاگی طولانی و در نتیجه طولانی کردن مسیر ورود ذرات رطوبت و مولکول‌های گازی شکل، کم می‌کنند. ویژگی ضدمیکروبی قابل توجه نانوکیتوسان به مقدار و غلظت آن، وزن مولکولی، درجه استخلاف و غیره بستگی دارد که وزن مولکولی مهم‌ترین آن‌هاست. با کاهش وزن مولکولی تعداد میکروارگانیسم‌های بیش‌تری غیرفعال می‌شوند.

۶- منابع

[1] B. Tajeddin, Preparation and Characterization of Natural Nanocomposites for Food Packaging Applications, donyayenano, 10 (37), 38-45, (2014).

[2] Y. Radhakrishnan, G. Gopal, C.C. Lakshmanan, and K.S. Nandakumar, Chitosan Nanoparticles for Generating Novel Systems for Better Applications: a review, Journal of Molecular and Genetic Medicine, S4: 005, (2015).

[3] M.A. Del Nobile, A. Conte, G.C. Buonocore, A.L. Incoronato, A. Massaro, and O. Panza, Active Packaging by Extrusion Processing of Recyclable and Biodegradable Polymers, Journal of Food Engineering, 93, 1–6, (2008).

[4] M.A. Mohammed, J.T.M. Syeda, K.M. Wasan, and E.K. Wasan, An Overview of Chitosan Nanoparticles and its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. Pharmaceutics, 9(4), 53, (2017).

[5] S. Naskar, S. Sharma, K. Kuotsu, Chitosan-Based Nanoparticles: an Overview of Biomedical Applications

[1] Muller Hinton Agar medium
[2] Total volatile bases nitrogen

Trends in Technology and Science, 3(2), 73-79, (2014).
[14] G.R. Strobl, The Physics of Polymers, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, ISBN 978-3-540-25278-8, (2007).
[15] S.Y. Park, S.T. Jun, and K.S. Marsh, Physical Properties of PVOH/Chitosan-Blended Films Cast from Different Solvents. Food Hydrocolloids, 15, 499-502, (2001).
[16] J.H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, and I.C. Kwon, Targeted Delivery of Low Molecular Drugs Using Chitosan and its Derivatives. Advanced Drug Delivery Reviews, 62(1), 28–41, (2010).
[17] U. Garg, S. Chauhan, U. Nagaich, and N. Jain, Current Advances in Chitosan Nanoparticles Based Drug Delivery and Targeting, Advanced Pharmaceutical Bulletin, 9(2), 195-204, (2019).
[18] S. Kumar, F. Ye, S. Dobretsov, and J. Dutta, Chitosan Nanocomposite Coatings for Food, Paints, and Water Treatment Applications, Applied Science, 9, 2409, (2019).
[19] S.A. Agnihotri, and T.M. Aminabhavi, Chitosan Nanoparticles for Prolonged Delivery of Timolol Maleate. Drug Develop Ind Pharm, 33, 1254-1262, (2007).
[20] A. Grenha, Chitosan Nanoparticles: a Survey of Preparation Methods, Journal of Drug Targeting, 20(4), 291-300, (2012).
[21] M. Martelli, T. Barros, M. Moura, L. Mattoso, and O. Assis, Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films, Journal of Food Science, 78, 98-104, (2012).
[22] Y. Ohya, M. Shiratani, H. Kobayashi, and T. Ouchi, Release Behaviour of 5-Fluorouracil from Chitosan-gel Nanospheres Immobilizing 5-Fluorouracil Coated with Polysaccharides and their Cell Specific and its Preparation, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 49, 66-81, (2019).
[6] S.M. Asiri, F. Alam Khan, and A. Bozkurt, Synthesis of Chitosan Nanoparticles, Chitosan-Bulk, Chitosan Nanoparticles Conjugated with Glutaraldehyde with Strong Anti-Cancer Proliferative Capabilities, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 46(53), S1152-S1161, (2018).
[7] T.A., Ahmed, and B.M. Aljaeid, Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery. Drug Design, Development and Therapy, 10, 483-507, (2016).
[8] K. Divya, and M.S. Jisha, Chitosan Nanoparticles Preparation and Applications, Environmental Chemistry Letters, 16, 101-112, (2018).
[9] L-M. Zhao, L-E. Shi, Z-L., Zhang, J-M. Chen, D-D. Shi, J. Yang, and Z-X. Tang, Preparation and Application of Chitosan Nanoparticles and Nanofibers, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 28(3), 353-362, (2011).
[10] P.K. Dutta, S. Tripathi, G.K. Mehrotra, and J. Dutta, Perspectives for Chitosan Based Antimicrobial Films in Food Applications, Food Chemistry, 114(4), 1173-1182, (2009).
[11] M.V. Ravi Kumar, A Review of Chitin and Chitosan Applications, Reactive & Functional Polymers, 46, 1-27, (2001).
[12] T.A. Sonia, and C.P. Sharma, Chitosan and its Derivatives for Drug Delivery Perspective, Advances in Polymer Science, 243, 23-54, (2011).
[13] A.N. Malathi, K.S. Santhosh, and N. Udaykumar, Recent Trends of Biodegradable Polymer: Biodegradable Films for Food Packaging and Application of Nanotechnology in Biodegradable Food Packaging, Current

[30] L. Vikele, M. Laka, I. Sable, L. Rozenberga, U. Grinfelds, J. Zoldners, R. Passas, and E. Mauret, Effect of Chitosan on Properties of Paper for Packaging, Cellulose Chemistry and Technology, 51(1-2), 67-73, (2017).
[31] M.S. Brewer, Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Food Science and Food Safety, 10, 221-247, (2011).
[32] V. Siracusa, P. Rocculi, S. Romani, and R. Marco Dalla, Biodegradable Polymers for Food Packaging, Trends in Food Science & Technology, 19, 634-643, (2008).
[33] K. Vu, R.G. Hollingsworth, E. Leroux, S. Salmieri, and M. Lacroix, Development of Edible Bioactive Coating Based on Modified Chitosan for Increasing the Shelf Life of Strawberries, Food Research International, 44, 198–203, (2010).
[34] L. Yien Ing, N. Zin, A. Sarwar, and H. Katas, Antifungal Activity of Chitosan Nanoparticles and Correlation with their Physical Properties. International Journal of Biomaterials, 632698, 1-9, (2012).
[35] Z. Shi, K.G. Neoh, E.T. Kang, and W. Wang, Antibacterial and Mechanical Properties of Bone Cement Impregnated with Chitosan Nanoparticles, Biomaterials, 11, 2440-2449, (2006).
[36] L. Paz, A. Reain, K. Howard, D. Sutherland, and L. Wejse, Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on Streptococcus Mutans Biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 77, 3892-3895, (2011).
[37] K. Vijayalakshmi, B.M. Devi, P.N. Sudha, J. Venkatesan, and S. Anil, Synthesis, Characterization and Applications of Nanochitosan/Sodium Alginate/Microcrystalline Cellulose Film, Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 7(6), 1-11, (2016).
Cytotoxicity. Pure and Applied Chemistry, A31, 629-642, (1994).
[23] S.M. Asghari, S. Ebrahimi Samani, Z. Seraj, K. Khajeh, and S. Hosseinkhani, Optimizing the Synthesis of Chitosan Nanoparticles, Modares Journal of Biotechnology, 4(2), 21-29, (2013).
[24] K.S. Sudheesh, K. Ajay, A. Omotayo, and B. Bhekie, Chitosan-Based Nanomaterials: A State- of- the-Art Review, International Journal of Biological Macromolecules, pp. 46-58, (2013).
[25] E. Rochima, S.Y. Azhary, R.I. Pratama, C. Panatarani, and I.M. Joni, Preparation and Characterization of Nano Chitosan from Crab Shell Waste by Beads-Milling Method, International Conference on Food Science and Engineering, IOP Publishing, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineerin, doi:10.1088/1757-899X/193/1/012043, (2017).
[26] R. Chang, R. Jian, J. Yu, and X. Ma, Fabrication and Characterisation of Chitosan Nanoparticles/ Plasticised-Starch Composites, Journal of Food Chemistry, 120, 736–74, (2009).
[27]S. Kumar, A. Mukherjee, and J. Dutta, Chitosan Based Nanocomposite Films and Coatings: Emerging Antimicrobial Food Packaging Alternatives, Trends in Food Science & Technology, 97, 196-209, (2020).
[28] T.M.P. Ngo, T.H., Nguyen, T.M.Q. Dang, T.X. Tran, and P. Rachtanapun, Characteristics and Antimicrobial Properties of Active Edible Films Based on Pectin and Nanochitosan. International Journal of Molecular Sciences, 21, 2224, (2020).
[29] T.V. Duncan, Applications of Nanotechnology in Food Packaging and Food Safety: Barrier materials, Antimicrobials and Sensors, Journal of Colloid and Interface Science, 363, 1-24, (2011).

[38] R.S. Ghorabi, and A. Khodanazary, Effects of Chitosan and Nano-Chitosan as Coating Materials on the Quality Properties of Large Scale Tongue Sole *Cynoglossus arel* During Super-Chilling Storage, Iranian Journal of Fisheries Sciences, DOI: 10.22092/ijfs.2018.119689, (2017).