J. Adv. Mater. Eng., 2025;44(4)1-14. https://doi.org/10.47176/jame.44.4.1107

Journal of ADVANCED MATERIALS IN ENGINEERING

Journal of Advanced Materials in Engineering

Journal homepage: https://jame.iut.ac.ir/?lang=en

ISSN: 2251-600X EISSN: 2423-5733

Research Article

The Effect of Lignin Concentration on the Morphology and Structure of Silk Fibroin Nanofibers

Amirhosein Mohammadifard[1*], Mahshid Kharaziha[1] and Masoud Atapour[1]

Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran
* Corresponding author, Email: a.mohammadifard@ma.iut.ac.ir

(Received: 25 January 2025; Revised: 11 March 2025; Accepted: 12 March 2025; Available online: 30 July 2025)

ABSTRACT

Introduction and Objectives: With the rapid advancement of nanotechnology and the enhanced properties of materials at the nanoscale, electrospinning has emerged as a promising technique for restoring the functionality of damaged tissues due to its porous structure, which facilitates oxygen and gas permeability. This study aims to investigate the effect of lignin concentration on the morphology and structure of silk fibroin nanofibers to achieve uniform fibers suitable for biomedical applications.

Materials and Methods: Silk fibroin was first extracted from silkworm cocoons and blended with lignin at ratios ranging from 5:1 to 7:1. Nanofibers were then fabricated using electrospinning at three voltage levels: 20, 25, and 30 kV. To assess the successful extraction of fibroin and the fabrication of fibers, various characterization techniques were employed. Initially, scanning electron microscopy was used to analyze the morphological characteristics, followed by contact angle measurements.

Results: The findings indicated that both pure silk fibroin fibers and silk fibroin-lignin composite fibers fabricated at 20 kV with lignin ratios of 5:1, 6:1, and 7:1 exhibited uniform structures, with average diameters of 241.44 ± 37 nm, 309.10 ± 11 nm, 164.05 ± 74 nm, and 181.38 ± 58 nm, respectively. Moreover, contact angle analysis revealed that the water contact angle of pure silk fibroin (49 ± 5°) increased to 63 ± 4°, 66 ± 2°, and 71 ± 6° for composite fibers with lignin ratios of 5:1, 6:1, and 7:1, respectively.

Conclusion: Given that the contact angle values fall within the range of 55–75° and the nanofibers exhibit a uniform structure, silk fibroin-lignin composite nanofibers provide a favorable surface for cell adhesion and proliferation, making them promising candidates for biomedical applications.

Keywords: Electrospinning, Silk fibroin, Lignin, Morphology, Wettability.

How to Cite: Mohammadifard A, Kharaziha M, Atapour M. The effect of lignin concentration on the morphology and structure of silk fibroin nanofibers. J Adv Mater Eng. 2025;44(4):1–14. https://doi.org/10.47176/jame.44.4.1107

Copyright © 2025 Isfahan University of Technology, Published by IUT press.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مواد پیشرفته در مهندسی ۱۴۰۴؛(۴)۴۴:۱۴-۱. https://doi.org/10.47176/jame.44.4.1107

مواد پیشرفته در مهندسی

صفحه خانگی فصلنامه: https://jame.iut.ac.ir/

شاپا: ۲۲۵۱-۶۰۰X شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۵۷۳۳

مقاله پژوهشی

تأثیر غلظت لیگنین بر مورفولوژی و ساختار نانو الیاف فیبروئین ابریشم

امیرحسین محمدی‌فرد*، مهشید خرازیها و مسعود عطاپور

دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱، ایران

* **نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: a.mohammadifard@ma.iut.ac.ir**

(دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۶، بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱، پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲، انتشار: ۱۴۰۴/۵/۸)

چکیده

مقدمه و اهداف: با توجه به گسترش روزافزون فناوری نانو و خواص بهبودیافته مواد در مقیاس نانو، الکتروریسی به علت ساختار متخلخل با قابلیت عبور اکسیژن و گاز، روشی امیدوارکننده برای بازگرداندن عملکرد بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشد. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر غلظت لیگنین بر مورفولوژی و ساختار نانوالیاف فیبروئین ابریشم به منظور دستیابی به الیاف یکنواخت، جهت کاربردهای زیست‌پزشکی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا فیبروئین ابریشم از پیله‌های کرم ابریشم استخراج و با افزودن لیگنین با نسبت‌های ۵:۱ تا ۷:۱ تهیه و با الکتروریسی در سه ولتاژ ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوولت، نانوالیاف ساخته شد. برای ارزیابی موفقیت استخراج فیبروئین و تولید الیاف، مشخصه‌یابی آن‌ها با روش‌های مختلف انجام شد. ابتدا، مورفولوژی با میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد و سپس زاویه تماس ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که الیاف فیبروئین ابریشم خالص و کامپوزیت فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های ۵:۱، ۶:۱ و ۷:۱، در ولتاژ ۲۰ کیلوولت، یکنواخت بوده و به ترتیب دارای قطری برابر با ۳۷ ± ۲۴۱/۴۴، ۱۱ ± ۳۰۹/۱۰، ۷۴ ± ۱۶۴/۰۵ و ۵۸ ± ۱۸۱/۳۸ نانومتر است. ارزیابی زاویه تماس نشان داد که زاویه تماس با آب در فیبروئین ابریشم خالص (°۵±۴۹) در کامپوزیت‌های ساخته‌شده با نسبت‌های ۵:۱، ۶:۱ و ۷:۱ به ترتیب به °۴±۶۳، °۶±۶۶ و °۶±۷۱ افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به قرارگیری زاویه تماس در محدوده ۵۵ تا ۷۵ درجه و تشکیل نانوالیاف یکنواخت، نانوالیاف کامپوزیتی فیبروئین ابریشم-لیگنین بستر مناسبی برای رشد و تکثیر سلولی فراهم کرده و پتانسیل استفاده در کاربردهای زیستی را دارد.

واژه‌های کلیدی: الکتروریسی، فیبروئین ابریشم، لیگنین، مورفولوژی، ترشوندگی.

حق انتشار این مستند، متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است. ۱۴۰۴ ©.

این مقاله تحت گواهی زیر منتشر شده و هر نوع استفاده غیرتجاری از آن مشروط بر استناد صحیح به مقاله و با رعایت شرایط مندرج در آدرس زیر مجاز است:

Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

۱- مقدمه

برای ساخت نانوالیاف، روش‌های مختلفی از جمله خودآرایی، کشش، تولید از قالب، جدایش فازی و الکتروریسی وجود دارد. به علت سادگی فرایند، کم‌هزینه و تکرارپذیربودن، الکتروریسی نسبت به سایر روش‌ها، یکی از متداول‌ترین روش‌های تهیه نانوالیاف می‌باشد (۱). این روش، برای ساخت الیاف با قطر چندصد نانومتر تا چند میکرومتر، به‌طور گسترده استفاده می‌شود. با توجه به شباهت زیاد الیاف الکتروریسی‌شده به ماتریکس خارج سلولی، این روش توسط بسیاری از محققان، به‌عنوان روشی امیدوارکننده برای بازگرداندن عملکرد بافت‌های آسیب‌دیده موردتوجه قرار گرفته است. علاوه‌براین، نانوالیاف با قطر مشابه با ماتریکس خارج سلولی، چسبندگی و تکثیر سلولی را تسریع می‌کنند. همچنین، نانوالیاف می‌توانند عبور هر ماده‌ای را که می‌تواند باعث عفونت باکتریایی یا میکروبی شود را کنترل کرده و با ساختار متخلخل خود امکان انتقال اکسیژن مورد نیاز را فراهم کند. گزارش شده است که نانوالیاف ساخته‌شده توسط الکتروریسی، سطح بالاتری از تخلخل، نفوذ گاز و سطح ویژه را نشان می‌دهد (۲).

در دهه‌های اخیر، پلی ساکاریدهای طبیعی مانند کیتوسان، آلژینات و سلولز و پروتئین‌ها مانند فیبروئین ابریشم[1]، کلاژن و ژلاتین، مرکز توجه تحقیقات در مهندسی پزشکی بوده‌اند و به دلیل منابع غنی، زیست‌سازگاری و عملکرد زیستی مطلوب، به‌طور گسترده در مهندسی بافت استخوان، ترمیم زخم و دارورسانی استفاده می‌شوند. نکته مهم این است که آن‌ها می‌توانند ماتریکس خارج سلولی را از نظر ساختار، اجزا و اثرات بیولوژیکی تقلید کنند (۳). ابریشم عمدتا از دو نوع پروتئین تشکیل شده است: پروتئین نامحلول درونی که فیبروئین نامیده می‌شود و پروتئین آبدوست خارجی به نام سریسین. فیبروئین، جزء اصلی ابریشم است و معمولا حدود ۷۵ درصد آن را تشکیل می‌دهد (۴). فیبروئین ابریشم، به عنوان یکی از قدیمی‌ترین پلیمرهای طبیعی، با توجه به برخورداری از زیست‌سازگاری مناسب، کم‌ترین پاسخ التهابی به بافت میزبان، سرعت تجزیه زیستی آهسته در مقایسه با سایر مواد، سهولت در استفاده و دردسترس‌بودن، در دهه‌های اخیر توجه زیادی را در کاربردهای مختلف زیست‌پزشکی به خود جلب کرده است (۵). باوجود ویژگی‌های بسیار مناسب ابریشم، به دلیل عدم خاصیت ضدمیکروبی، پایداری چسبندگی نامناسب، برهمکنش‌های سلولی نامطلوب و حلالیت کم، توسعه آن به‌تنهایی امکان‌پذیر نیست (۶).

لیگنین[2]، یک پلیمر فنولی و آمورف با ساختاری پیچیده است که بعد از سلولز، دومین پلیمر طبیعی در طبیعت می‌باشد و از دیواره سلولی گیاهان و بافت‌های چوب بدست می‌آید (۷). لیگنین به عنوان ماده اولیه، در اشکال مختلف از جمله نانوذرات، نانوکپسول‌ها، نانوالیاف، ائروژل‌ها و هیدروژل‌ها استفاده می‌شود. علت این کاربرد گسترده، خواص و مزایای قابل توجه لیگنین، از جمله خاصیت آنتی اکسیدان، ضد قارچ، ضد میکروب، تخریب پذیری، خاصیت آبگریزی، خواص رئولوژی مناسب، خواص ویسکوالاستیک مطلوب، غیرسمی‌بودن و سازگاری با طیف وسیعی از مواد شیمیایی صنعتی، ارزان و دردسترس‌بودن می‌باشد. همچنین، حضور گروه‌های واکنش‌پذیر مانند هیدروکسیل و سولفونیک، امکان اصلاح شیمیایی این ماده را فراهم کرده و زمینه تولید انرژی تجدیدپذیر و سایر محصولات صنعتی را مهیا می‌سازد (۸). با توجه به اینکه لیگنین، یک پلیمر با وزن مولکولی کم و شاخه‌دار است و نمی‌تواند بین زنجیره‌های پلیمری پیوند ایجاد کند، امکان الکتروریسی محلول لیگنین خالص وجود ندارد. درنتیجه ترکیب لیگنین با یک پلیمر دیگرجهت دستیابی به الاستیسیته کافی، برای فرایند الکتروریسی ضروری است. پلی اتیلن اکساید، پلیمری است که اغلب با لیگنین برای فرایند الکتروریسی ترکیب می‌شود. مقدار اندک پلی اتیلن اکساید با وزن مولکولی بالا، موجب ارتقا الاستیسیته محلول و افزایش قابلیت ریسندگی، بدون تغییر قابل توجهی در ویسکوزیته، خواهد شد. پلی اکریلونیتریل، پلیمر دیگری است که با لیگنین در این فرایند ترکیب می‌شود. ویسکوزیته و هدایت الکتریکی محلول لیگنین-پلی اکریلونیتریل، با افزایش غلظت لیگنین کاهش می‌یابد. کاهش

هدایت الکتریکی منجر به ایجاد دانه و افزایش قطر الیاف می‌شود و کاهش ویسکوزیته باعث کاهش قطر الیاف می‌گردد. کاهش ویسکوزیته و دشواری ریسیدن محلول، افزایش درصد لیگنین (بیش از ۵۰ درصد) در محلول لیگنین-پلی اکریلونتریل را محدود می‌کند (۹). در پژوهشی، لی و همکاران (۱۰)، داربست نانولیفی از نانولوله‌های کربنی چند جداره نازک- پلی ونیل الکل-لیگنین ساختند. نتایج به‌دست‌آمده از مشخصه‌یابی این الیاف، نشان داد که افزایش اثر ضدمیکروبی نانوالیاف به علت حضور لیگنین و نانولوله چندجداره نازک می‌باشد. ازآنجایی‌که تأثیر بلورینگی بر خواص مواد در مهندسی بافت از اهمیت بالایی برخوردار است و چسبندگی و تکثیر سلولی در پلیمرهای آمورف بیشتر است، در پژوهشی، سلامی و همکاران (۱۱)، غشا لیفی پلی کاپرولاکتون-لیگنین را توسعه دادند. نتایج نشان داد وجود لیگنین، منجر به کاهش بلورینگی پلی کاپرولاکتون در طول فرایند الکتروریسی می‌شود. اگر چه لیگنین خواص آنتی‌اکسیدان دارد، اما در سطوح بالاتر باعث سمیت سلولی می‌شود. نتایج آزمایشگاهی از سنجش آزمون سمیت سلولی، نشان داد که زیست‌سازگاری داربست نانوکامپوزیتی الکتروریسی شده، با افزایش درصد لیگنین بیشتر شده است.

بنابراین، با وجود ویژگی‌های منحصربه‌فرد فیبروئین ابریشم، استفاده مستقل از آن چندان توسعه نیافته است. در این پژوهش، تأثیر غلظت لیگنین بر مورفولوژی و ساختار غشایی فیبروئین ابریشم به‌منظور دستیابی به الیاف یکنواخت و بدون گره[3] برای کاربردهای زیستی ارزیابی شد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه

برای ساخت غشای لیفی، از پیله کرم ابریشم با کیفیت بالا (نوغان نطنز) استفاده شد. کربنات سدیم (شرکت مرک) و لیتیم برماید (شرکت سیگما)، به‌منظور استخراج فیبروئین ابریشم به کار رفتند. فرمیک اسید[4] با خلوص ۹۹ درصد به‌عنوان حلال و آب دیونیزه به‌عنوان حلال پیش‌ماده فیبروئین استفاده شدند. همچنین، لیگنوسولفونات[5] با وزن مولکولی ۸۶ کیلودالتون (شرکت سیگما)، برای تولید نانوالیاف به کار گرفته شد.

۲-۲- مراحل ساخت

استخراج فیبروئین از پیله ابریشم

فرایند استخراج فیبروئین از پیله ابریشم، با استفاده از روش ارائه شده توسط راکوود و همکاران (۱۲)، انجام شد. ابتدا پیله‌ها به دو قسمت تقسیم شدند و پس از شستشو، در آب دیونیزه در حال جوش حاوی ۰/۰۲ مولار کربنات سدیم، به مدت نیم ساعت جوشانده شدند. سپس، سه مرتبه با آب دیونیزه شستشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود کاملا خشک شدند. پیله‌های خشک شده در محلول ۹/۳ مولار لیتیم برماید ریخته شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار ساعت داخل آون قرار گرفت تا به خوبی حل شود. در ادامه، محلول به‌دست‌آمده، دو بار متوالی تحت سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه، قرار گرفت. پس از آن، محلول داخل کیسه دیالیز ریخته شد و به مدت ۷۲ ساعت داخل آب دیونیزه، تحت دیالیز قرار گرفت. قابل ذکر است که آب دیونیزه هر ۲۴ ساعت جهت خارج کردن یون‌ها و ناخالصی‌ها کاملا تعویض شد. در پایان، پس از خارج‌کردن کامل ناخالصی‌های به‌دست‌آمده، محلول فیبروئین ابریشم داخل فریزر قرار گرفت و پس از آن توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی، کاملا خشک و اسفنجی شد.

ساخت غشا لیفی فیبروئین ابریشم و لیگنین

برای ساخت محلول موردنیاز برای الکتروریسی، از فرمیک اسید (۹۹ درصد) استفاده شد. قبل از ساخت غشا لیفی نانوکامپوزیتی، غلظت بهینه فیبروئین ابریشم در فرمیک اسید، باتوجه به یکنواختی مورفولوژی و قطر الیاف طبق پژوهش عطریان و همکاران (۱۳)، ۱۷ درصد وزنی و غلظت بهینه لیگنین با آزمون و خطا اولیه، ارزیابی و مطابق با یافته‌های پژوهش سینترا و همکاران (۱۴)، ۲۲/۲ درصد وزنی انتخاب شد. در ادامه، برای تهیه محلول پلیمری با نسبت‌های فیبروئین ابریشم به لیگنین پنج

به یک (۵:۱) و هفت به یک (۷:۱)، فرمیک اسید به فیبروئین ابریشم خشک‌شده افزوده شد و به مدت سه ساعت در دمای اتاق روی همزن مغناطیسی همزده شد تا به‌طور کامل حل گردد. این فرآیند منجر به تشکیل محلول یکنواختی با رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ شد. به‌طور هم‌زمان و مشابه، اسید فرمیک به پودر لیگنین اضافه شد تا محلول یکنواخت قهوه‌ای تیره به‌دست آید. بعد از حل‌شدن کامل، این دو ماده مطابق با نسبت‌های مذکور ساخته و مجددا روی همزن مغناطیسی قرار گرفت تا محلول یکنواخت حاصل شود. سپس محلول‌های تهیه‌شده، به داخل سرنگ یک میلی‌لیتری با گیج ثابت ۲۳ تزریق شد و با تنظیم پارامترهای الکتروریسی شامل ولتاژهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوولت، فاصله سرسوزن تا جمع کننده ۱۲ سانتی‌متر و نرخ تغذیه ۵ میلی‌متر بر ساعت، الکتروریسی شدند.

۲-۳- آزمون‌های مشخصه‌یابی

بررسی مورفولوژی و ساختار الیاف

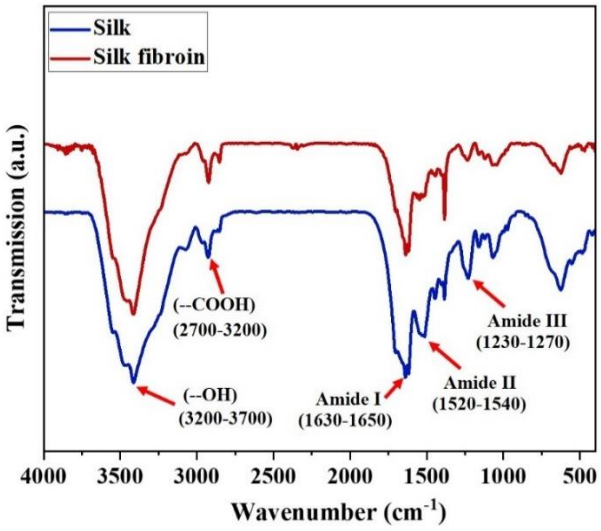
برای بررسی شکل و قطر الیاف، از میکروسکوپ الکترونی روبشی[۶] مدل Philips, XL30 استفاده شد. نمونه‌های الکتروریسی شده در ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر مربع برش و سپس با روکش طلا پوشش داده شدند.

شناسایی گروه‌های شیمیایی موجود در ساختار

آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[۷]، به‌منظور بررسی، شناسایی مواد و تعیین گروه‌های عاملی موجود، مورداستفاده قرار گرفت. آزمون مذکور با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی FTIR مدل Bomem, MB 100 ، در محدوده cm^{-1} ۴۰۰۰-۴۰۰، در دمای اتاق و تحت شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

ارزیابی فیزیکی

جهت ارزیابی میزان آب‌دوستی الیاف الکتروریسی‌شده، زاویه تماس با آب با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس تعیین شد. برای این منظور، سه نمونه از هر ترکیب انتخاب شد و با



شکل ۱- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه از پیله ابریشم و فیبروئین ابریشم استخراج‌شده.

استفاده از این دستگاه، قطره آب به میزان چهار میکرولیتر بر روی غشاها با حداقل سه‌مرتبه تکرار، انداخته و پس از پنج ثانیه از آن‌ها تصویربرداری شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه‌یابی فیبروئین استخراج شده از ابریشم

در ابتدا جهت اطمینان از جدایش کامل سریسین و استخراج فیبروئین، آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز انجام شد. در شکل (۱)، طیف مادون قرمز پیله ابریشم اولیه و فیبروئین استخراج شده نشان داده شده است.

ابتدا، شدت‌ها به یک شدت مشخص در هر طیف نرمال‌شده و سپس مورد مقایسه قرار گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تفاوت قابل‌توجهی در پیک‌های اصلی در دو طیف دیده نمی‌شود. بااین‌حال، تفاوت قابل‌توجهی در شدت پیک‌ها مشاهده شده است که نشان‌دهنده تغییر در ساختار دوم ابریشم (صفحات بتا[۸]) و یا تغییر در مقدار این صفحات است. آمید I از موقعیت cm^{-1} ۱۶۳۳[1]، به عدد موج cm^{-1} ۱۶۲۷ تغییرمکان داده است. همچنین آمید II، از موقعیت cm^{-1} ۱۵۱۷ به عدد موج cm^{-1} ۱۵۱۲ رسیده است و آمید III که مرتبط با پیوندهای C-N است از عدد موج

جدول ۱- اعداد موجی در طیف‌سنجی مادون قرمز در ابریشم اولیه و فیبروئین استخراج شده

گروه عاملی	عدد موجی در پیله ابریشم (cm^{-1})	عدد موجی در فیبروئین استخراج شده (cm^{-1})
آمید اول (پیوندهای کششی C=O)	۱۶۳۳	۱۶۲۷
آمید دوم (پیوندهای کششی C-H و خمشی N-H)	۱۵۱۷	۱۵۱۲
آمید سوم (C-N)	۱۲۳۸	۱۲۳۴
-OH	۳۴۲۰	۳۴۱۰
-COOH	۲۹۲۳	۲۹۳۳

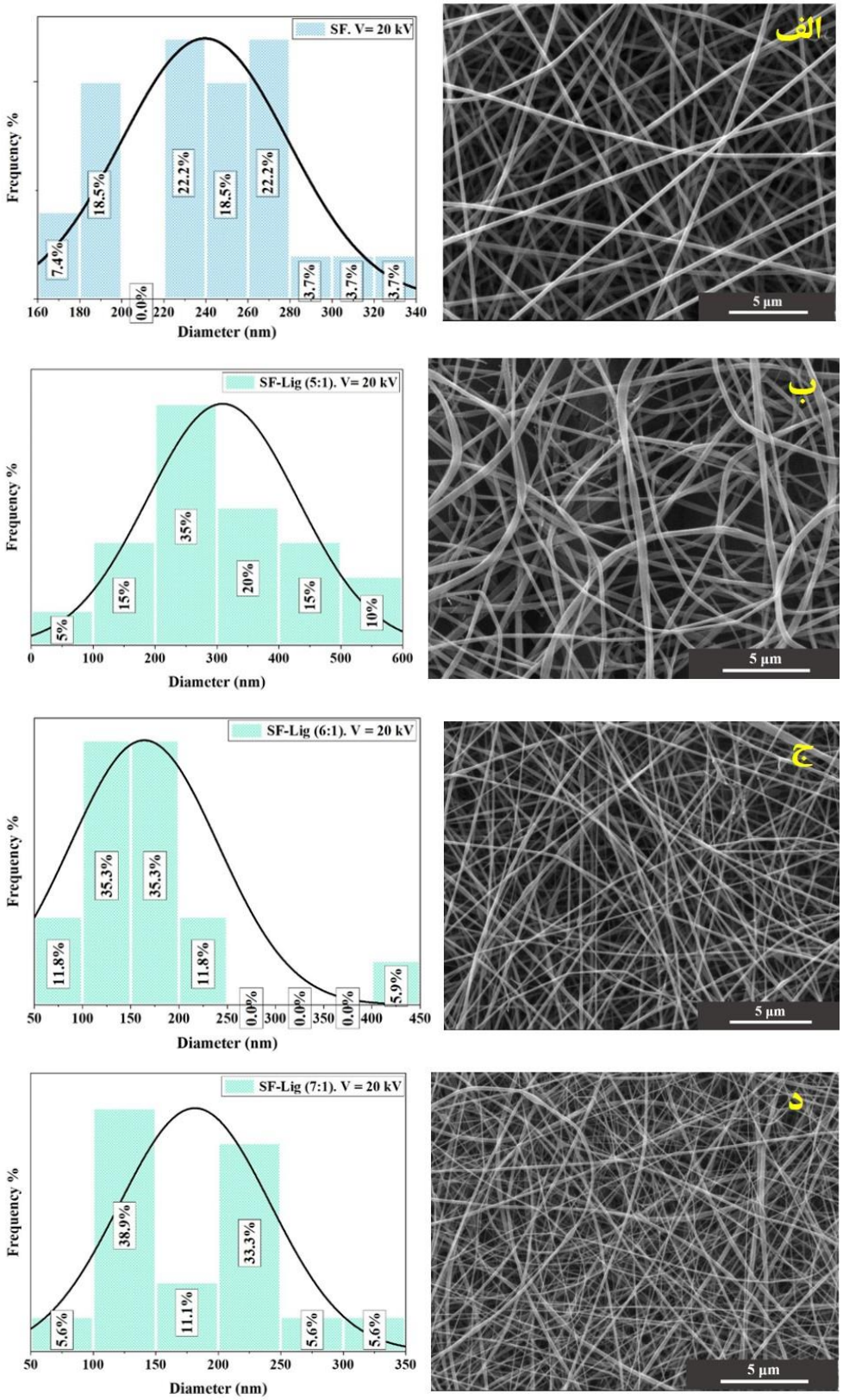
cm^{-1} ۱۲۳۸ به عدد موج cm^{-1} ۱۲۳۴ منتقل شده است (جدول ۱). علاوه‌براین، شدت پیک مربوط به آمید I که به صفحات کریستالی بتا (Silk II) در ساختار مربوط است، افزایش یافته است. این افزایش نشان‌دهنده جدا شدن سریسین از ساختار است. صفحات بتا در فیبروئین ابریشم، به‌عنوان عامل اصلی خواص مکانیکی و استحکام بالای ساختار شناخته می‌شوند. درواقع، این ساختار در مقایسه با ساختار آلفا[9] (Silk I)، قابلیت انحلال کمتری در آب دارد و از نظر خواص مکانیکی نیز قوی‌تر است (۱۵).

۳-۲- بررسی مورفولوژی و ساختار الیاف

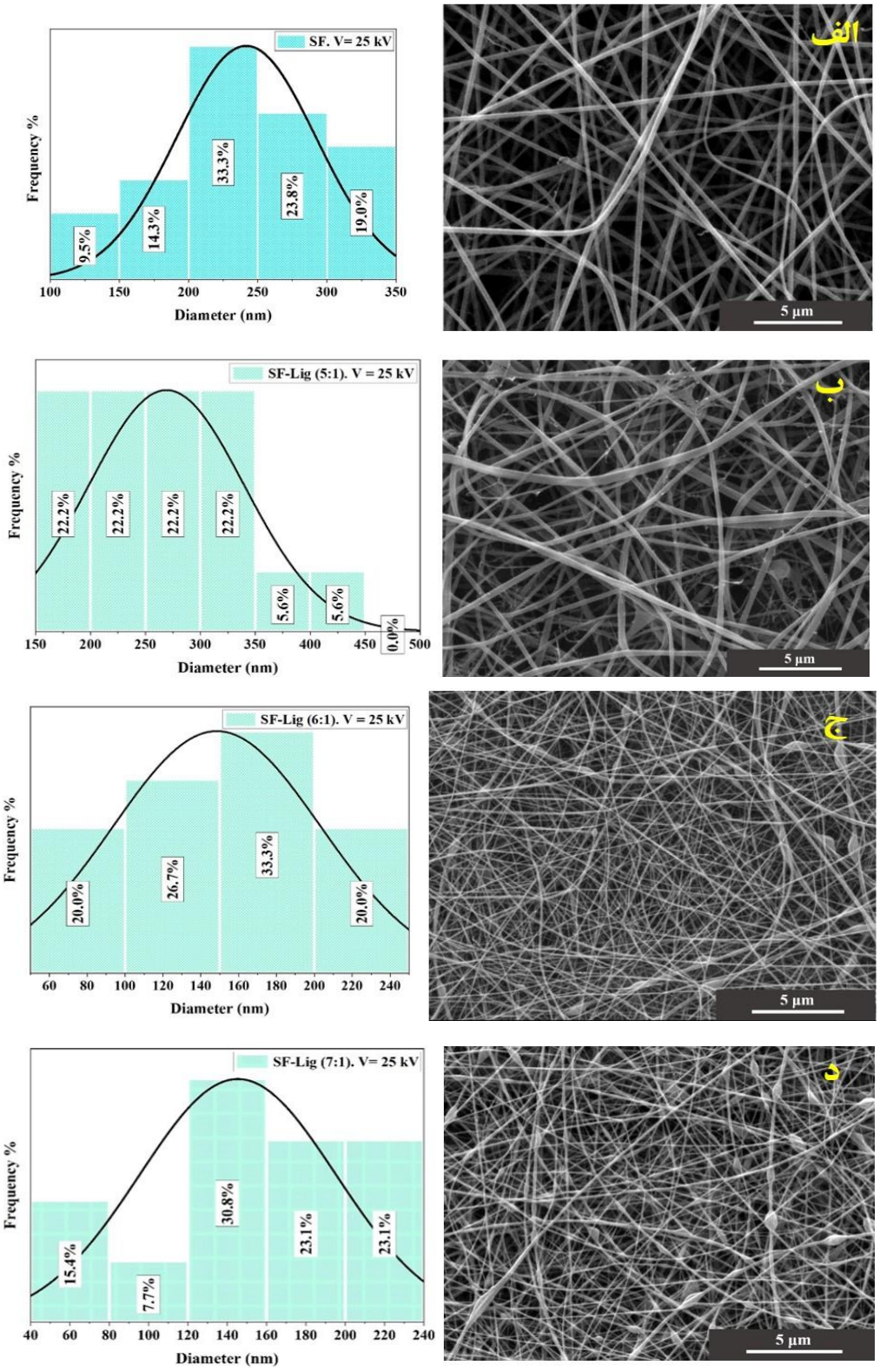
پس از تایید حذف سرسین از فیبروئین ابریشم، ابتدا ویژگی‌های ذاتی محلول فیبروئین ابریشم و فرآیند الکتروریسی بر مورفولوژی و قطر الیاف فیبروئین ابریشم مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. در فرآیند الکتروریسی، ویژگی‌های محلول و تبدیل آن به غشاهای لیفی تاثیر زیادی بر مورفولوژی و خواص الیاف دارد. انواع مختلفی از حلال‌ها مانند اسید استیک[10]، آب و هگزافلورایزوپروپانول[11] برای الکتروریسی فیبروئین ابریشم مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (۱۶-۱۸). حلال فرمیک اسید به علت نقطه جوش پایین (۱۰۰/۸۱ درجه سانتی‌گراد)، تبخیر سریع، هزینه کم، عدم سمیت، دسترسی آسان و توانایی ایجاد نظم کوتاه‌برد در پلیمرها، یکی از حلال‌های رایج است (۱۹)؛ بنابراین، در این مطالعه از این حلال استفاده شده است. یکی از پارامترهای مهم در ریسندگی محلول‌ها و دستیابی به مورفولوژی مطلوب، غلظت محلول پلیمری است. این غلظت بر ویسکوزیته و کشش سطحی محلول تأثیر می‌گذارد که هر دو از عوامل کلیدی در فرآیند الکتروریسی هستند. در محلول‌های با غلظت کم، به دلیل ویسکوزیته پایین، الیاف پلیمری پیش از رسیدن به جمع‌کننده شکسته شده و به قطرات تبدیل می‌شوند. از سوی دیگر، در محلول‌های با غلظت بالا، ویسکوزیته زیاد باعث می‌شود نیروهای ویسکوالاستیک وارد بر قطره، از کشیده-شدن آن توسط میدان الکتریکی خارجی جلوگیری کنند. البته ذکر این نکته حائز اهمیت است که مقدار جامد یک محلول، اثر مستقیمی بر ویسکوزیته دارد. زیرا غلظت‌های اولیه یکسانی از فیبروئین ابریشم و لیگنین در ابتدا برداشته نشده است؛ زمانی‌که با درصدهای مختلف باهم مخلوط شوند مقدار جامد محلول متفاوت خواهد بود؛ بنابراین، یک محدوده بهینه برای غلظت وجود دارد که در آن الیاف به شکلی مناسب و بدون عیب تشکیل می‌شوند (۲۰). براین اساس، باتوجه به مراجع و ارزیابی محدوده وسیعی از غلظت لیگنین، سه نسبت ۵:۱، ۶:۱ و ۷:۱ (وزنی/حجمی) انتخاب شد که تمامی محلول‌ها در محدوده بهینه با قابلیت ساخت الیاف بودند.

در شکل‌های (۲) تا (۴)، تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از الیاف فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های ۵:۱، ۶:۱ و ۷:۱ (وزنی/حجمی)، در ولتاژهای کاری ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوولت، نشان داده شده است.

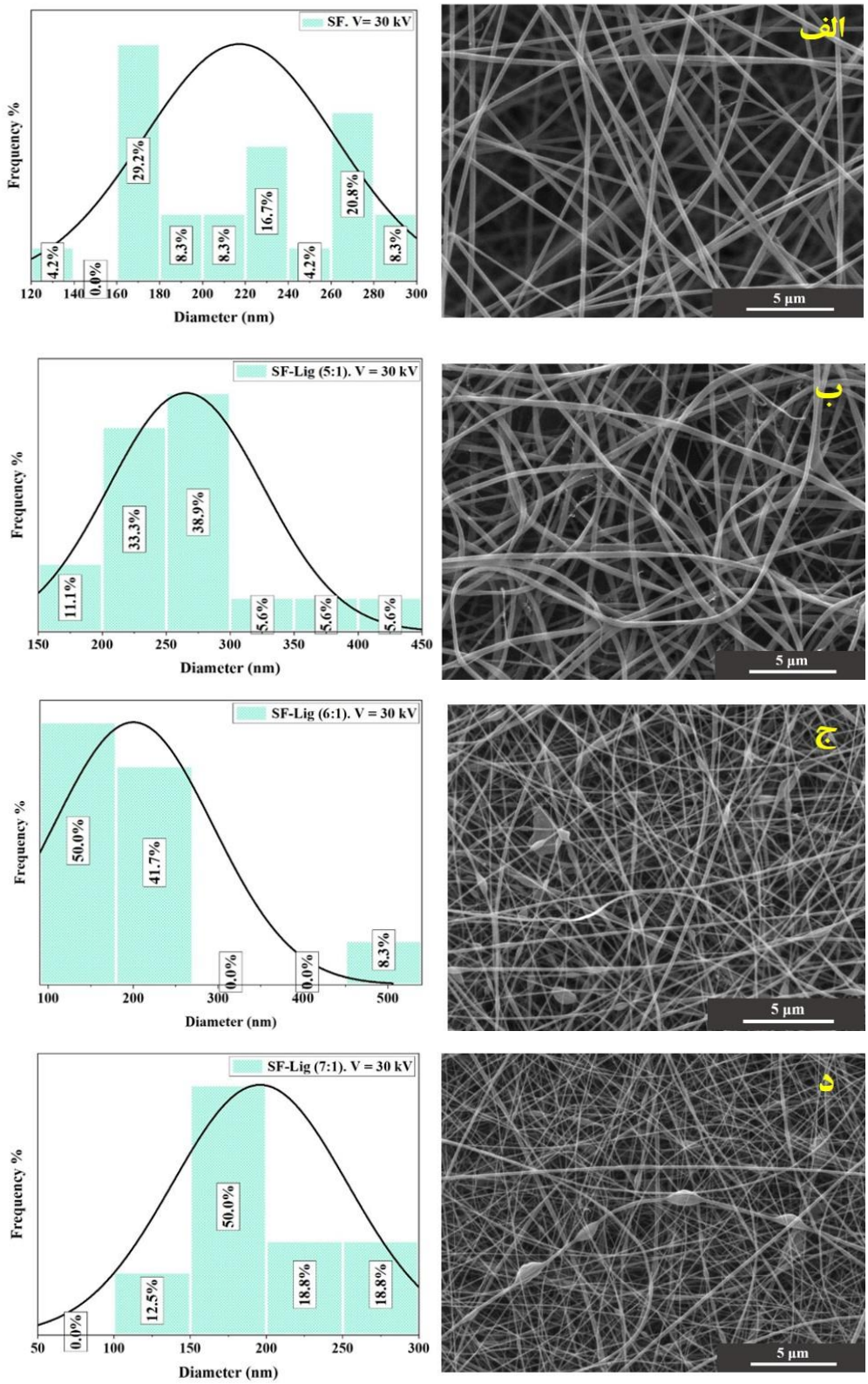
به‌طورکلی، ویسکوزیته پلیمر توسط وزن مولکولی، غلظت محلول، و به‌طور اساسی توسط ساختار زنجیره پلیمری کنترل می‌شود. برای یک وزن مولکولی معین، افزایش غلظت پلیمر



شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از (الف) فیبروئین ابریشم، (ب) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۵:۱، (ج) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۶:۱ و (د) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۷:۱ در ولتاژ کاری ۲۰ کیلوولت در بزرگنمایی ۴۰۰۰ برابر.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از (الف) فیبروئین ابریشم، (ب) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۵:۱، (ج) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۶:۱ و (د) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۷:۱ در ولتاژ کاری ۲۵ کیلوولت در بزرگنمایی ۴۰۰۰ برابر.



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپی الکترونی روبشی از (الف) فیبروئین ابریشم، (ب) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۵:۱، (ج) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۶:۱ و (د) فیبروئین ابریشم-لیگنین با نسبت ۷:۱ در ولتاژ کاری ۳۰ کیلوولت در بزرگنمایی ۴۰۰۰ برابر.

جدول ۲- اثر غلظت و ولتاژکاری بر مورفولوژی الیاف فیبروئین ابریشم

نسبت فیبروئین ابریشم به لیگنین (لیگنین:فیبروئین ابریشم)	ولتاژکاری (کیلوولت)	قطر متوسط الیاف (نانومتر)	گره
۱:۰	۲۰	۲۴۱/۴۴ ± ۳۷	ندارد
۱:۰	۲۵	۲۴۱/۷۱ ± ۴۹	ندارد
۱:۰	۳۰	۲۱۷/۲۹ ± ۴۳	ندارد
۵:۱	۲۰	۳۰۹/۱۰ ± ۱۱	ندارد
۵:۱	۲۵	۲۶۹/۱۶ ± ۶۸	ندارد
۵:۱	۳۰	۲۶۵/۵۰ ± ۵۸	ندارد
۶:۱	۲۰	۱۶۴/۰۵ ± ۷۴	ندارد
۶:۱	۲۵	۱۴۸/۴۶ ± ۵۲	دارد
۶:۱	۳۰	۲۰۰/۰۸ ± ۸۹	دارد
۷:۱	۲۰	۱۸۱/۳۸ ± ۵۸	ندارد
۷:۱	۲۵	۱۴۵/۳۸ ± ۴۷	دارد
۷:۱	۳۰	۱۹۵/۷۵ ± ۵۵	دارد

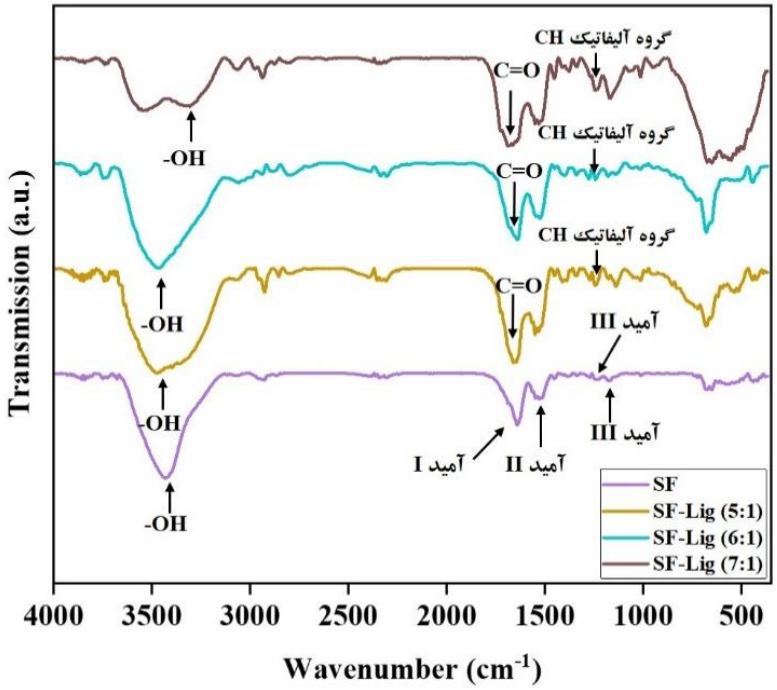
مورفولوژی غشاها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تغییرات شامل پدیده‌هایی مانند الکترواسپری (تشکیل تنها قطرات) در غلظت‌های خارج از محدوده بهینه، ایجاد گره یا الیاف گره‌دار، نانوالیاف و درنهایت الیاف کروی یا میکروگره می‌باشد. در مرحله آخر، به دلیل شدت بالای برهم‌کنش میان زنجیره‌های پلیمری، زنجیره‌ها نمی‌توانند در برخی نقاط به اندازه کافی لغزیده و به الیاف تبدیل شوند (۲۱).

در جدول (۲)، نتایج اندازه‌گیری قطر متوسط الیاف ساخته‌شده در نسبت‌های مختلف فیبروئین ابریشم-لیگنین و ولتاژکاری متفاوت ارائه شده است.

همان‌طورکه مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت لیگنین در تمامی ولتاژها، قطر الیاف افزایش یافته و یکنواختی الیاف کاهش یافته است. براین‌اساس، افزایش قطر در الیاف می‌تواند به‌علت افزایش ویسکوزیته محلول‌های پلیمری رخ داده باشد که این موضوع در مشاهدات چشمی محلول‌های آماده‌شده نیز مشخص بود. همچنین، در ولتاژ ۲۰ کیلوولت،در تمامی نسبت‌ها، الیاف به‌دست‌آمده از یکنواختی مناسبی برخوردار بوده و گره یا مورفولوژی دانه تسبیحی در آن‌ها مشاهده نشد.

۳-۳- شناسایی گروه‌های شیمیایی موجود در غشاهای لیفی

در شکل (۵)، نتایج آزمون طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای غشاهای فیبروئین ابریشم و غلظت‌های متفاوت لیگنین نشان داده شده است. پیک‌های شاخص هر ماده در شکل (۵)، با پیکان نشان‌گذاری شده‌اند. باتوجه به شکل مذکور در طیف مربوط به پلیمر فیبروئین ابریشم، پیک جذب مربوط به عدد موج cm^{-1} ۱۶۳۹ (آمید I)، cm^{-1} ۱۵۱۵ (آمید II)، cm^{-1} ۱۲۲۸ و cm^{-1} ۱۱۶۱ (آمید III) قابل تشخیص است. همچنین، پیک در عدد موج cm^{-1} ۱۲۲۸، مربوط به ساختار صفحات بتا و پیک در عدد موج cm^{-1} ۱۱۶۱، مربوط به ساختار تصادفی[۱۲] است، که قابل تشخیص است (۲۲). همچنین، لیگنین پیک‌هایی در عدد موج‌های cm^{-1} ۳۴۱۹ متعلق به گروه O-H در گروه هیدروکسیل، cm^{-1} ۱۶۱۰ متعلق به ارتعاش حلقه بنزن، cm^{-1} ۱۴۱۳ و cm^{-1} ۶۲۲ متعلق به کشش S-O و cm^{-1} ۱۱۲۲ متعلق به خمش C-H از حلقه بنزن است (۲۳). علاوه‌براین، پیوند هیدروژنی بین فیبروئین ابریشم و لیگنین رخ



شکل ۵- طیف مادون قرمز با تبدیل فوریه ازغشا لیفی فیبروئین ابریشم و فیبروئین ابریشم-لیگنین در نسبت‌های مختلف.

جدول ۳- زاویه ترشوندگی الیاف در ولتاژهای مختلف

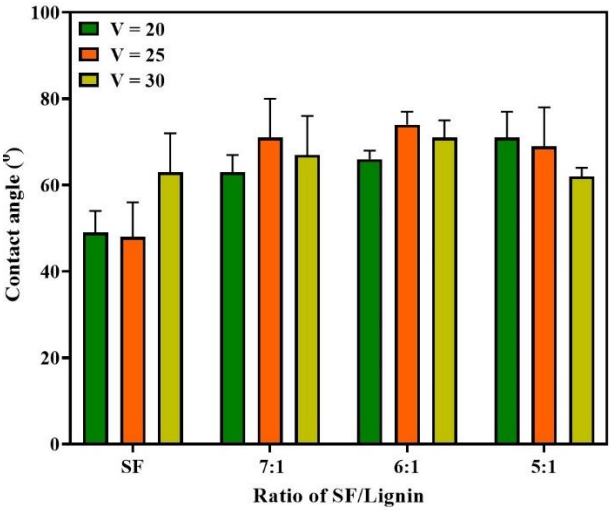
نسبت فیبروئین ابریشم به لیگنین		۱:۰	۷:۱	۶:۱	۵:۱
زاویه تماس	ولتاژ ۲۰	۴۹ ± ۵ °	۶۳ ± ۴ °	۶۶ ± ۲ °	۷۱ ± ۶ °
	ولتاژ ۲۵	۴۸ ± ۸ °	۷۱ ± ۹ °	۷۴ ± ۳ °	۶۹ ± ۹ °
	ولتاژ ۳۰	۶۳ ± ۹ °	۶۷ ± ۹ °	۷۱ ± ۴ °	۶۲ ± ۲ °

می‌دهد که این پیوند در الیاف لیگنین، بین گروه‌های هیدروکسیل رخ داده است؛ درحالی‌که در الیاف فیبروئین ابریشم، وجود پیوند هیدروژنی بین گروه‌های آمینه و هیدروکسیل می‌باشد (۲۴).

۳-۴- بررسی میزان آب‌دوستی/آب‌گریزی غشاهای لیفی

زاویه تماس معیاری برای ترشوندگی سطح ماده است و ویژگی‌های آب‌دوستی یا آب‌گریزی آن را نشان می‌دهد. زاویه تماس ۹۰ درجه، به‌عنوان نقطه مرجع درنظر گرفته می‌شود؛ به‌طوری‌که زوایای بالاتر از ۹۰ درجه، نشان‌دهنده سطوح آب‌گریز و زوایای کمتر از ۹۰ درجه، نشان‌دهنده سطوح آب‌دوست هستند (۲۵). این پارامتر تأثیر قابل‌توجهی بر چسبندگی سلولی و سرعت تخریب دارد. سطوحی که بسیار آب‌دوست یا بسیار آب‌گریز باشند، مانع از چسبندگی سلول می‌شوند (۲۶).

برای ارزیابی میزان آب‌دوستی نمونه‌های لیفی فیبروئین ابریشم-لیگنین، آزمون اندازه‌گیری زاویه تماس آب انجام شد. میانگین زاویه ترشوندگی نمونه‌ها در سه ولتاژ ۲۰، ۲۵ و ۳۰ کیلوولت، در جدول (۳) و به صورت نمودار در شکل (۶)، نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزودن لیگنین، آب‌دوستی نمونه‌ها به‌طور معناداری کاهش یافته است ($p < 0/05$) که این کاهش آب‌دوستی به علت خاصیت آب‌گریزی پلیمر لیگنین می‌باشد. قابل ذکر است که مورفولوژی الیاف بر آب‌گریزی سطح تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، قطر الیاف بر



شکل ۶- تغییرات زاویه ترشوندگی.

زاویه تماس می‌تواند اثرگذار باشد. بااین‌حال، ازآنجایی‌که سایر پارامترهای ریزساختاری و تغییرات قطر بر میزان تخلخل الیاف تأثیرگذار است، درنتیجه بر خاصیت آب‌دوستی و آب‌گریزی می‌تواند تأثیرگذار باشد.

همچنین، زاویه تماس بهینه سطحی جهت چسبندگی فیبروبلاست که امکان رشد و تکثیر بهتر و بیشتر سلول‌ها روی سطح نمونه را فراهم می‌نماید، بین ۵۵ تا ۷۵ درجه گزارش شده است (۲۷).

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، ابتدا فیبروئین ابریشم از پیله ابریشم استخراج شد و با افزودن لیگنین در نسبت‌های مختلف، غشاهای لیفی نانوکامپوزیتی به روش الکتروریسی تولید شدند. غشاهای حاصل، در ولتاژ ۲۰ کیلوولت و تمامی نسبت‌ها، الیافی یکنواخت، با قطر مناسب و بدون گره داشتند. به‌گونه‌ای که قطر الیاف در غشای فیبروئین ابریشم خالص ۳۷ $\pm$ ۲۴۱/۴۴ نانومتر بود و با افزایش لیگنین، در بالاترین نسبت به ۱۱ $\pm$ ۳۰۹/۱۰ نانومتر رسید. همچنین، باوجود افزودن لیگنین به ساختار نانوالیاف فیبروئین ابریشم، زاویه تماس با آب در محدوده مطلوب ۵۵ تا ۷۵ درجه باقی ماند که شرایط ایده‌آلی برای رشد و تکثیر سلولی فراهم می‌کند؛ بنابراین، به دلیل مورفولوژی مناسب و ویژگی‌های سطحی مطلوب، این نانوالیاف گزینه مناسبی برای کاربردهای زیستی محسوب می‌شوند.

تشکر و سپاسگزاری

از دانشگاه صنعتی اصفهان بابت انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منافعی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

سهم نویسندگان

امیرحسین محمدی فرد: جمع آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن مقاله، مدیریت منابع. **مهشید خرازیها:** طراحی و ایده‌پردازی مطالعه، راهنمایی پروژه، اعتبار سنجی نتایج. **مسعود عطاپور:** راهنمایی پروژه.

واژه‌نامه

1. silk fibroin (SF)
2. lignin (Li)
3. bead
4. formic acid
5. lignosulfonate
6. scanning electron microscopy (SEM)
7. Fourier transformed infrared (FTIR)
8. β-sheet
9. α-structure
10. acetic acid
11. hexafluoroisopropanol
12. random structure

مراجع

1. Jiang Z, Zheng Z, Yu S, Gao Y, Ma J, Huang L, et al. Nanofiber scaffolds as drug delivery systems promoting wound healing. Pharmaceutics 2023;15(7): 1829. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071829
2. Mirhaj M, Tavakoli M, Varshosaz J, Labbaf S, Jafarpour F, Ahmaditabar P, et al. Platelet rich fibrin containing nanofibrous dressing for wound healing application: Fabrication, characterization and biological evaluations. Biomater Adv. 2022;134: 112541. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112541
3. Xing X, Han Y, Cheng H. Biomedical applications of chitosan/silk fibroin composites: A review. Int J Biol Macromol. 2023;124407. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124407
4. Zhu L, Lin J, Pei L, Luo Y, Li D, Huang Z. Recent advances in environmentally friendly and green degumming processes of silk for textile and non-textile applications. Polymers (Basel) 2022;14(4):659. https://doi.org/10.3390/polym14040659
5. Sultan MT, Lee OJ, Kim SH, Ju HW, Park CH. Silk fibroin in wound healing process. Nov Biomater Regen Med. 2018;115–26. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_7
6. Selvaraj S, Inbasekar C, Pandurangan S, Nishter NF. Collagen-coated silk fibroin nanofibers with antioxidants for enhanced wound healing. J Biomater Sci Polym Ed. 2023;34(1):35–52. https://doi.org/10.1080/09205063.2022.2106707
7. Faruk O, Sain M. Lignin in polymer composites. William Andrew; 2015.
8. Figueiredo P, Lintinen K, Hirvonen JT, Kostiainen MA, Santos HA. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. Prog Mater Sci. 2018;93:233–69. https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001
9. Poursorkhabi Sharifabad V. Production and Evaluation of Carbonized Electrospun Fibers from Bioethanol Lignin. University of Guelph; 2016.
10. Lee E-S, Kim Y-O, Ha Y-M, Lim D, Hwang JY, Kim J, et al. Antimicrobial properties of lignin-decorated thin multi-walled carbon nanotubes in poly (vinyl alcohol) nanocomposites. Eur Polym J. 2018;105:79–84. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.05.014
11. Salami MA, Kaveian F, Rafienia M, Saber-Samandari S, Khandan A, Naeimi M. Electrospun polycaprolactone/lignin-based nanocomposite as a novel tissue scaffold for biomedical applications. J Med Signals Sens. 2017;7(4):228.
12. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. Nat Protoc. 2011;6(10):1612–31. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.379
13. Atrian M, Kharaziha M, Emadi R, Alihosseini F. Silk-Laponite® fibrous membranes for bone tissue engineering. Appl Clay Sci. 2019;174:90–9. https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.03.038
14. Cintra ILR, Rezende MC, Guerrini LM, Nahra LR, Lucas RR, Montagna LS, et al. Electrospinning of PAN/lignin blends aiming the production of carbon nanofibers. MRS Commun. 2024;14(1):82–9. https://doi.org/10.1557/s43579-023-00504-5
15. Zhu H, Shen J, Feng X, Zhang H, Guo Y, Chen J. Fabrication and characterization of bioactive silk fibroin/wollastonite composite scaffolds. Mater Sci Eng C. 2010;30(1):132–40. https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.09.009
16. Zhou J, Cao C, Ma X, Lin J. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2010;47(4):514–9. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.07.010
17. Chen C, Chuanbao C, Xilan M, Yin T, Hesun Z. Preparation of non-woven mats from all-aqueous silk fibroin solution with electrospinning method. Polymer (Guildf) 2006;47(18):6322–7. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.07.009
18. Ohgo K, Zhao C, Kobayashi M, Asakura T. Preparation of non-woven nanofibers of Bombyx mori silk, Samia cynthia ricini silk and recombinant hybrid silk with electrospinning method. Polymer (Guildf) 2003;44(3):841–6. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00819-4
19. Um IC, Kweon H, Park YH, Hudson S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. Int J Biol Macromol. 2001;29(2):91–7. https://doi.org/10.1016/S0141-8130(01)00159-3
20. Hohman MM, Shin M, Rutledge G, Brenner MP. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. Phys fluids 2001;13(8):2201–20. https://doi.org/10.1063/1.1383791
21. Beachley V, Wen X. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. Mater Sci Eng C. 2009;29(3):663–8. https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.037
22. Ling S, Qi Z, Knight DP, Shao Z, Chen X. Synchrotron FTIR microspectroscopy of single natural silk fibers. Biomacromolecules 2011;12(9):3344–9. https://doi.org/10.1021/bm2006032
23. Jin C, Song W, Liu T, Xin J, Hiscox WC, Zhang J, et al. Temperature and pH responsive hydrogels using methacrylated lignosulfonate cross-linker: synthesis, characterization, and properties. ACS Sustain Chem Eng. 2018;6(2):1763–71. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03158
24. Zhang Y, Peng S, Li X, Wang X, Jiang J, Liu X, et al. Design and function of lignin/silk fibroin-based multilayer water purification membranes for dye adsorption. Int J Biol Macromol. 2023;253:126863.

https://doi.org/10.3390/ma9120992
25. Wang W, Caetano G, Ambler WS, Blaker JJ, Frade MA, Mandal P, et al. Enhancing the hydrophilicity and cell attachment of 3D printed PCL/graphene scaffolds for bone tissue engineering. Materials (Basel) 2016;9(12):992. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126187
26. Ahmed S, Keniry M, Padilla V, Anaya-Barbosa N, Javed MN, Gilkerson R, et al. Development of pullulan/chitosan/salvianolic acid ternary fibrous membranes and their potential for chemotherapeutic applications. Int J Biol Macromol. 2023;250:126187. https://doi.org/10.3390/membranes1040275
27. Wei K, Kim B-S, Kim I-S. Fabrication and biocompatibility of electrospun silk biocomposites. Membranes (Basel) 2011;1(4):275–98. https://doi.org/10.3390/membranes1040275