



## بررسی تأثیر روش تولید فیلم (کامپوزیت یا دولایه) و نسبت بیوپلیمرها بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی فیلم فعال کیتوزان - ایزوله پروتئین آب پنیر به روش سطح پاسخ

خورشید حسین زاده<sup>۱</sup>، اصغر خسروشاهی اصل<sup>۲</sup>، محمد علیزاده خالد آباد<sup>۲</sup>، هادی الماسی<sup>۳\*</sup>

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه.

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه.

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۰۱

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۲۲

کلمات کلیدی:

فیلم زیست تخریب پذیر، کامپوزیت، لامیناسیون، ریزساختار، خواص مکانیکی، بهینه سازی.

DOI: 10.52547/fsct.18.04.05

\* مسئول مکاتبات:

[h.almasi@urmia.ac.ir](mailto:h.almasi@urmia.ac.ir)

هدف از این تحقیق بررسی امکان تهیه فیلم‌های کامپوزیت و دولایه کیتوزان و ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI) حاوی اسانس زیره و نانوفیبر کیتوزان و بررسی خواص آنها بود. امکان تولید فیلم کامپوزیت با کاهش pH ایزوله پروتئین به پایین تر از pH ایزوالکتریک فراهم شد. فیلم دولایه نیز با بکارگیری محلول WPI بر روی سطح فیلم خشک شده کیتوزان حاصل شد. مقادیر ترکیب فعال و نانوپرکننده ثابت بود (۱۲۵ mg/100ml) و تأثیر نسبت کیتوزان به WPI و نوع فیلم (لامینه یا کامپوزیت) با استفاده از روش سطح پاسخ بر روی خواص فیلم بررسی شد. پارامترهای مربوط به رنگ، زاویه تماس آب، جذب رطوبت، حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب و خواص مکانیکی فیلم‌ها بررسی شد. با استفاده از روش تابع مطلوبیت و بر اساس نتایج بدست آمده، فرمولاسیون بهینه فیلم‌های کامپوزیت (۶۵/۱۵ درصد WPI و ۳۴/۸۵ درصد کیتوزان) و دو لایه (۴۹/۰۱ درصد WPI و ۵۰/۹۹ درصد کیتوزان) بدست آمد. آنالیز ریزساختار فیلم‌های بهینه با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) و پراش اشعه ایکس (XRD) انجام شد. نتایج FE-SEM نشان داد در فیلم کامپوزیت با وجود ساختار ناهمگن، ناسازگاری بین دو پلیمر ایجاد نشد و همچنین در فیلم دو لایه اتصال خوبی بین دو لایه بوجود آمد. نتایج XRD نشان داد فیلم کامپوزیت ساختار نیمه کریستالی دارد و اختلاف معنی‌داری بین شدت پیک‌ها و خواص کریستالی فیلم کامپوزیت و دو لایه وجود ندارد. در نتایج FTIR اختلاف کمی بین طیف دو نوع فیلم مشاهده شد. نتایج بررسی فیلم‌های بهینه نشان داد، خصوصیات فیلم کامپوزیت در مقایسه با فیلم دو لایه مطابقت بیشتری با مدل پیش بینی شده دارد. اما فیلم لامینه از خصوصیات مورفولوژیکی بهتر و پتانسیل کاربرد بیشتر در بسته بندی یا مواد غذایی برخوردار بود و برای نگهداری محصولات غذایی مختلف پیشنهاد گردید.

## ۱- مقدمه

تحقیقات زیادی در جهت کاهش اثرات مخرب ضایعات پلاستیکی از طریق جایگزین کردن این مواد با منابع تجدید پذیر انجام شده است. در این میان بسته‌بندی بر پایه بیوپلیمرها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و یکی از زمینه‌های تحقیقات جدید در علم پلیمر به شمار می‌روند [۱]. بسته‌بندی‌های زیست تخریب پذیر به طور معمول از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و لیپیدها به تنهایی، به شکل ترکیب شده و یا لامینه ساخته می‌شوند [۲]. با وجود مزایای ارزشمند بسته‌بندی‌های زیست تخریب پذیر، کاربرد این مواد به دلیل خواص مکانیکی ضعیف در مقایسه با پلیمرهای پلاستیکی، محدود می‌شود. جهت مقابله با این مشکل و بهبود خواص فیزیکی و مکانیکی بیوپلیمرها، راهکارهایی بکار گرفته شده است از جمله مخلوط کردن بیوپلیمرها و تولید فیلم‌های کامپوزیت و یا استفاده از تقویت کننده‌های نانو (مانند نانوالیاف آلی و معدنی) و تولید فیلم‌ها و پوشش‌های بیونانوکامپوزیت [۳].

یکی دیگر از دلایل علاقه‌مندی به پلیمرهای زیست تخریب پذیر پتانسیل آنها جهت تولید پوشش‌ها و فیلم‌های ضد میکروب می‌باشد که کیتوزان نقش مهمی در این زمینه بازی می‌کند. کیتوزان (پلی-آلفا- $(1-4)$ - $2$ -آمینو- $2$ -دئوکسی-دی-گلوکز) یک بیوپلیمر آبدوست می‌باشد که از استیل زدایی کیتین در یک محیط قلیایی بدست می‌آید. کیتین دومین بیوپلیمر طبیعی می‌باشد که دارای خواص ویژه کاربردی، تغذیه‌ای و درمانی شامل استفاده در پوشش دهی، تشکیل فیلم و آزاد سازی کنترل شده مواد مغذی، داروها و ترکیبات بیواکتیو می‌باشد [۴]. اما با این وجود کیتوزان به عنوان بسته بندی فعال مواد غذایی به تنهایی فعالیت ضد میکروبیکی دارد. بهبود خواص ضد میکروبی کیتوزان می‌تواند کاربرد این بیوپلیمر را در بسته بندی‌های فعال افزایش دهد [۵].

اخیراً اسانس و عصاره استخراج شده از گیاهان به عنوان ترکیبات فعال جهت استفاده در فیلم‌ها و پوشش‌های زیست تخریب پذیر مورد توجه قرار گرفته‌اند. عصاره و اسانس گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات فنلی زیاد خواص ضد میکروب علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن با منشاء مواد غذایی دارند. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند استفاده از این ترکیبات در فیلم‌های حاصل از بیوپلیمرهایی مانند کیتوزان نه تنها خواص

آنتی اکسیدانی و ضد میکروب را افزایش می‌دهد بلکه نفوذپذیری به بخار آب را نیز کاهش می‌دهد. زیره سبز گیاهی یکساله معطر، دیپلوئید و گرده افشان از خانواده اپیچه<sup>۱</sup> می‌باشد [۶]. این گیاه در مواد غذایی، عطرها و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. زیره در هند، چین، عربستان، ایران و کشورهای مجاور دریای مدیترانه کشت می‌شود. دانه‌های زیره حاوی روغن‌های فرار (۵ درصد)، چربی (۲۲ درصد)، پروتئین (۱۰ درصد)، فیبر (۱۱ درصد) و اسیدهای آمینه آزاد می‌باشند. اسانس زیره سبز ویژگی‌های بیولوژیکی مهمی مانند ضدباکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی دارد. کومین‌آلدئید<sup>۲</sup> یکی از ترکیبات فرار عمده زیره می‌باشد که خواص ضد میکروب و ضد قارچی دارد [۷].

فیلم‌های کیتوزان به دلیل طبیعت آبدوست خود خواص ممانعت کنندگی ضعیفی در برابر رطوبت دارند. همان طور که ذکر شد، یکی از راه‌هایی کاهش انتقال آب از فیلم‌های بیوپلیمری و بهبود نفوذپذیری به بخار آب استفاده از ذرات نانو در ماتریس فیلم و تولید فیلم‌های نانوکامپوزیت می‌باشد. بیونانوکامپوزیت‌ها خواص مکانیکی و فیزیکی تقویت شده و بهتری نسبت به فیلم‌های تک پلیمری یا کامپوزیت معمولی دارند [۸]. استفاده از تقویت کننده‌های با ابعاد نانو مانند نانوفیبر سلولز<sup>۳</sup> [۹]، ذرات نانو نقره<sup>۴</sup> [۱۰]، نانوذرات اکسید روی<sup>۵</sup> [۱۱] و نانو لوله‌های کربن [۱۲] در ترکیب فیلم کیتوزان مورد بررسی قرار گرفته و اثر آنها روی بهبود خواص فیلم اثبات شده است. نانو فیبر کیتوزان ساختار بسیار یکنواختی دارد و قطر آنها ۱۰ الی ۲۰ نانومتر می‌باشد و به دلیل اندازه زیر میکرونی و نسبت سطح به حجم بالا، پخش پذیری بسیار خوبی در آب از خود نشان می‌دهند. کاربردهای مختلف نانوفیبر کیتوزان در زمینه داروسازی بسیار مورد بررسی قرار گرفته‌اند. اما استفاده از این نانو ذرات در ماتریکس کیتوزان به ندرت بررسی و گزارش شده است.

یکی از روش‌های مرسوم تقویت خواص فیلم‌های بیوپلیمری، اختلاط آنها با یکدیگر می‌باشد. کیتوزان با خواص کاتیونی تمایل زیادی برای باند شدن با ترکیبات با بار منفی مانند پروتئین‌ها دارد. بسیاری از بیوفیلم‌ها از ترکیب پروتئین‌ها (مانند پروتئین آب پنیر، کازئینات، ژلاتین، ژلاتینات) و پلی‌ساکاریدها

2. Apiaceae
3. Cuminaldehyde
4. Nanofibrillated cellulose
5. Silver nanoparticles (AgNPs)
6. ZnO nanoparticles
7. Carbon nanotubes

1. Deacetylation

## ۲-۲- آماده سازی محلول فیلم

ساخت محلول فیلم‌ها بر اساس روش پردا و همکاران با کمی اصلاحات انجام شد [۱۵]. کیتوزان در محلول اسید استیک ۱ درصد حجمی-حجمی با استفاده از هیتر به مدت ۱۲ ساعت در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  حل شد، پس از انحلال کامل پودر کیتوزان، دمای محلول به  $80^{\circ}\text{C}$  رسانیده شد و ۲۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد. سپس محلول بدست آمده با کاغذ صافی و پمپ خلاء صاف شد [۱۶]. محلول آبی WPI با غلظت ۲/۵ درصد وزنی-حجمی طی ۱ ساعت هم زدن در دمای اتاق تهیه شد. جهت دنا توره شدن پروتئین‌ها، محلول بدست آمده ۲۰ دقیقه در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  حرارت دید. پس از سرد شدن محلول‌های کیتوزان و WPI تا دمای اتاق، گلیسرول به اندازه ۳۰ درصد وزن بیوپلیمر به آنها اضافه و مخلوط شدند.

برای تهیه محلول فیلم کامپوزیت، محلول WPI با استفاده از بافر استات سدیم (۹۸۲/۳ میلی‌لیتر استیک اسید + ۱۷/۷ میلی‌لیتر سدیم استات) تهیه شد و pH آن با استفاده از استیک اسید روی ۳/۵ تنظیم شد. برای محلول WPI مورد استفاده برای فیلم‌های دو لایه و WPI خالص، از آب مقطر به عنوان حلال استفاده شد. هر دو محلول کیتوزان و WPI با هم مخلوط شده و برای تولید فیلم استفاده شدند. همه محلول‌های فیلم دارای مقادیر یکسان اسانس زیره و نانوفیبر کیتوزان بودند (۱۲۵ میلی گرم از هر کدام به ازای هر ۱۰۰ میلیلیتر از محلول فیلم). جهت پخش یکنواخت و کامل اسانس زیره سبز ۰/۰۳۷۵ گرم متوئین ۸۰ به هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول فیلم اضافه شد [۱۷]. ۳۰ میلی‌لیتر از هر محلول فیلم به پلیت با قطر ۱۰ سانتی‌متر منتقل شد و در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت خشک شدند. سپس فیلم‌ها از پلیت جدا شدند و در رطوبت ثابت و دمای  $30^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳ روز نگهداری شدند.

جهت ساخت فیلم‌های دولایه ابتدا محلول WPI به پلیت منتقل شد و پس از خشک شدن، محلول کیتوزان به آن اضافه و خشک شد. نسبت بین دو لایه WPI و کیتوزان طبق جدول ۱ به صورت درصد حجمی تنظیم شد. پس از اتمام فرایند خشک شدن، فیلم‌ها از پلیت جدا شدند و در رطوبت ثابت و دمای  $30^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳ روز نگهداری شدند [۱۸].

## ۲-۳- بررسی ویژگی های فیلم

### ۲-۳-۱- اندازه گیری رنگ

رنگ فیلم با استفاده از رنگ سنج (Minolta, Model CR-300) بر مبنای مدل رنگی CIE اندازه گیری شد. پارامترهای

(مانند نشاسته، آلژینات‌ها، سلولز، کیتوزان) ساخته شدند و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پروتئین‌ها به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند قدرت تشکیل شبکه و الاستیسیته خوب، ترکیبات مناسبی جهت ساخت بسته‌بندی‌های زیست تخریب پذیر می‌باشند. فیلم‌های ترکیبی کیتوزان و پروتئین، در مقایسه با فیلم‌های تک پلیمری، به دلیل تشکیل برهمکنش الکترواستاتیک بین گروه‌های آمین کیتوزان و گروه‌های کربوکسیل پروتئین‌ها خواص عملکردی بهتری دارد [۱۳]. ساخت فیلم و پوشش ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI) به دلیل خوراکی بودن، قابلیت زیست تخریب پذیری، توانایی تولید فیلم و پوشش شفاف و ممانعت کنندگی بالا در برابر اکسیژن و ترکیبات آروماتیک در رطوبت نسبی پایین، در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. اما خواص مکانیکی ضعیف این فیلم، کاربرد آن را محدود کرده است. مخلوط کردن ایزوله پروتئین آب پنیر با پلی‌ساکاریدهایی مانند پولولان، متیل سلولز و کیتوزان خواص نفوذپذیری به اکسیژن پلی‌ساکاریدها و خواص مکانیکی ایزوله پروتئین آب پنیر را بهبود می‌یابد [۱۴]. تاکنون مطالعه‌ای بر روی تولید و مقایسه فیلم‌فعال کامپوزیت دو لایه کیتوزان گزارش نشده است. نانوفیبر کیتوزان به عنوان نانو پرکننده و اسانس زیره به عنوان ترکیب فعال در فیلم مرکب کیتوزان - WPI بکار گرفته شد اما هدف اصلی این پژوهش، بررسی تاثیر نسبت غلظت کیتوزان و WPI بر خواص فیلم‌های کیتوزان و WPI حاوی اسانس زیره و نانوفیبر کیتوزان تولید شده در دو حالت دولایه و کامپوزیت بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

کیتوزان با وزن مولکولی ۸۰ کیلو دالتون و ژل ۴/۵ درصد نانوفیبر کیتوزان از شرکت دانش بنیان نانونوین پلیمر (ساری، ایران) خریداری شد. زیره از بازار محلی کاشان خریداری شد و اسانس آن از طریق تقطیر با کلونجر استخراج شد. پودر ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI) با درصد پروتئین ۸۶/۴ درصد از شرکت لاکتوپروت (بیرمنگام، آلمان) خریداری شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع گرید آزمایشگاهی بودند و از نمایندگی شرکت سیگما-آلدردیج (برلین، آلمان) خریداری شدند.

### ۲-۳-۵- خواص مکانیکی

استحکام کششی نهایی (UTS)<sup>۱۲</sup>، ازدیاد طول در نقطه شکست (ETB)<sup>۱۳</sup> و مدول یانگیا الاستیک (EM)<sup>۱۴</sup> فیلم‌ها با دستگاه بافت سنج UTM مدل H100K-S ساخت کشور انگلستان طبق استاندارد ASTM D882-95 اندازه‌گیری شد. فاصله اولیه بین دو فک ۵۰ میلی‌متر و سرعت اولیه ۱ میلی‌متر بر ثانیه تنظیم شد. از نمونه‌های مستطیلی شکل با ابعاد ۸۰ میلی‌متر طول و ۱۰ میلی‌متر عرض استفاده شده است. خواص مکانیکی براساس میانگین ضخامت هریک از نمونه‌ها محاسبه گردید [۲۰].

### ۲-۳-۶- زاویه تماس

زاویه تماس با روش چکاندن قطره<sup>۱۵</sup> آب اندازه‌گیری شد. در این روش حدود ۱/۵ میکرولیتر از قطره آب روی سطح افقی فیلم قرار داده شد. اندازه‌گیری با استفاده از زاویه سنج DGD-DX مجهز به نرم افزار تجزیه و تحلیل تصاویر DIGIDROP ساخت کشور فرانسه طبق روش کاربویاک و همکاران انجام شد [۲۱].

### ۲-۳-۷- نفوذ پذیری به بخار آب

نفوذپذیری به بخار آب در نمونه های فیلم طبق روش استاندارد ASTM E96-05 با کمی تغییرات انجام شد [۲۲]. ویال‌های شیشه‌ای (ارتفاع ۴/۵cm و قطر ۲ cm) با استفاده از نمونه‌های فیلم با قطر یکمی بیشتر پوشش داده شدند. رطوبت نسبی درون ویال‌ها با استفاده از ۳ گرم سولفات کلسیم بدون آب به صفر درصد رسانیده شد. سپس ویال‌ها در دسیکاتور حاوی محلول سولفات پتاسیم اشباع قرار داده شدند که رطوبت نسبی آن در ۲۵ °C به درصد رسیده بود. ویال‌ها هر ۲۴ ساعت توزین شدند و تغییر وزن آنها ثبت شد و شیب آن با استفاده از رگرسیون خطی محاسبه شد (وزن در برابر زمان). نرخ انتقال بخار آب<sup>۱۶</sup> به صورت شیب بخش خطی نمودار (g/h) تقسیم بر ناحیه انتقال تعریف می‌شود. در نهایت نفوذپذیری به بخار آب نمونه‌های فیلم (Pa.h.g/m<sup>۲</sup> × 10<sup>-7</sup>) با استفاده از فرمول (۲) محاسبه شد:

$$(2)$$

$$WVP = WVTR \cdot X / P(R_1 - R_2)$$

12. Ultimate Tensile Strength (UTS)

13. Elongation to Break (ETB)

14. Young's modulus (EM)

15. Sessile drop

16. Water vapor transmission rate (WVTR)

رنگ L\* از سیاه (۰) تا سفید (۱۰۰)، a\* از سبز (-) تا قرمز (+) و b\* از آبی (-) تا زرد (+) برای تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند.

یک صفحه رنگی استاندارد سفید (L\* = 97/75, a\* = 0/49, b\* = 1/96) برای کالیبراسیون دستگاه به عنوان زمینه‌ای برای اندازه‌گیری رنگ فیلم‌ها استفاده شد. مقادیر L, a, b از میانگین ۱۶ اندازه‌گیری در هر فیلم بدست آمد و سپس تفاوت رنگ کل (ΔE) با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد [۱۹]:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5} \quad (1)$$

در این معادله L<sub>0</sub>\*, a<sub>0</sub>\*, b<sub>0</sub>\* مقادیر رنگ صفحه استاندارد و L\*, a\*, b\* مقادیر رنگی فیلم‌ها می‌باشند.

### ۲-۳-۲- ریز ساختار فیلم

ساختار میکروسکوپی فیلم‌های بهینه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی<sup>۹</sup> (FE-SEM, ZEISS SIGMA VP) بررسی شد. نمونه‌ها با استفاده از چسب دوطرفه بر روی پایه آلومینیومی قرار داده شدند و طی ۴۵ ثانیه در ۲۰ میلی آمپر با طلا پوشش داده شدند. همه نمونه‌ها با استفاده از پرتو تسریع شده درولتاژ ۱/۵ کیلوولت بررسی شدند.

### ۲-۳-۳- آنالیز با طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز<sup>۱۰</sup>

ویژگی ساختاری و پیوندهای احتمالی جدید در ساختار نمونه‌های فیلم بهینه با استفاده از طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (Nexus - 670, Thermo Nicolet USA) در دامنه ۴۰۰-۴۰۰۰ cm<sup>-1</sup> با وضوح ۴ cm<sup>-1</sup> بررسی شد. نمونه‌ها به روش قرص پتاسیم بروماید آماده‌سازی شدند. سه قطره از محلول فیلم‌های آماده شده روی قرص پتاسیم بروماید ریخته شد و به آرامی خشک شد. سپس به اندازه قرص با ضخامت ۱ میلی‌متر فشرده شدند. پس از آماده سازی، نمونه‌ها با دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز آنالیز شدند.

### ۲-۳-۴- پراش اشعه ایکس<sup>۱۱</sup>

ساختار کریستالی فیلم‌های بهینه با استفاده از پراش سنج اشعه ایکس زمینس مدل D5000 مجهز به پرتو Cu K $\alpha$  در ۴۰ کیلوولت، ۳۰ میلی‌آمپر، با  $\lambda = 0/154 \text{ nm}$  مورد بررسی قرار گرفت. اسکن نمونه‌ها از ۵ تا ۸۰ درجه و با فواصل اندازه‌گیری ۰/۵ درجه انجام شد.

9. Field emission scanning electron microscope

10. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)

11. X-Ray Diffraction (XRD)

۱۶ فرمولاسیون مختلف تولید شد و پس از مدلسازی و آنالیز رگرسیون، شرایط بهینه با روش عددی و کاربرد تابع مطلوبیت<sup>۱۸</sup> تعیین گردید. سطح خطای نوع اول در این مطالعه ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. از نرم افزار Design Expert 7.1.6 جهت طراحی آزمایشی، تحلیل داده‌ها، مدل سازی و بهینه کردن پارامترها استفاده گردید.

هر یک از پاسخ‌های رنگ فیلم، زاویه تماس آب، نفوذپذیری به بخار آب، حلالیت، جذب رطوبت و خواص مکانیکی در قالب مدل رگرسیون درجه دوم چند متغیره به صورت تابعی از متغیرهای مستقل ارائه شدند. مدل ارائه شده به صورت زیر بود:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2$$

در این مدل Y پاسخ پیش بینی شده،  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای مستقل (سه فاکتور) و  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_{ij}$  اثرات خطی،  $\beta_{ii}$  اثرات متقابل و  $\beta_{ij}$  اثرات مربعی می‌باشند. کل مدل شامل جملات خطی، درجه دوم و حاصل ضربها می‌باشد. به منظور ارزیابی صحت مدل‌های برازش داده شده با داده‌های آزمایشی، فرمولاسیون فیلم‌های بهینه تعیین شد و پس از تولید فیلم‌های بهینه، آزمون‌های مورد نظر روی آنها صورت گرفته و نتایج ارزیابی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید.

**Table 1** Formulation of laminated and composite chitosan-WPI films

Code	Type of film	WPI(%)	Chitosan(%)
1	laminated	100	0
2	composite	50	50
3	composite	67	33
4	composite	0	100
5	laminated	0	100
6	laminated	0	100
7	laminated	100	0
8	laminated	75	25
9	composite	100	0
10	composite	100	0
11	composite	25	75
12	laminated	25	75
13	laminated	50	50
14	composite	75	25
15	laminated	67	33
16	composite	0	100

WPI: whey protein isolate

18. Desirability function

P فشار بخار اشباع آب (Pa) در دمای  $25^\circ\text{C}$   $R_{1,25}$  رطوبت نسبی دسیکاتور،  $R_2$  رطوبت نسبی درون ویال و  $X$  متوسط ضخامت نمونه‌های فیلم (m) می‌باشد. تحت این شرایط، میزان  $[P (R_1 - R_2)]$  برابر با  $3115.42$  پاسکال می‌باشد. ضخامت فیلم‌ها با استفاده از میکرومتر دیجیتال insize مدل MEC310-25 ساخت کشور آلمان با دقت ۱ میکرومتر اندازه گیری شد. ضخامت هر فیلم حداقل در ۵ قسمت (یک قسمت در مرکز و ۴ قسمت در اطراف) اندازه‌گیری شد و میانگین آنها به عنوان ضخامت فیلم در نظر گرفته شد.

### ۲-۳-۸- حلالیت در آب

جهت تعیین حلالیت در آب حدود ۱۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های فیلم توزین و سپس در دمای  $100^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. فیلم‌های خشک شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه ور و در دمای  $25^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت به آرامی همزده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، فیلم‌ها با استفاده از سانتریفیوژ ( $5000\text{ rpm}$ ) جدا شدند و در دمای  $100^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند تا میزان ماده خشک حل نشده در آب تعیین شود. وزن ماده خشک حل شده به عنوان درصد فیلم حل شده طبق فرمول (۳) گزارش شد:

(۳)

$$\text{Water Solubility (\%)} = \frac{\text{wt of initial dry matter} - \text{wt of dry matter not solubilized}}{\text{wt of initial dry matter}}$$

### ۲-۳-۹- جذب رطوبت

نمونه‌های فیلم به قطعات  $2 \times 2\text{ cm}$  برش داده شدند و با دقت  $0.01$  میلی‌گرم در ویال‌هایی با وزن ثابت توزین شدند. سپس فیلم‌ها در دسیکاتور حاوی محلول اشباع کلسیم نیترات جهت رسیدن به رطوبت نسبی ۵۰-۵۵ درصد در  $25^\circ\text{C}$  ذخیره شدند. تا زمان حصول تعادل، نمونه‌ها فیلم به طور دوره‌ای توزین شدند. میزان رطوبت نهایی با خشک کردن مجدد فیلم‌ها بدست آمد. میزان جذب رطوبت به صورت گرم از آب به ازای هر گرم از ماده خشک بیان شد.

### ۲-۴- آنالیز آماری

در این مطالعه از طرح مرکب مرکزی (CCD)<sup>۱۷</sup> (برای ارزیابی تاثیرگذاری دو فاکتور فرمولاسیون (نسبت کیتوزان و پروتئین آب پنیر) و یک فاکتور اسمی دو سطحی فرآوری (دو لایه و کامپوزیت) بر ویژگی‌های فیلم استفاده شد. مطابق جدول ۱ تعداد

17. Central combined design

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- امکان سنجی تشکیل فیلم کامپوزیت و

## دولایه

قبل از شروع پژوهش لازم بود تا امکان تولید فیلم لامینه و کامپوزیت از ترکیب WPI و کیتوزان بررسی شود. با توجه به تفاوت در حلال مورد استفاده برای دو بیوپلیمر و نیز حساسیت هر دو به pH، این نکته حائز اهمیت بود. در نزدیکی pH ایزوالکتریک توانایی تشکیل فیلم WPI محدود می‌شود و در pH بالاتر از ایزوالکتریک توانایی تشکیل فیلم در کیتوزان کاهش پیدا می‌کند [۲۳]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد تشکیل فیلم کامپوزیت کیتوزان/WPI و یا کیتوزان/کازئینات در ۷- pH به دلیل نامحلول شدن یکی از بیوپلیمرها و یا تشکیل کمپلکس نامحلول بین آنها، امکان پذیر نمی‌باشد [۱۵، ۱۶]. بنابراین جهت تولید فیلم کامپوزیت کیتوزان و WPI، pH محلول WPI به پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک کاهش پیدا کرد و کیتوزان نیز در محلول اسیدی استیک اسید درصد آماده شد تا هردو بیوپلیمر بار مثبت داشته باشند و با ایزویکورد از تشکیل رسوب ناشی از کمپلکس پلیون (پلی آنیون-پلی کاتیون) ممانعت شد. WPI در pH ۷ توانایی خوبی در تشکیل فیلم دارد و خواص آن تحت این شرایط به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است [۲۵، ۲۴] اما کاهش pH در فیلم WPI که در آن گلیسرول به عنوان نرم کننده بکار رفته است، ثبات فیزیکی محلول فیلم و در نتیجه شکل گیری لایه پروتئینی در سیستم‌های چند لایه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در واقع پایداری فیلم دولایه به میزان چسبندگی دویوپلیمر بستگی دارد. جداکردن فیلم WPI از پلیت در pH پایین‌تر از ایزوالکتریک به دلیل کاهش فعالیت گروه‌های SH و دارا بودن بار مثبت امکان پذیر نبود. بنابر دلایل ذکر شده، محلول فیلم WPI مورد استفاده در ساخت فیلم‌های دو لایه و تک پلیمری با آب مقطر تولید شد. نتایج بدست آمده در این مطالعه در رابطه با توانایی تشکیل فیلم با سایر مطالعات مشابه بود [۲۷، ۲۶، ۲۴].

## ۳-۲- انتخاب مدل کارآمد به منظور

## پیش‌بینی پاسخ‌ها

روش سطح پاسخ از روش‌های پیشرفته برای تحلیل و مدل سازی داده‌ها است که دارای روش‌های گوناگونی جهت طراحی آزمایشی می‌باشد. در روش سطح پاسخ به ازای هر متغیر وابسته مدل رگرسیونی چند متغیره‌ای تعریف می‌شود که تأثیر خطی، درجه دوم و متقابل متغیرهای مستقل را بر روی هر متغیر وابسته بیان می‌کند. مدل‌های بدست آمده از آنالیز داده‌های واقعی برای فیلم‌های زیست تخریب پذیر تعریف شده است. در این پژوهش ضرائب مربوط به مدل‌های رگرسیونی و نتایج آنالیز واریانس برای هر یک از متغیرهای تابع استخراج گردید. برای بررسی صحت مدل‌ها از تست عدم برازش ضرائب تبیین ( $R^2$ ) و تبیین اصلاح شده ( $AdjR^2$ ) استفاده گردید. از نظر آماری مدلی مناسب است که تست عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و دارای بالاترین مقادیر باشد. هر چه عدد  $R^2$  به یک نزدیکتر باشد قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می‌باشد [۲۸].

## ۳-۳- خواص ظاهری فیلم

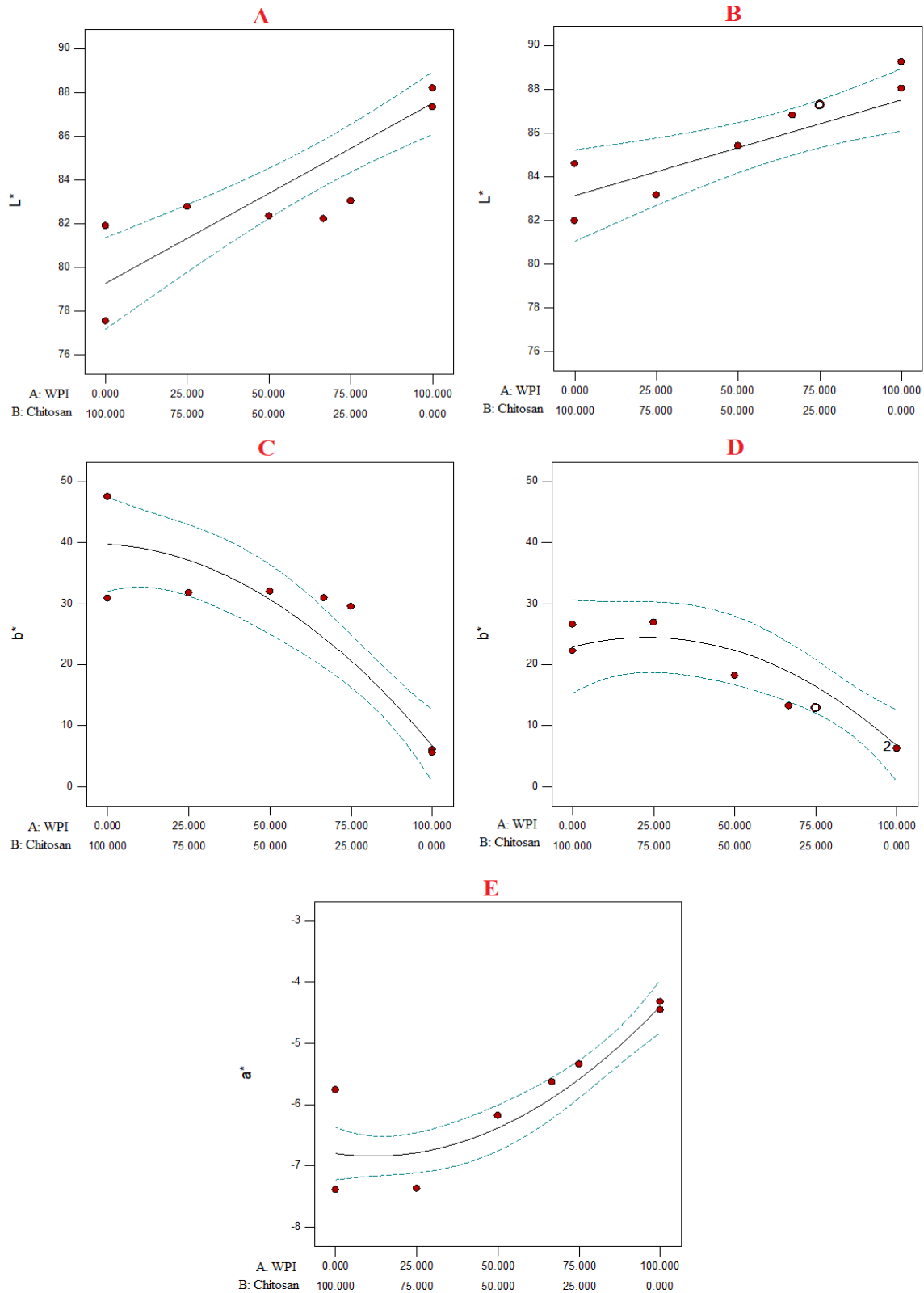
آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد پارامترهای رنگی  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  فیلم‌ها را می‌توان با معادلات زیر توصیف کرد:

$$L^* = 87.52WPI + 81.20CH + 1.93CH \times \text{Film type}$$

$$a^* = -4.39WPI - 6.80CH - 3.14WPI \times CH$$

$$b^* = 6.70WPI + 31.37CH + 30.03WPI \times CH - 8.40CH \times \text{Film type}$$

ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده پارامتر  $b^*$  به ترتیب ۰/۸۳ و ۰/۷۹، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده پارامتر  $a^*$  به ترتیب ۰/۸۶ و ۰/۸۴ و ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده پارامتر  $L^*$  به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۷۴ بود. شاخص عدم برازش همه مدل‌ها غیر معنی‌دار بود ( $p > 0.05$ ) و غیر معنی‌داری عدم برازش نشان دهنده این است که مدل‌ها مناسب می‌باشند. در مورد پارامتر  $L^*$  اثر خطی متغیرها و اثر متقابل نوع فیلم و درصد کیتوزان معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). در پارامتر  $b^*$  علاوه بر اثر خطی متغیرها، اثر متقابل نوع فیلم و درصد کیتوزان و درصد کیتوزان و WPI نیز معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ). در پارامتر  $a^*$  اثر خطی متغیرها و اثر متقابل درصد کیتوزان و WPI معنی‌دار می‌باشد ( $p < 0.05$ ).



**Fig 1** Color parameters of WPI/ chitosan composite films (A, C, E) and laminated films (B, D)

تیمارها نشان می‌دهد با کاهش میزان کیتوزان  $L^*$  و  $a^*$  افزایش و مقدار  $b^*$  کاهش می‌یابد. در نمودار مربوط به نتایج پارامتر  $a^*$  (نمودار E) افزایش مقدار منفی  $a^*$  نشان دهنده وجود رنگ سبز و افزایش  $b^*$  نشان دهنده رنگ زرد در فیلم‌ها می‌باشد.

همان طور که در شکل ۱ و در نمودار C و D مشاهده می‌شود، فیلم کیتوزان دارای بیشترین مقدار  $b^*$  بود که علت این امر ماهیت نسبتاً زرد رنگ خود کیتوزان می‌باشد. مقایسه فیلم کیتوزان (صرف نظر از نوع فیلم دو لایه یا کامپوزیت) با سایر

WPI و اثر متقابل نوع فیلم و میزان WPI تأثیر معنی داری بر میانگین زاویه تماس لایه بالایی فیلم‌ها دارد ( $p < 0/05$ ). همچنین اثر خطی متغیرها و اثر متقابل درصد کیتوزان و WPI بر میانگین زاویه تماس لایه پایینی فیلم کامپوزیت تأثیر معنی داری دارد ( $p < 0/05$ ). مطابق جدول شماره ۲ نتایج نشان داد که زاویه تماس فیلم کامپوزیت با درصد پروتئین نسبت عکس دارد و با نتایج مطالعات قبلی در زمینه ساخت فیلم کامپوزیت کیتوزان/کنسانتره آب پنیر [۱۴]، کیتوزان/ژلاتین [۲۹] و کیتوزان/پروتئین سویا [۳۰] مطابقت دارد. علت این امر ایجاد پیوند هیدروژنی بین مولکول‌های پروتئین با گلیسرول و افزایش گروه‌های آبدوست مولکول‌های پروتئینی به سمت سطح فیلم می‌باشد [۳۱]. به دلیل تفاوت در نوع پلیمر، زاویه تماس سطح بالایی و پایینی فیلم‌های دو لایه اختلاف معنی داری داشتند. زاویه تماس سطح بالایی این فیلم‌ها با کاهش میزان کیتوزان از ۱۰۰ درصد به ۵۰ درصد، افزایش و سپس با کاهش بیشتر کیتوزان از ۵۰ درصد تا ۰ درصد، کاهش یافت. در لایه پایینی فیلم‌های دو لایه با افزایش میزان WPI زاویه تماس کاهش و در نتیجه خواص آبدوستی فیلم افزایش یافت. بطور کلی، نتایج نشان داد که لایه کیتوزان نسبت به لایه WPI از آبدوستی کمتری برخوردار است و این مورد را میتوان در زمان استفاده از فیلم‌های لامینه مدنظر قرار داد و دقیقاً مشخص نمود که کدام لایه از فیلم از تماس با ماده غذایی یا محیط بیرون قرار بگیرد.

مقدار  $\Delta E$  با تغییر درصد کیتوزان و در نتیجه پارامترهای  $a^*$ ،  $L^*$  و  $b^*$  تغییر کرد به همین دلیل با افزایش میزان کیتوزان میزان  $\Delta E$  نیز افزایش پیدا کرد. میزان افزایش  $\Delta E$  در فیلم‌های کامپوزیت بیشتر از دو لایه می‌باشد. نتایج این مطالعه با مشاهدات مطالعات دیگر مانند فیلم کیتوزان-ژلاتین [۲۸] مشابه بود.

### ۳-۴- زاویه تماس

زاویه تماس بزرگ نشان دهنده خصوصیت آبگریزی و زاویه تماس کوچک نشان دهنده خواص آبدوست در فیلم‌ها می‌باشد. با توجه به دولایه بودن برخی از فیلم‌ها زاویه تماس در لایه رویی و زیرین فیلم‌ها اندازه گیری شد. زاویه تماس در فیلم کیتوزان خالص از ۴۹/۵ الی ۵۸/۵۱ و در فیلم‌های WPI از ۲۶/۵۷ الی ۳۰/۲ متغیر بود (جدول ۲). مطابق آنالیز واریانس، مدل‌های زاویه تماس لایه بالایی در هر دو نوع فیلم و زاویه تماس لایه پایینی تنها در فیلم‌های کامپوزیت معنی دار ( $p < 0/05$ ) و شاخص عدم برازش هر دو مدل غیر معنی دار بود ( $p > 0/05$ ). ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده لایه بالایی به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۷۴ و در لایه پایینی به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۵۹ بودند. زاویه تماس لایه بالایی و پایینی فیلم‌ها را می‌توان با معادلات زیر توصیف کرد:

$$\begin{aligned} \text{Up layer} &= 39.44 \text{ WPI} + 53.55 \text{ CH} + 49.61 \\ &\text{WPI} \times \text{CH} + 11.97 \text{ WPI} \times \text{Film type} \\ \text{Down layer} &= 28.84 \text{ WPI} + 55.02 \text{ CH} + 21.07 \\ &\text{WPI} \times \text{CH} + 92.46 \text{ WPI} \times \text{CH} \text{ (WPI-CH)} \end{aligned}$$

طبق آنالیز داده‌ها اثر خطی متغیرها، اثر متقابل درصد کیتوزان و

**Table 2** Water solubility, water vapor permeability (WVP), moisture absorption and water contact angle of chitosan/WPI composite and laminated films.

Film type/ WPI%	Solubility (%)	WVP ( $\times 10^{-7}$ g/m.s.Pa)	Moisture absorption (%)	Contact angle	
				Up layer	Down layer
laminated/0	27.78	19.41	12.72	48.09	48.09
laminated/0	25.81	19.89	14.28	63.74	63.74
laminated/25	25.93	19.89	10.29	62.03	45
laminated/50	20.69	16.16	11.47	68.42	41.21
laminated/67	16.67	15.8	10.44	65.52	38.56
laminated/75	18.18	15.63	8.47	62.62	62.62
laminated/100	32.5	15.14	8.86	37.12	25.47
laminated/100	34.29	14.3	5.47	32.52	32.52
composite/0	27.5	19.43	13.11	49.5	49.5
composite/0	30.56	19.89	13.69	58.51	58.51
composite/25	24.14	19.89	6.25	43.21	43.21
composite/50	25.81	19.27	8.92	53.93	53.93
composite/67	22.22	17.41	11.76	53.67	53.67
composite/75	26.47	13.8	8.19	38.81	38.81
composite/100	29.41	14.92	8.82	26.57	26.57
composite/100	31.25	14.92	8.45	30.2	30.2



- 31.56 WPI×CH (WPI-CH) - 30.3818 WPI×CH×Film type(WPI-CH)

شکل ۲ تأثیر درصد کیتوزان و WPI را بر میزان حلالیت در فیلم‌های دولایه و کامپوزیت نشان می‌دهد. با افزایش میزان WPI از ۰ تا ۷۵ درصد در فیلم دولایه از ۰ تا ۵۰ درصد در فیلم‌های کامپوزیت میزان حلالیت کاهش پیدا کرد و در فیلم WPI خالص افزایش پیدا کرد (جدول ۲). علت این امر افزایش میزان بلورینگی زنجیرهای خطی کیتوزان بواسطه سازگاری بیشتر آن با نانوفیبر کیتوزان است که اساس زیره سبز را بخوبی محصور کرده و از این طریق خروج کمتر آن از بستر فیلم را باعث می‌شود. در نتیجه با کاهش میزان کیتوزان در فیلم، میزان حلالیت افزایش پیدا می‌کند و WPI بیشتر، حلالیت بیشتر فیلم را موجب می‌شود.

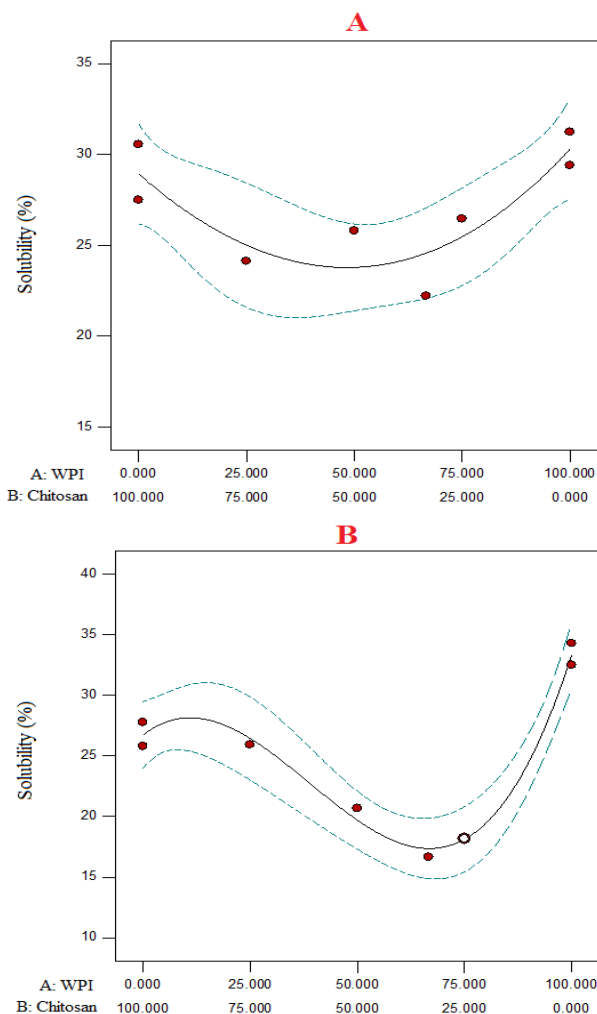


Fig. 2. Water solubility of WPI/ chitosan composite films (A) and laminated films (B)

### ۳-۷- نفوذ پذیری نسبت به بخار آب

نتایج اندازه‌گیری نفوذپذیری به بخار آب در جدول ۲ ارائه شده است و میزان آن از ۱۳/۸ الی

### ۳-۵- جذب رطوبت

بر اساس نتایج آنالیز واریانس، آیتتحقیق نشان داد اثرات خطی متغیرها تأثیر معنی‌داری بر میانگین جذب رطوبت فیلم‌های کامپوزیت دارد ( $p < 0.05$ ) اما اثرات متقابل تأثیر معنی‌داری ندارند ( $p > 0.05$ ). صرف‌نظر از نوع فیلم لامینه یا کامپوزیت، میزان جذب رطوبت در فیلم‌های WPI خالص (۷.۱۶-۸.۶۳ درصد) کمتر از فیلم‌های کیتوزان خالص (۱۳.۵-۱۲.۴ درصد) بود. با افزایش کیتوزان و کاهش میزان پروتئین، میزان جذب رطوبت افزایش پیدا کرد (جدول ۲). نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج بدست آمده در فیلم‌های کیتوزان/ کنسانتره آب پنیر [۲۷] و WPI/ صمغ خرنوب [۳۲] مشابه بود. این نتایج با نتایج زاویه تماس که افزایش آبگریزی سطحی با افزایش میزان کیتوزان را نشان داد در تضاد بود. بنابراین تأثیر آب بر خصوصیات سطحی و داخلی فیلم متفاوت است. با افزایش میزان WPI، زمان خشک شدن فیلم افزایش پیدا می‌کند و فرصت بیشتری جهت ایجاد پیوندهای هیدروژنی و دی‌سولفیدی در ساختار فیلم وجود دارد، در نتیجه فیلم‌هایی که میزان WPI در آنها بیشتر است، فشرده‌تر بوده و میزان جذب آب در آنها کمتر می‌باشد [۱۴]. اما با افزایش میزان WPI، به دلیل دارا بودن گروه‌های جانبی آبدوست، نپذیری سطحی فیلم بیشتر می‌شود که نتایج زاویه تماس این را نشان داد.

### ۳-۶- حلالیت در آب

عدم حلالیت در آب یکی از ویژگی‌های مهم فیلم‌های خوراکی جهت کاربرد تجاری می‌باشد. حلالیت فیلم در آب می‌تواند میزان آزاد سازی ترکیبات موجود در فیلم‌های فعال زمانی که با سطح ماده غذایی تماس دارد را تعیین کند. مطابق آنالیز واریانس، مدل معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ )، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۳ و ۰/۸۸ بودند و شاخص عدم برازش معنی‌دار نبود. بر اساس آنالیز واریانس، اثرات متقابل درصد کیتوزان/WPI و نوع فیلم بر حلالیت فیلم‌ها تأثیر معنی‌دار دارد ( $p < 0.05$ ). درصد کیتوزان و WPI بیشترین تأثیر معنی‌داری بر میانگین حلالیت را نشان داد. آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که تغییرات میانگین حلالیت در نمونه‌های فیلم را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد:

$$\text{Solubility} = 31.83 \text{ WPI} + 27.83 \text{ CH} - 32.33 \text{ WPI} \times \text{CH} + 1.52 \text{ WPI} \times \text{Film type} - 1.10 \text{ CH} \times \text{Film type} - 9.01 \text{ WPI} \times \text{CH} \times \text{Film type}$$

شده به ترتیب ۰/۸۱ و ۰/۷۶ بودند و شاخص عدم برازش معنی دار نبود. در این رابطه اثرات خطی متغیرها و اثر متقابل نوع فیلم و درصد کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر میانگین تنش در نقطه شکست فیلم‌ها داشتند ( $p < 0.05$ ). با استفاده از مدل زیر می‌توان تغییرات میانگین تنش در فیلم‌ها را توصیف کرد:

$$\text{Stress} = 3.20 \text{ WPI} + 26.12 \text{ CH} - 12.01 \text{ CH} \times \text{Film type} - 86.20 \text{ WPI} \times \text{CH} \times \text{Film type} \text{ (WPI-CH)}$$

شکل ۳ و جدول ۳ تأثیر درصد کیتوزان و WPI را بر میزان تنش در نقطه شکست فیلم‌های دولایه و کامپوزیت نشان می‌دهند. مطابق نمودار A در شکل ۳، بیشترین میزان تنش مربوط به فیلم‌های تک پلیمری کیتوزان (۳۵-۳۷ MPa) و کمترین میزان آن مربوط به فیلم‌های تک پلیمری WPI (۲/۶۵ - ۱/۷۸ MPa) بود. با افزایش میزان کیتوزان در فیلم‌های کامپوزیت میزان تنش افزایش پیدا کرد. افزایش تنش در فیلم‌های کامپوزیت بیشتر از فیلم‌های دولایه بود. نتایج بدست آمده مشابه نتایج محققان دیگر بود [۱۴].

علت این امر ساختار با تراکم کمتر این فیلم‌ها در مقایسه با فیلم‌های خالص کیتوزان بود [۱۴]. در فیلم‌های دولایه، کیتوزان که بیوپلیمر سخت‌تری می‌باشد خواص مکانیکی را تعیین می‌کند. این امر به علت ساختار خطی‌تر کیتوزان و تشکیل پیوندهای بین رشته‌ای بیشتر در مقایسه با WPI مربوط می‌شود.

**Table 3** Mechanical properties (UTS: ultimate tensile strength; EM: elastic modulus; ETB: elongation to breake) of chitosan/WPI composite and laminated films.

Film type/ WPI%	UTS (MPa)	EM (MPa)	ETB (%)
laminated/0	20.71	3169.50	0.37
laminated/0	20.60	3559.97	0.42
laminated/25	31.96	2843.10	1.9
laminated/50	1.11	638.20	0.11
laminated/67	1.84	471.36	0.15
laminated/75	1.26	647.20	0.62
laminated/100	2.32	835.20	1.87
laminated/100	3.45	783.60	1.00
composite/0	37.31	2654.35	4.06
composite/0	35.20	4153.77	4.33
composite/25	29.10	1741.80	3.03
composite/50	26.64	1802.12	1.20
composite/67	21.22	4078.26	0.76
composite/75	19.82	10329.40	0.66
composite/100	1.78	583.90	1.78
composite/100	2.65	611.00	1.38

$g/m.s.Pa^{-1} \times 10^{-7} = 19/89$  متغیر بود. اختلاف معنی‌داری در میزان نفوذپذیری به بخار آب برای فیلم‌های تک پلیمری صرف‌نظر از نوع فیلم دولایه یا کامپوزیت مشاهده نشد. علت این امر ضخامت یکسان و برهمکنش بین مولکولی برابر در فیلم‌های همگنی‌باشد. به طور کلی فیلم‌های تک پلیمری WPI نسبت به فیلم‌های کیتوزان، نفوذپذیری به بخار آب پایین‌تری داشتند. آنالیز داده‌های آزمایش نشان داد که نفوذ پذیری به بخار آب فیلم‌های کامپوزیت را می‌توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$WVP \times 10^{-7} = 14.93 \text{ WPI} + 18.67 \text{ CH} + 5.16 \text{ WPI} \times \text{CH} - 10.32 \text{ WPI} \times \text{CH} \text{ (WPI-CH)}$$

مطابق نتایج، نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌های کامپوزیت، دارای مدل معنی‌دار ( $p < 0.05$ )، شاخص عدم برازش غیر معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) و ضریب تبیین ۰/۶۸ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۶ می‌باشد. اثر خطی درصد کیتوزان و WPI فیلم‌های کامپوزیت معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). برای فیلم‌های دولایه مدل معنی‌داری بدست نیامد. به استثنای فیلم کامپوزیت با ۷۵ درصد WPI، نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های دولایه پایین‌تر از فیلم‌های کامپوزیت بود. این نتایج نشان می‌دهد، تغییر ضخامت لایه کیتوزان و WPI، به طور معنی‌داری می‌تواند خواص نفوذپذیری به بخار آب فیلم را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند، فیلم‌های دولایه یکیتوزان/پلی اتیلن [۳۳]، کیتوزان/کلاژن [۳۴] و یا کیتوزان/ژلاتین [۲۸] خواص ممانعت‌کنندگی در برابر بخار آب بهتری نسبت به فیلم‌های کامپوزیت دارند. این نتایج با یافته‌های تحقیق فرییرا و همکاران [۱۴] در تضاد بود. آنها نشان دادند در همه فیلم‌های مرکب کیتوزان و کنسانتره پروتئین آب‌پنیر به استثنای فیلم با بالاترین نسبت پروتئین به کیتوزان با افزایش میزان پروتئین، نفوذپذیری به بخار آب کاهش پیدا می‌کند.

### ۳-۸- خواص مکانیکی

جدول ۳ خواص مکانیکی فیلم‌ها را نشان می‌دهد. استفاده از گلیسرول به عنوان نرم‌کننده برهمکنش بین زنجیره‌های پلیمری را کاهش داده و سبب تغییر مکان راحت‌تر زنجیره‌ها طی باز شدن می‌گردد. این امر توانایی فیلم برای تغییر شکل بدون پاره شدن را افزایش می‌دهد. مطابق آنالیز واریانس، متغیرهای طرح تنها بر تنش در نقطه شکست تأثیر معنی‌داری داشتند. مدل تنش کاملاً معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ) و ضرایب تبیین و تبیین اصلاح

روش‌های عددی محاسبه و عملکرد مطلوبیت کلی به عنوان میانگین هندسی پاسخ‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$D(\varepsilon) = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{1/n}$$

در این معادله  $D$  مطلوبیت کل،  $d$  مطلوبیت تک تک اهداف و  $n$  تعداد اهداف در نظر گرفته شده در بهینه سازی است. جداول ۴ و ۵ نتایج حاصل از تحلیل آماری که با توجه به پاسخ‌های آزمون‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های کامپوزیت و لامینه منجر به یافتن درصد بهینه WPI و کیتوزان شده است را نشان می‌دهند. بر اساس نتایج، شرایط بهینه برای تولید فیلم کامپوزیت شامل ۶۵/۱۵ درصد WPI و ۳۴/۸۵ درصد کیتوزان بود و مطلوبیت کلی ۶۰ درصد حاصل شد. برای فیلم‌لامینه نیز مقدار بهینه ۴۹/۰۱ درصد برای WPI و ۵۰/۹۹ درصد برای کیتوزان بدست آمد که مطلوبیت کلی آن برابر ۵۲ بود.

در مرحله بعدی، دو فیلم بهینه با نسبت‌های محاسبه شده برای فیلم دولایه و فیلم کامپوزیت تهیه شدند و خصوصیات فیزیکوشیمیایی اشاره شده، در مورد آنها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. همه آزمون‌ها بر روی نمونه‌های بهینه در سه تکرار انجام شدند. مقادیر پیش بینی شده و مقادیر اندازه گیری شده برای هر کدام از آزمون‌ها، در جدول ۴ و ۵ ذکر شده است. خصوصیات مورفولوژیکی و ساختاری نمونه‌های بهینه نیز با آزمون‌های دستگاهی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و همچنین نفوذپذیری نسبت به اکسیژن برای این فیلم‌ها اندازه‌گیری شد.

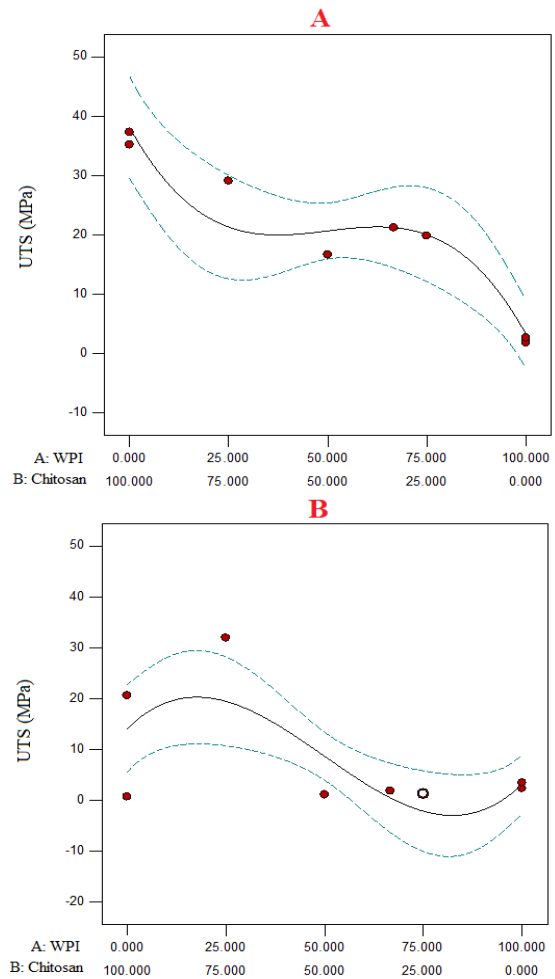


Fig 3 Ultimate tensile strength (UTS) of WPI/chitosan composite films (A) and laminated films (B)

### ۳-۹- بهینه سازی و مطلوبیت

در این مطالعه از روش عملکرد مطلوب برای بهینه سازی چند متغیر استفاده شد. عملکرد مطلوبیت برای پاسخ‌های جداگانه با

Table 4 Desirability functions, estimated and measured values obtained for optimum conditions of composite chitosan/WPI film.

Measured value	Desirability	Optimum estimated value	Goal	Factor
65	1	65.15	-	A: WPI
35	1	34.85	-	B: chitosan
22.43	0.55	24.45	Min	Solubility (%)
17.54	0.52	16.70	Min	WVP ( $\times 10^{-7}$ g/m.s.Pa)
2651.54	1	2214.61	Max	EM (MPa)
18.32	0.56	21.30	Max	UTS (MPa)
2.54	1	1.55	Max	ETB (%)
81.54	0.60	84.64	Max	L*
-4.32	1	-5.94	-	a*
21.19	0.53	25.04	Min	b*
13.76	1	9.40	Min	Moisture absorption (%)
45.32	0.50	47.83	Max	Contact angle (up layer)
44.87	1	49.11	Max	Contact angle (down layer)
	<b>0.60</b>			<b>Total desirability</b>

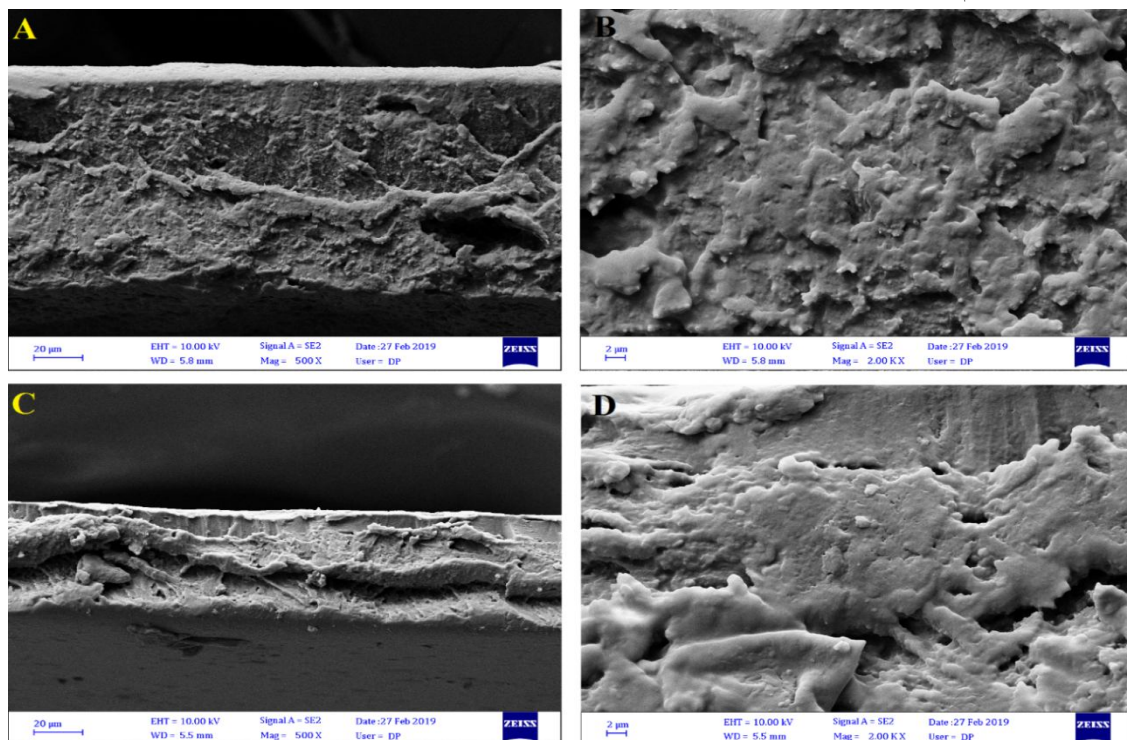
**Table 5** Desirability functions, estimated and measured values obtained for optimum conditions of laminated chitosan/WPI film.

Measured value	Desirability	Optimum estimated value	Goal	Factor
49	1	49.02	-	<b>A: WPI</b>
51	1	50.98	-	<b>B: chitosan</b>
25.11	0.81	19.95	Min	<b>Solubility (%)</b>
22.54	0.27	18.18	Min	<b>WVP (<math>\times 10^{-7}</math> g/m.s.Pa)</b>
2376.11	1	2482.40	Max	<b>EM (MPa)</b>
7.89	0.23	9.19	Max	<b>UTS (MPa)</b>
1.34	1	0.80	Max	<b>ETB (%)</b>
78.65	0.66	85.28	Max	<b>L*</b>
0.05	1	-6.40	-	<b>a*</b>
25.32	0.59	22.50	Min	<b>b*</b>
13.11	1	10.08	Min	<b>Moisture absorption (%)</b>
71.02	0.91	64.90	Max	<b>Contact angle (up layer)</b>
41.11	1	47.00	Max	<b>Contact angle (down layer)</b>
	<b>0.52</b>			<b>Total desirability</b>

مطالعه انجام شده توسط برخی محققان علت این امر می‌تواند به دلیل تغییر دما یا تغلیظ محلول فیلم طی خشک شدن سطح بین کیتوزان و WPI باشد [1]. به دلیل تغییر pH در طول خشک شدن، فیلم کامپوزیت ساختار متفاوت تری داشت (شکل ۵ A و B). زمانی که محلول فیلم از دو بیوپلیمر با بار مخالف ساخته می‌شود، کنترل تغییر pH جهت جلوگیری از رسوب بسیار مهم و بحرانی است. در این مطالعه اگرچه فیلم کامپوزیت ساختار ناهمگنی داشت اما هیچ عدم سازگاری بین دو بیوپلیمر مشاهده نشد.

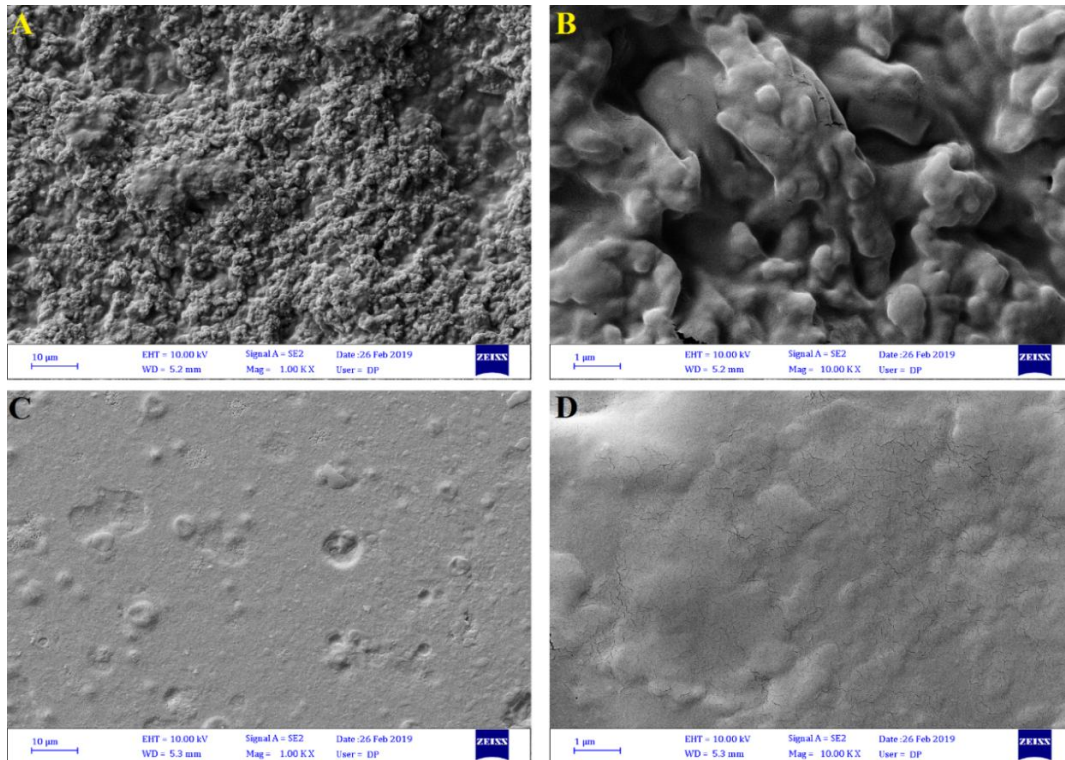
### ۳-۱۰- بررسی ریزساختار فیلم‌های بهینه

تصاویر FE-SEM از برش عرضی و سطح فیلم‌ها به ترتیب در شکل ۴ و ۵ نشان داده شده است. در برش عرضی فیلم دولایه، لایه مربوط به هر بیوپلیمر به طور جداگانه قابل تشخیص می‌باشد. اتصال و چسبندگی خوبی بین لایه کیتوزان و WPI مشاهده می‌شود (شکل ۵ C و D). بعد از خشک شدن، لایه WPI همگن‌تر از لایه کیتوزان بود. در بعضی از قسمت‌های لایه مرزی بین دو فیلم، کیتوزان با WPI مخلوط شده و تا حدودی ساختار منسجم و یکپارچه ایجاد کرده است. طبق



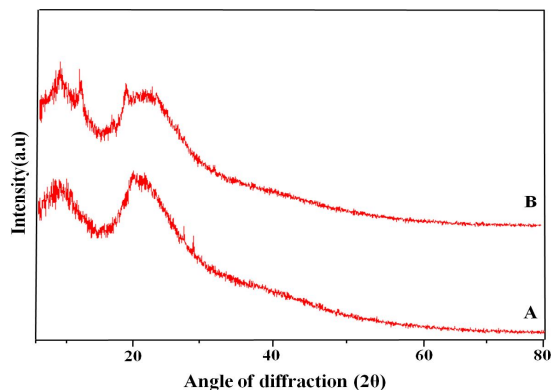
**Fig 4** FE-SEM images from cross-section of optimum chitosan/WPI composite (A and B) and laminated (C and D) films at two magnifications.

تصاویر سطح فیلم نشان داد در فیلم دولایه، سطحی که با هوا در تماس است (کیتوزان) تقریباً صاف و مسطح با کمی منافذ و ترک‌های ریز بود (شکل C6 و D). اما در سطح فیلم کامپوزیت ناهمواری‌هایی قابل مشاهده بود (شکل A6 و B). زمانی که WPI با کیتوزان مخلوط شد، حضور WPI سبب ناپیوستگی و بی‌نظمی گردید. این پدیده مطابق با کدورت فیلم است که قبلاً در خواص رنگی نیز توضیح داده شده است.



**Fig 5** FE-SEM images from surface of optimum chitosan/WPI composite (A and B) and laminated (C and D) films at two magnifications.

۱۳٫۹ درجه ظاهر شده است. این تغییرات می‌تواند مربوط به افزایش میزان کیتوزان در فیلم دو لایه باشد. اما به طور کلی، اختلاف معنی‌داری بین شدت پیک و خواص کریستالی فیلم‌ها در شکل دو لایه و کامپوزیت مشاهده نشد.



**Fig 6** XRD diffractograms of optimum chitosan/WPI composite (A) and laminated (B) films.

در طی خشک شدن، اسید استیک سریع‌تر از آب تبخیر می‌شود و pH تغییر می‌کند و این امر می‌تواند عدم سازگاری را باعث شود و ساختار ناهمگن را توجیه نماید. طبق مطالعه فرییرا و همکاران، زمانی که فیلم‌ها در  $pH > 6.5$  تهیه شدند ساختار غیرهمگنی داشتند و به دلیل تغییر ترمودینامیک، پدیده دو فاز شدن یا جدا شدن فاز کیتوزان و WPI مشاهده شد [۱۴].

### ۳-۱۱- آزمون پراش اشعه X (XRD)

در شکل ۶ الگوی XRD از فیلم کامپوزیت (A) و لامینه (B) کیتوزان و WPI نشان داده شده است. فیلم کامپوزیت دارای دو پیک پراش مجزا در  $2\theta$  ۱۰ درجه و  $23.5$  درجه بود. این‌ها پیک‌های شاخص فیلم WPI هستند و با در نظر گرفتن مقادیر بالاتر WPI در فرمول فیلم کامپوزیت، این مشاهدات قابل انتظار بود. بنابراین فیلم کامپوزیت کیتوزان و WPI را می‌توان به عنوان فیلم بیوپلیمر نیمه کریستالی به حساب آورد. الگوی مشابه برای XRD در فیلم WPI [۳۵] یا پودر خالص آن گزارش شده است [۳۷]. پیک اصلی XRD کیتوزان در  $2\theta$  برابر  $21.5$  درجه می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۶B نشان داده شده است، با افزایش میزان کیتوزان در فیلم دولایه، پیک بین  $20$  و  $24$  درجه گسترش یافته و همچنین پیک جدید در

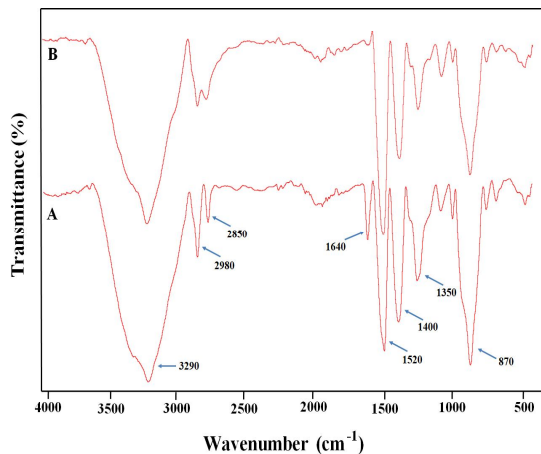


Fig 7 FTIR spectra of optimum chitosan/WPI composite (A) and laminated (B) films.

#### ۴- نتیجه گیری

در تحقیق حاضر فیلم مرکب کیتوزان / WPI حاوی اسانس زیره سبز و نانوفیبرکیتوزان تولید شد. ویژگی‌های فیلم‌های دولایه و کامپوزیت کیتوزان / WPI بررسی شد و همچنین تأثیر نسبت بیوپلیمرها نیز مورد مطالعه قرار گرفت. به طور کلی مخلوط کردن دو بیوپلیمر سبب بهبود خواص فیزیکوشیمیایی فیلم شد. بطور کلی، افزودن میزان کیتوزان، پارامتر زردی فیلم و استحکام مکانیکی را افزایش داد اما جذب رطوبت، نفوذپذیری به بخار آب و آبدوستی سطحی با افزایش میزان کیتوزان کاهش یافت. نوع فیلم نیز بر روی خواص تأثیرگذار بود و فیلم لامینه نسبت به فیلم کامپوزیت، خصوصیات باارندگی بهتری نشان داد. بهینه سازی شرایط تولید فیلم با روش سطح پاسخ به خوبی انجام گرفت و فیلم‌های بهینه لامینه (۴۹ درصد WPI و ۵۱ درصد کیتوزان) و کامپوزیت (۶۵ درصد WPI و ۳۵ درصد کیتوزان) از نظر خصوصیات ساختاری نیز بررسی شدند. مطابق نتایج، لامیناسیون WPI و کیتوزان فیلم مرکبی با خصوصیات فیزیکی و خواص ساختاری بهتر در مقایسه با فیلم کامپوزیت تولید می‌کند. در ادامه این پژوهش، تأثیر نوع فیلم بر روی خصوصیات عملکردی (آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی) و همچنین کنترل رهایش اسانس از ماتریس فیلم نیز مورد بررسی قرار خواهد گرفت و نتایج آن گزارش خواهد شد. فیلم‌های تولید شده، می‌توانند برای بسته بندی انواع مختلف مواد غذایی مورد استفاده قرار بگیرند و قابلیت استفاده‌ی آنها در عمل نیز بطور دقیق‌تر بررسی شود.

#### ۳-۱۲- آزمون FTIR

طیف FTIR فیلم کامپوزیت (A) و لامینه (B) در شکل ۷ نشان داده شده است. پیک اصلی جذب کیتوزان و WPI در هر دو فیلم قابل مشاهده است. فیلم کامپوزیت چندین پیک جذب مشخص از خود نشان داد که شامل موارد ذیل می‌باشد:

(۱) یک پیک تیز در  $870 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به باند جذبی گلیسرول؛ (۲) پیک‌هایی که از  $900$  الی  $1350 \text{ cm}^{-1}$  متغیرند و مربوط به باندهای N-H و باندهای کششی (آمید نوع III) C-N در ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشند، (۳) پیک‌هایی که از  $1400$  الی  $1520 \text{ cm}^{-1}$  حضور دارند و مربوط به باندهای گروه‌های N-H (آمید نوع II) در ایزوله پروتئین آب پنیر هستند، (۴) پیک در  $1640 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به لرزش پیوندهای گروه‌های C=N و C=O (آمید نوع I) در ایزوله پروتئین آب پنیر (۵) پیک‌های  $2850$  الی  $2980 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به باندهای کششی گروه‌های C-H (۶) محدوده پیک گسترده از  $3000$  تا  $3600 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های آزاد O-H کیتوزان و گروه‌های N-H در ساختار WPI [۳۶]. طیف FTIR فیلم لامینه تقریباً مشابه با فیلم کامپوزیت بود. با این وجود، کمی اختلاف بین طیف‌ها مشاهده می‌شود. اختلاف عمده در همپوشانی دو پیک در محدوده  $2850$  الی  $2980 \text{ cm}^{-1}$  به پیوند کششی C-H اختصاص دارد. علاوه بر این، پیک در  $1640 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه‌های C=N و C=O در فیلم‌های دو لایه مشاهده نشد. اختلاف سوم در تغییر شدت پیک در  $900$  الی  $1350 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به باندهای N-H و C-N در WPI می‌باشد. اولین دلیل برای این اختلافات تغییر در نسبت بیوپلیمرها می‌باشد. میزان کیتوزان در فیلم دو لایه بالاتر از میزان آن در فیلم کامپوزیت می‌باشد. این تغییر در نسبت بین کیتوزان و WPI می‌تواند مکان یا شدت جذب پیک‌های طیف FTIR را تغییر دهد. دلیل دوم واکنش شیمیایی بین بیوپلیمرها می‌باشد که در فیلم کامپوزیت بیشتر از فیلم لامینه است. بنابراین مخلوط کردن بیوپلیمرها در فیلم کامپوزیت سبب افزایش برهمکنش در این نوع فیلم می‌شود اما در فیلم دو لایه به دلیل تماس کمتر بین دو بیوپلیمر این برهمکنش‌ها کمتر می‌باشد.

## ۵- منابع

- [9] Tongfei, W., Farnood, R., O'Kelly, K., Chen, B. (2014). Mechanical behavior of transparent nanofibrillar cellulose-chitosan nanocomposite films in dry and wet conditions. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 32, 279-286.
- [10] Krishnan, S. K., Prokhorov, E., Iturriaga, M. H., Morales, M., Vázquez-Lepe, M., Kovalenko, Y., Sanchez, I., Luna-Bárceñas, G. (2015). Chitosan/silver nanocomposites: Synergistic antibacterial action of silver nanoparticles and silver ions. *European Polymer Journal*, 67, 242-251.
- [11] Youssef, A.M., Abou-Yousef, H., El-Sayed, S. M., Kamel, S. (2015). Mechanical and antibacterial properties of novel high performance chitosan/nanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 25-32.
- [12] Azeez, A.A., Rhee, K.Y., Park, S.J., Kim, H.J., Jung, D.H. (2013). Application of cryomilling to enhance material properties of carbon nanotube reinforced chitosan nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 50, 127-134.
- [13] Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- [14] Ferreira, C., Nunes, C., Delgado, I., Lopes-da-Silva, J.A. (2009). Characterization of chitosan-whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813.
- [15] Pereda, M., Aranguren, M., Marcovich, N. (2008). Characterization of chitosan/caseinate films. *Journal Of Applied Polymer Science*, 107(2), 1080-1090.
- [16] Sharafati Chaleshtori, F., Taghizade, M., Rafieian-Kopaei, M., Sharafati-Chaleshtori, R. (2016). Effect of chitosan incorporated with cumin and eucalyptus essential oils as antimicrobial agents on fresh chicken meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40, 396-404.
- [17] Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A., Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21(2), 185-192.
- [18] Arrieta, M.P., Peltzer, M., López, J., Carmen Garrigós, M., Valente, A., Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium
- [1] Jafari, H., Pirouzifard, M., Khaledabad, MA., Almasi, H. (2016). Effect of chitin nanofiber on the morphological and physical properties of chitosan/silver nanoparticle bionanocomposite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 461-466.
- [2] Ramos, Ó., Santos, A., Leão, M., Pereira, J., Baptista da Silva, S., Fernandes, J., Franco, M., Pintado, M., & Malcata, F. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*, 25(2), 132-141.
- [3] Jahed, E., Khaledabad, M. A., Almasi, H., Hasanzadeh, R. (2017). Physicochemical properties of Carum copticum essential oil loaded chitosan films containing organic nanoreinforcements. *Carbohydrate Polymers*, 164, 325-338.
- [4] Jahed, E., Khaledabad, M. A., Bari, M., Almasi, H. (2017). Effect of cellulose and lignocellulose nanofibers on the properties of *Origanum vulgare* ssp. *gracile* essential oil-loaded chitosan films. *Reactive and Functional Polymers*, 117, 70-80.
- [5] Pandey S, P.M., Mishra A, Jha B. (2015). Physio-biochemical composition and untargeted metabolomics of cumin (*Cuminum cyminum* L.) make it promising functional food and help in mitigating salinity stress. *Plos One*, 10(12), 31-39.
- [6] Saeed, Y., Dadashi, M., Eslami, G., Goudarzi, H., Taheri, S., Fallah, F. (2016). Evaluation of antimicrobial activity of cuminum cyminum essential oil and extract against bacterial strains isolated from patients with symptomatic urinary tract infection. *Novelty in Biomedicine*, 4(4), 147-152.
- [7] Hassanien, M.F.R., Mahgoub, S.A., El-Zahar, K.M. (2014). Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(3), 280-288.
- [8] Ghanbarzadeh, B., Oleyaei, S.A., Almasi, H. (2015). Nanostructured materials utilized in biopolymer-based plastics for food packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(12), 1699-1723.

- [29] Cheng, M., Smith, B. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*,24(17), 2871-80.
- [30] Silva, S.S., Goodfellow, B.J., Benesch, J., Rocha, J., Mano, J.F., Reis, R.L. (2007). Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*,70(1), 25-31.
- [31] Białopiotrowicz, T., Jańczuk, B. (2002). Surface Properties of Gelatin Films. *Langmuir*, 18(24), 9462-9468.
- [32] Osés, J., Fabregat-Vázquez, M., Pedroza-Islas, R., Tomás, S., Cruz-Orea, A., Maté, J.I. (2009). Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 56-62.
- [33] Kurek, M., Brachais, C.H., Nguimjeu, C.M., Bonnotte, A., Voilley, A., Galić, K., Couvercelle, J.P., Debeaufort, F. (2012). Structure and thermal properties of a chitosan coated polyethylene bilayer film. *Polymer Degradation and Stability*, 97(8), 1232-1240.
- [34] Krkić, N., Lazić, V., Petrović, L., Gvozdrenović, J., Pejić Krkić, D. (2012). The Properties of Chitosan-Laminated Collagen Film. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 312-319.
- [35] Aziz, S., Almasi, H. (2018). Physical Characteristics, Release Properties, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Whey Protein Isolate Films Incorporated with Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Extract-Loaded Nanoliposomes. *Food and Bioprocess Technology*, 11(9), 425-436.
- [36] Ramos, Ó.L., Rainas, I., Silva, S., Fernandes, J.C., Cerqueira, M., Pereira, R.N., Vicentec, A., Fátima, M., Pintado, M.E., Xavier Malcata, F. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 110-122.
- [37] Hosseinnia, M., Khaledabad, M.A., Almasi, H. (2017). Optimization of *Ziziphora clinopodiodes* essential oil microencapsulation by whey protein isolate and pectin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 958-966.
- and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*,121, 94-101.
- [19] Rao, M.S., Kanatt, S.R., Chawla, S.P., Sharma, A. (2010). Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. *Carbohydrate Polymers*,82(4), 1243-1247.
- [20] ASTM, Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, in method D 882-95. 1995, American Society for Testing and Materials :Philadelphia.
- [21] Karbowiak, T., Debeaufort, F., Champion, D., Voilley, A. (2006). Wetting properties at the surface of iota-carrageenan-based edible films. *Journal of Colloid and Interface Science*,294(2), 400-410.
- [22] ASTM E96 / E96M-16, Standard test methods for water vapor transmission of materials, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016, www.astm.org.
- [23] ISO 15105-1:2007 Plastics — Film and sheeting — Determination of gas-transmission rate — Part 1: Differential-pressure methods.
- [24] Kokoszka, S., Debeaufortbc, F., jLenart, A., Voilley, A. (2010). Water vapour permeability, thermal and wetting properties of whey protein isolate based edible films. *International Dairy Journal*, 20(1), 53-60.
- [25] Anker, M., Stading, M., Hermansson, A.N. (2000). Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey protein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3806-3816.
- [26] Pe´rez-Gago, M.B., Krochta, J. M.(1999). Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. *Journal of Food Science*, 64(4), 695-698.
- [27] Kurek, M., Galus, S., Debeaufort, F. (2014). Surface ,mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*,1(1), 56-67.
- [28] Rivero, S., García, M.A., Pinotti, A. (2009). Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*,90, 531-539.





## Investigating the effect of film preparation method (composite or laminated) and biopolymers' proportion on the physicochemical properties of active chitosan-whey protein isolate film by response surface method (RSM)

Hosseinzadeh, Kh.<sup>1</sup>, Khosrowshahi Asl, A.<sup>2</sup>, Alizadeh Khaledabad, M.<sup>2</sup>, Almasi, H.<sup>3\*</sup>

1. PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University

2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University

3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2020/ 10/ 22  
Accepted 2020/ 12/ 12

#### Keywords:

Biodegradable film,  
Composite,  
Lamination,  
Microstructure,  
Mechanical properties,  
Optimization.

DOI: 10.52547/fsc.t.18.04.05

\*Corresponding Author E-Mail:  
[h.almasi@urmia.ac.ir](mailto:h.almasi@urmia.ac.ir)

The aim of this research was to investigate the feasibility of composite and laminated chitosan (CH) and whey protein isolate (WPI) film preparation which was containing cumin essential oil and chitosan nanofiber. Production of composite film was possible by decreasing WPI pH to below its isoelectric pH. Double-layer was also prepared by pouring WPI solution on dried CH film. amount of active agent and nanofiller was fixed (125 mg/100ml) and only the effect of CH/WPI ration and film type (laminated or composite) on the properties of films was studied by RSM analytical method. The color, water contact angle, moisture absorption, solubility, water vapor permeability and mechanical properties of films were determined. By using desirability function and according to the results, optimum formulation of composite film (65.14% WPI and 34.85% CH) and laminated film (49.01% WPI and 50.99% CH) was achieved. Microstructure of optimized films was analyzed by FTIR, FE-SEM and XRD tests. Results of FE-SEM indicated a heterogeneous structure in composite film but without any phase separation. Also, at the laminated film good attachment between two layers of CH and WPI was observed. Semi-crystalline structure of composite film was approved by XRD analysis and there was no detectable difference between peak intensity and crystalline structure of composite and laminated film. there was a slight difference in the FTIR spectra of composite and laminated films. According to the results, the characteristics of composite film in comparison to laminated film had better accordance with the used prediction model. But the laminated film exhibited better morphological characteristics and could be suggested for preservation of different foods due to its high potential for use in food packaging.