

بهینه سازی ویژگیهای فیزیکی، بازدارندگی و آنتی اکسیدانی فیلم بیونانو کامپوزیت کفیران - نانورس حاوی آلفاتوکوفرول با استفاده از روش سطح پاسخ

ستاره عطالو^۱، محمد عزیزاده خالد آباد^{۲*}، هادی الماسی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۱۴ تا تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۲)

چکیده

در این پژوهش، فیلم بیونانو کامپوزیت فعال کفیران حاوی نانورس و آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول تولید شد و تأثیر میزان کفیران (۳/۵، ۴/۲۵، ۵/۷۵ و ۶/۵ گرم)، مقدار نانورس (۰، ۱/۷۵، ۳/۵، ۵/۲۵ و ۷ درصد وزن کفیران) و غلظت آلفاتوکوفرول (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) بر خواص بازدارندگی، مکانیکی و رنگی و همچنین تأثیر خواص آنتی اکسیدانی فیلم در افزایش پایداری اکسیداتیو روغن سویا با استفاده از روش سطح پاسخ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حلالیت در آب و نفوذپذیری نسبت به بخار آب با افزایش میزان کفیران افزایش یافته و با بیشتر شدن میزان نانورس کمتر می شود. همچنین استحکام کششی و مدول یانگ فیلم ها با افزودن نانورس بیشتر شد اما آلفاتوکوفرول تأثیری بر روی خواص مکانیکی نداشت. اختلاف رنگ کلی و اندیس زردی فیلم ها نیز با افزایش میزان نانورس و آلفاتوکوفرول بیشتر شد. فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم ها با افزایش زمان نگهداری در داخل روغن کمتر شد اما افزایش میزان نانورس و آلفاتوکوفرول باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی شد. همچنین نانورس با کنترل رهائش آنتی اکسیدان باعث افزایش عدد پراکسید روغن سویا شد. برای بهینه سازی، از روش عددی تابع مطلوبیت استفاده شد. فیلم بهینه با مقادیر ۶/۲ گرم کفیران، ۲/۶۴٪ نانورس و ۲۰۰ ppm آلفاتوکوفرول بدست آمد و بهترین زمان نگهداری فیلم داخل روغن تا ۳۱/۸۱ روز بود. در این شرایط، بهینه سازی با درجه مطلوبیت ۶۰٪ حاصل شد.

کلید واژگان: کفیران، آلفاتوکوفرول، خواص فیزیکی، فعالیت آنتی اکسیدانی، بهینه سازی

* مسئول مکاتبات: m.alizadeh@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

سالانه بیش از ۲۰۰ میلیون تن پلاستیک از مواد پلیمری و مشتقات نفتی تولید می شود که بخش اعظم آن نیز در بسته بندی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد. کاهش منابع نفتی و افزایش آلودگی های زیست محیطی در نتیجه تولید و مصرف مواد پلاستیکی، صنعت بسته بندی را تشویق به تولید مواد بسته بندی از ترکیبات زیست تخریب پذیر نموده است. برای تولید فیلم های زیست تخریب پذیر^۱، از پلی ساکاریدها، پروتئین ها، چربی ها و یا مخلوطی از آنها استفاده می شود [۱].

یکی از بیوپلیمرهای زیست تخریب پذیر طبیعی که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است، کفیران^۲ است. کفیران، اگزوپلی ساکارید حاصل از تخمیر دانه های کفیر است. کفیران پلی ساکاریدی طبیعی است و خصوصیات عملکردی باکتریواستاتیکی و ضد قارچی دارد و همچنین تجزیه پذیر، غیرسمی و دارای سازگاری زیستی است [۲]. از نظر ساختمانی، کفیران هگزایا هپتاساکارید منشعب و محلول در آب است که از واحدهای D-گلوکز و D-گالاکتوز با اتصالات ۱-۳ و ۱-۴ تشکیل شده است و دارای اتصال جانبی با گالاکتوز است [۳]. کفیران قابلیت تولید ژل شفاف با خصوصیات ویسکوالاستیک خیلی خوب در دمای پایین دارد [۴]. استفاده از کفیران در کاربردهای پزشکی بسیار گسترده است. اما در طی سالهای اخیر، مطالعاتی بر روی تولید فیلم های زیست تخریب از این پلی ساکارید نیز صورت گرفته است [۵-۹].

با این وجود، کفیران به دلیل دارا بودن برخی معایب نمی تواند به تنهایی فیلم مطلوبی تولید کند. فیلم تهیه شده از کفیران، استحکام مکانیکی ضعیفی دارد و بازدارندگی آن در برابر عبور رطوبت کم است. برای رفع این معایب، راههای گوناگونی پیشنهاد شده است که یکی از آنها استفاده از نانوتقویت کننده ها^۳ و تولید پلیمرهای نانوکامپوزیت^۴ می باشد. بهبود استحکام مکانیکی، افزایش بازدارندگی در برابر نفوذ گازها و بخار آب، افزایش کارایی فیلم در استفاده به عنوان بسته بندی فعال، افزایش مقاومت حرارتی ماده بسته بندی و ایجاد شفافیت و بهبود خواص ظاهری فیلم از جمله مزایای نانوکامپوزیت های بیوپلیمری می باشد [۱۰]. از انواع

مختلفی از ترکیبات نانوساختار برای تقویت خواص بیوپلیمرها استفاده شده است. یکی از مهمترین انواع نانوتقویت کننده ها، نانورس یا سیلیکات های لایه ای است. مونت موریلونیت^۵ (MMT) رایج ترین سیلیکات لایه ای است که به دلیل قیمت مناسب، دسترسی راحت و سازگاری با محیط زیست، در تولید نانوکامپوزیت ها مورد استفاده قرار می گیرد. سدیم مونت موریلونیت یا مونت موریلونیت اصلاح نشده، سازگارترین نوع نانورس با بیوپلیمرهای آبدوست نظیر کفیران به حساب می آید. تأثیر نانورس بر بهبود خواص فیزیکی انواع مختلف فیلمهای زیست تخریب پذیر به اثبات رسیده است [۱۱].

یکی از مزایای بیوپلیمرهای زیست تخریب پذیر، قابلیت استفاده از آنها در تولید بسته بندیهای فعال می باشد. بسته بندی های فعال بسته بندی هایی هستند که در طول زمان نگهداری محصول، فعال بوده و با توجه به وضعیت محصول موجود در بسته، با ایجاد تغییرات و با وارد کردن یا حذف موادی از فضای بسته، موجب حفظ یا بهبود کیفیت و افزایش عمر ماندگاری محصول می شوند [۱۲]. فیلم های ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی، جاذب های اکسیژن و اتانول از جمله مهمترین انواع بسته بندی های فعال مورد استفاده در صنایع غذایی محسوب می شوند. یک روش جایگزین برای کاهش میزان استفاده از آنتی اکسیدان ها در فرمولاسیون محصولاتی مانند روغن های خوراکی، تهیه بسته بندی های فعال آنتی اکسیدانی^۶ می باشد. در طی سالهای اخیر، فیلم های زیست تخریب پذیر فعال آنتی اکسیدانی مختلف حاوی انواع آنتی اکسیدان های طبیعی و سنتزی طراحی شده و تأثیر آنها بر روی افزایش پایداری اکسیداتیو محصولات غذایی مختلف به اثبات رسیده است [۱۳-۱۵].

دسته ای از آنتی اکسیدان های طبیعی که دارای ارزش غذایی بالایی نیز می باشند، توکوفرول ها یا ویتامین E هستند. آلفاتوکوفرول^۷ یکی از انواع توکوفرول هاست که از قدرت بالایی در مهار رادیکال های آزاد برخوردار است و خاصیت ویتامینی بالایی نیز دارد. توکوفرول ها بصورت طبیعی در روغن های گیاهی مختلف نظیر روغن جوانه ذرت، آفتابگردان و سویا یافت می شوند اما بخش اعظم آنها در طی تصفیه روغن های خوراکی حذف می شوند. تأثیر آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول در افزایش

1. Biodegradable films
2. Kefiran
3. Nanoreinforcements
4. Nanocomposite polymers

5. Montmorillonite
6. Antioxidant active packaging
7. Alpha-Tocopherol

اتانول ۹۹/۵٪ سرد، ته‌نشین شده و در دمای °C ۲۰- به مدت یک شب نگهداری شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در °C ۴ در $10000 \times g$ سانتریفوژ شد و رسوب جدا شد. مرحله تولید رسوب، دوبار تکرار گردید. رسوب حاصل که شامل پلی ساکارید کفیران بود، تا زمان استفاده در فریزر با دمای °C ۱۸- نگهداری شد.

۲-۳- طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، تأثیر چهار فاکتور مقدار کفیران (۳/۵، ۴/۲۵، ۵/۷۵ و ۶/۷۵ گرم)، مقدار نانورس (۰، ۱/۷۵، ۳/۵، ۵/۲۵ و ۷ درصد وزن کفیران)، میزان آلفاتوکوفرول (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ppm) و زمان نگهداری روغن (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) در قالب طرح فاکتوریل دو سطحی مورد مطالعه قرار گرفت. برای برآورد عدم تطابق و تکرارپذیری ۶ نقطه‌ی مرکزی در طرح گنجانده شد. به منظور معنی‌دار بودن فاکتورها و اثرات متقابل آنها از روش ANOVA^{۱۰} و توزیع فیشر استفاده شد و سطح معنی‌دار $\alpha = 0.05$ در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها و رسم نمودار از نرم‌افزار SAS^{۱۱} نسخه ۹ استفاده شد. برای مطالعه تأثیر چهار فاکتور از طرح RSM استفاده شد و از آنالیز واریانس و آنالیز رگرسیون برای داوری در مورد کفایت مدل خطی استفاده شد. سطح خطای نوع I در این مطالعه برابر با 0.05 بود. پس از مدلسازی پاسخ‌ها بعنوان تابعی از متغیرهای مستقل، مدل‌های مناسب (دارای R^2 ، P) بمنظور یافتن شرایط بهینه مورد استفاده قرار گرفتند. برای بهینه‌سازی از روش عددی تابع مطلوبیت^{۱۲} استفاده گردید. جدول ۱ طرح آماری و سطوح فاکتورهای مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

۲-۴- تولید فیلم بیونانو کامپوزیت فعال کفیران

ابتدا مقدار وزنی مشخصی از کفیران مطابق طرح آماری، در ml ۵۰ آب مقطر همراه با هم زدن مداوم بمدت یک ساعت در دمای °C ۸۰ حرارت داده شد و زمانی‌که محلول کاملاً همگنی بدست آمد، گلیسرول (۳۵٪ وزنی کفیران) بعنوان پلاستی‌سایزر افزوده شد و در حرارت °C ۷۰ بمدت ۱۵ دقیقه هم‌زده شد. هم‌زمان نانورس با درصد‌های مشخص نسبت به وزن کفیران در ml ۵۰ آب مقطر پخش شده و بمدت ۱۵ دقیقه داخل حمام آبی اولتراسوند (AS ONE مدل USD 4R ساخت کره) قرار

پایداری اکسیداتیو روغن های خوراکی مختلف به اثبات رسیده است [۱۶].

با وجود اثبات تأثیر مطلوب نانورس در بهبود خواص بیوپلیمرها، تأثیر آن بر روی خواص فیلم حاصل از کفیران مورد مطالعه قرار نگرفته است. همچنین تاکنون مطالعه ای در زمینه تولید بسته بندی فعال آنتی اکسیدانی از این بیوپلیمر گزارش نشده است. بنابراین هدف این پژوهش، تولید فیلم نانوکامپوزیت فعال آنتی اکسیدانی از کفیران است که در آن از نانورس به عنوان تقویت کننده و از آلفاتوکوفرول به عنوان ترکیب آنتی اکسیدانی فعال استفاده شده است. تأثیر غلظت کفیران و میزان نانورس و آلفاتوکوفرول بر ویژگی های فیزیکی و بازدارندگی فیلم نانوکامپوزیت فعال مورد بررسی قرار گرفته و همچنین خواص آنتی اکسیدانی فیلم با تأثیر آن در افزایش پایداری اکسیداتیو روغن سویا نیز مطالعه شده و برای دستیابی به شرایط بهینه از روش سطح پاسخ^۸ (RSM) استفاده شده است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

دانه‌های کفیر از یک عطاری در اصفهان خریداری شد و نانورس از شرکت پیشگامان نانومواد (ایران) خریداری شد. مهم‌ترین مشخصات فیزیکی سدیم مونت موریلونیت عبارتند از: درجه خلوص: ۹۸-۹۶٪، اندازه صفحات: ۲۰-۱۰ nm و فاصله بین صفحات: ۲nm-۱. آلفاتوکوفرول با درجه خلوص ۹۵/۵ و همچنین کلبه ترکیبات شیمیایی لازم برای انجام آزمون‌های فیزیکی مختلف همگی از شرکت Sigma-Aldrich (آلمان) خریداری گردید.

۲-۲- استخراج کفیران

برای استخراج کفیران از دانه های کفیر از روش Zolfi و همکاران [۱۷] استفاده شد. مقدار مشخصی از دانه‌های کفیر در آب جوش با نسبت (۳:۱) به مدت یک ساعت با هم‌زدن‌های غیرمداوم مخلوط شدند. مخلوط حاصل، در $10000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه در °C ۲۰ سانتریفوژ (Universal320) شد. پلی‌ساکارید موجود در ماده شناور رویی با افزودن دو حجم

10. Analysis of variance
11. Statistical analysis system
12. Desirability Function

8. Response surface method
9. Gallery space

و در دمای محیط ۱۰ دقیقه هم زده شد. محلول نهایی فیلم به پلیت شیشه‌ای با قطر ۸ سانتی‌متر منتقل شده و برای حذف حباب‌های هوا، یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس به آون 50°C منتقل شده و پس از خشک شدن، فیلم کفیران از سطح پلیت‌ها جدا شد. تمام نمونه‌ها قبل از انجام آزمون، در رطوبت نسبی ۵۵٪ به مدت ۲۴ ساعت واجد شرایط شدند.

گرفته و در فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۱۰۰ وات تیمار شد. زمانی که محلول نانورس تحت امواج اولتراسوند قرار می‌گیرد، فاصله لایه‌ها از هم افزایش یافته و بنابراین امکان نفوذ زنجیرهای بیوپلیمر در فضای بین این لایه‌ها بیشتر می‌شود [۱۸]. محلول نانورس بتدریج به محلول کفیران - گلیسرول افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد. بعد از کاهش دمای محلول تا دمای محیط، آلفاتوکوفرول در غلظت‌های مشخص به‌آرامی افزوده شد.

Table 1 Statistical design used to evaluate the effects of processing factors on fabrication of kefiran films.

Run	Factor 1 A:kefiran (gr)	Factor 2 B:Time (days)	Factor 3 C:clay (%)	Factor 4 D:alphatocopherol (ppm)
1	4.25	15	1.75	150
2	5	0	3.5	100
3	5	15	1.75	150
4	5	30	3.5	200
5	5.75	45	5.25	50
6	5.75	15	1.75	50
7	5	60	3.5	100
8	3.5	30	3.5	100
9	4.25	15	1.75	150
10	5	45	1.75	50
11	5	30	7	100
12	5.75	45	1.75	150
13	5.75	45	5.25	150
14	4.25	45	5.25	50
15	3.5	30	3.5	100
16	4.25	45	5.25	50
17	4.25	15	5.25	150
18	3.5	30	3.5	100
19	5	45	5.25	150
20	6.5	30	3.5	100
21	5	30	0	100
22	5	45	1.75	150
23	5	15	5.25	150
24	5	30	3.5	0
25	5	45	5.25	50
26	4.25	45	1.75	50
27	5.75	15	5.25	150
28	4.25	45	1.75	150
29	4.25	15	5.25	50
30	5	15	1.75	50

۲-۵- آزمون های فیزیکی

۲-۵-۱- میزان حلالیت در آب (WS)

نمونه‌های فیلم در ابعاد $2 \times 2 \text{ cm}^2$ تهیه شد و برای رسیدن به وزن خشک اولیه، به مدت ۶ ساعت در آن 110°C قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از توزین (W_1) در داخل ظروف دربدار حاوی 50 ml آب مقطر غوطه‌ور شدند. ظروف درحالیکه به صورت مقطعی همزده می‌شدند، در دمای 25°C به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفتند. سپس فیلم‌ها از داخل آب خارج و دوباره به مدت ۶ ساعت در آن 110°C قرار گرفتند تا به وزن ثابت برسند. با توزین دوباره نمونه‌ها، وزن خشک نهایی (W_2) به دست آمد. درصد حلالیت در آب از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۹]:

(۱)

$$\%WS = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

۲-۵-۲- اندازه‌گیری نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP)

اندازه‌گیری انتقال بخار آب از فیلم های کفیران به صورت وزن سنجی با استفاده از روش استاندارد ASTM E96 [۲۰] با اصلاحات جزئی انجام گرفت. نمونه فیلم روی درپوش ویال شیشه ای (به قطر 2 cm و ارتفاع 5 cm) دارای منفذی به قطر 7 mm قرار داده شد. داخل ویال 3 g سولفات کلسیم قرار داده شد و درپوش آن بسته شد. ویالها بعد از توزین، درون دسیکاتور حاوی پتاسیم سولفات ($RH = 97\%$) در دمای 25°C قرار داده شدند. وزن ویالها هر ۳ ساعت یکبار بمدت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. منحنی تغییر وزن ویالها با گذشت زمان رسم شد و شیب خط با رگرسیون خطی محاسبه گردید. نرخ انتقال بخار آب (WVTR) از تقسیم شیب قسمت خطی منحنی بر مساحت منفذ درپوش ویال محاسبه شد. سپس WVP فیلم با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \times L \quad (2)$$

L: ضخامت فیلم (m); P: فشار بخار آب خالص در 25°C ($3/169 \text{ KPa}$); R_1 : رطوبت نسبی در دسیکاتور (۹۷٪) و R_2 : رطوبت نسبی در داخل ویال (٪) است.

۲-۵-۳- اندازه گیری خواص مکانیکی

استحکام کششی نهایی^{۱۳} (UTS) کرنش تا نقطه شکست^{۱۴} (STB) و مدول ینگ (YM) فیلم‌ها با استفاده از دستگاه آزمون مکانیکی مدل Zwick/Roell FR010 (ساخت کشور آلمان) و طبق استاندارد ASTM D882-10 [۲۱] اندازه گیری شد. فیلم‌ها به شکل دمبلی با ابعاد $8 \times 0/5 \text{ cm}^2$ بریده شده و در بین دو فک دستگاه قرار گرفتند. فاصله اولیه بین دو فک و سرعت حرکت فک بالایی به ترتیب 50 mm و 5 mm/min تعیین شدند و داده‌ها توسط یک رایانه ثبت گردید.

۲-۵-۴- اندازه‌گیری خواص رنگی

رنگ نمونه‌ها توسط دستگاه رنگ سنج هانتربل^{۱۵}، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان رنگ، با استفاده از پارامترهای هانتربل بر حسب روشنایی (L^*)، سرخی-سبزی (a^*) و زردی-آبی (b^*) محاسبه و از روی آنها اختلاف رنگ کلی (ΔE) و اندیس زردی (YI) برای فیلم‌ها محاسبه شد [۱۸]:

(۳)

$$\Delta E = \left[(L_s - L)^2 + (a_s - a)^2 + (b_s - b)^2 \right]^{0.5} \quad (4)$$

$$YI = \frac{142.86b}{L}$$

L_s و a_s و b_s مولفه های صفحه استاندارد مورد استفاده و L و a و b مقادیر نمونه‌ها هستند.

13. Ultimate tensile strength

14. Strain to break

15. Hunterlab colorimeter

مهارکنندگی فعالیت رادیکال آزاد DPPH با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

(۵)

$$DPPH \text{ scavenging activity } (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 : جذب محلول DPPH شاهد و A_1 : جذب محلول نمونه فیلم است.

۲-۶-۳- اندازه‌گیری عدد پراکسید (PV)

PV نمونه‌های روغن طبق روش استاندارد AOAC [۲۳] و براساس اندازه‌گیری میزان ید تولید شده در اثر واکنش با پراکسیدها محاسبه گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- حلالیت در آب

مطابق شکل ۱، برهم‌کنش‌های نانورس و کفیران از نظر آماری ($P < 0.05$) تأثیر معنی‌داری بر میزان حلالیت فیلم‌های کفیران داشت. با افزایش مقدار کفیران از ۳/۵ تا ۶/۵ گرم، حلالیت در آب فیلم‌های با حد بالای نانورس با شیب ملایمی کاهش یافت. در مورد تأثیر نانورس بر حلالیت فیلم‌های آلژینات [۲۴]، متیل سلولز [۲۵]، کیتوزان [۲۶] و آگار [۲۷] نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. کاهش حلالیت در آب در حضور نانورس، به پخش لایه‌های نانورس در بستر فیلم و ایجاد مانع از نفوذ آب و همچنین اتصالات هیدروژنی بین لایه‌های نانورس و رشته‌های بیوپلیمر مربوط می‌شود که با افزایش یکپارچگی ماتریکس بیوپلیمر باعث کاهش انحلال مولکول‌های آن در آب می‌شود [۱۸]. در مورد تأثیر نانوذرات ZnO بر روی حلالیت فیلم کفیران در آب نیز نتایج مشابهی گزارش شده است [۶].

افزایش مقدار کفیران در غلظت‌های مختلف نانورس اثرات متفاوتی داشت. با افزایش مقدار کفیران از ۳/۵ تا ۶/۵ گرم، حلالیت در آب فیلم‌های بدون نانورس با شیب تندی افزایش یافت. ماهیت هیدروفیل کفیران، خاصیت جذب آب بالا و حلالیت بیشتر این بیوپلیمر را باعث می‌شود و بنابراین با افزایش میزان کفیران، جذب آب بیشتر شده و میزان ترکیبات حل شده

۲-۶- مطالعه‌ی تأثیر فیلم‌های فعال بر روی

پایداری اکسیداتیو روغن سویا

۲-۶-۱- آماده سازی نمونه های روغن

به منظور تعیین کارایی فیلم‌های فعال، روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی‌اکسیدان از کارخانجات روغن مایع ماهک (آذران پیه، آذربایجان شرقی) تهیه گردید و فیلم‌های تولید شده در تماس با این روغن بدون آنتی‌اکسیدان قرار گرفته و پارامترهای کیفی مربوط به فساد اکسیداتیو آن بررسی شد. مقدار ۱۰ ml روغن سویای تصفیه شده و بدون آنتی‌اکسیدان افزوده شده، درون یک ویال شیشه‌ای به حجم ۱۰ ml منتقل شده و 12 cm^2 از نمونه‌های فیلم، بریده شده و درون روغن غوطه‌ور گردید. درب ویال سفت شده و به مدت دو ماه در دمای 25°C قرار داده شد. در طول دو ماه نگهداری، هر پانزده روز یکبار تعدادی از فیلم‌ها از ویال‌ها خارج شده و قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد^{۱۶} فیلم و همچنین پایداری اکسیداتیو روغن درون ویال با اندازه‌گیری عدد پراکسید (PV) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۶-۲- تعیین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلم

برای تعیین قدرت مهارکنندگی نمونه‌های فیلم از روش Byun و همکاران [۲۲] با کمی تغییرات استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از فیلم‌های خارج شده از داخل روغن، به تکه‌های خیلی ریز بریده شد و داخل فلاسکی قرار داده شد و سپس ۲ میلی‌لیتر متانول به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد و ۳ ساعت در دمای محیط (20°C درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. ۲ ml از محلول رویی در نمونه‌های مخلوط شده با متانول، با ۲ ml از محلول متانولی DPPH (0.06 mM) مخلوط گردید. مخلوط پس از یک دقیقه ورتکس کردن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 25°C در محلی تاریک قرار داده شد و سپس برای تعیین قدرت مهارکنندگی DPPH مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ی شاهد نیز با افزودن ۰/۵ ml متانول و عدم حضور نمونه‌ی فیلم تهیه شد. و سپس میزان جذب آن در 517 nm توسط اسپکترومتر UV (آمریکا، Unico, S 2100 SUV) اندازه‌گیری گردید. قدرت

16. Free radical scavenging activity

صعودی نشان داد و از $4 \times 10^{-4} \text{ g/m.h.Pa}$ برای فیلم حاوی ۳/۵ گرم کفیران تا $8 \times 10^{-4} \text{ g/m.h.Pa}$ برای فیلم حاوی ۶/۵ گرم کفیران افزایش یافت. کفیران پلی ساکاریدی با ماهیت کاملاً آبدوست می باشد. بنابراین با افزایش میزان کفیران، تعداد گروه های آبدوست که قابلیت اتصال به مولکول های آب دارند افزایش یافته و همین امر انتشار پذیری مولکول های بخار آب در بستر آبدوست فیلم را تسهیل می کند.

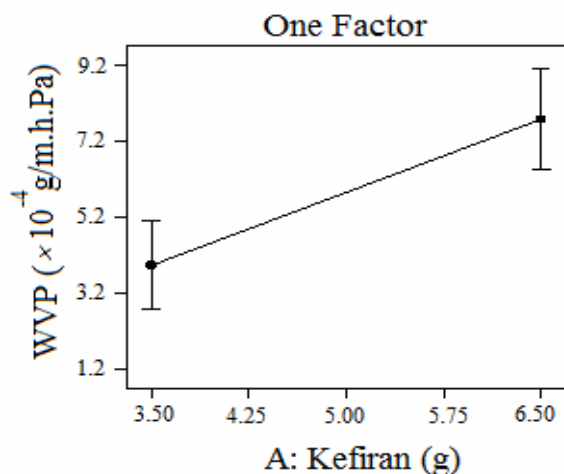


Fig 2 Effect of kefiran contents on WVP of bionanocomposite films.

برخلاف این مطالعه، در مطالعات دیگر، حضور نانوتقویت کننده ها در فیلم کفیران باعث تأثیرات قابل توجهی در کاهش نفوذپذیری به بخار آب شده است. در مطالعه ای مشخص شد که با افزایش محتوای نانوکریستال سلولز تا ۲٪ در فیلم کفیران، نفوذپذیری به بخار آب کاهش و در ۳٪ وزنی آن افزایش می یابد [۵]. افزودن نانوذراتی نظیر TiO_2 [۱۷] و ZnO [۶] به فیلم کفیران نیز باعث کاهش نفوذپذیری نسبت به بخار آب شده اند. لازم به ذکر است که میزان کفیران مورد استفاده در تولید فیلم در این پژوهش، بیشتر از مطالعات مشابه بوده است. بنابراین احتمالاً داده می شود که آبدوستی بالای فیلم بدلیل غلظت بیشتر بیوپلیمر، باعث شده است که لایه های نانورس نتوانند نقش موثر خود در کاهش انتشار مولکول های آب از مقطع عرضی فیلم را به خوبی

افزایش می یابد [۷]. اما در فیلم های حاوی ۷ درصد نانورس، با افزایش میزان کفیران، حلالیت در آب کاهش یافت. این امر نشان می دهد که بین کفیران و نانورس سازگاری خوبی وجود داشته و در غلظت های بالای کفیران، پخش مطلوب تر نانورس باعث افزایش اتصالات بین رشته ای و کاهش میزان مواد محلول می شود. بطور کلی، در فیلم های حاوی ۶/۵ گرم کفیران، تأثیر نانورس بر روی حلالیت معنی دار بود اما در فیلم های حاوی ۳/۵ گرم کفیران، این اختلاف غیرمعنی دار گزارش شد. معنی این پدیده این است که در غلظت های بالاتر کفیران، پخش نانورس بهتر بوده و این نانوذره تأثیر خود را در کاهش حلالیت، بیشتر نشان می دهد. آلفاتوکوفرول بر حلالیت در آب فیلم کفیران تأثیر معنی داری نداشت. در مورد تأثیر آلفاتوکوفرول بر حلالیت فیلم کیتوزان نیز نتایج مشابهی گزارش شده است [۲۸].

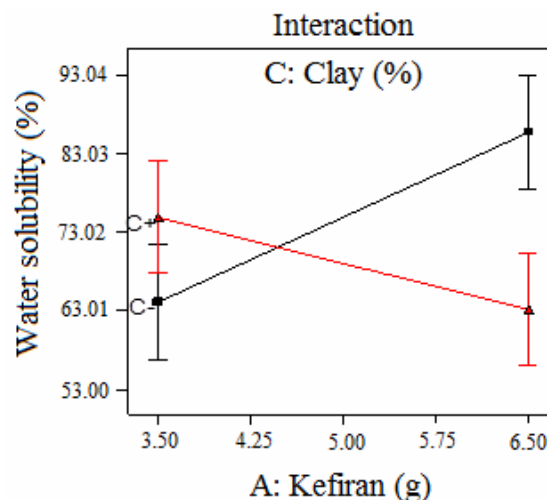


Fig 1 Effect of kefiran and nano clay contents on water solubility of bionanocomposite films.

C: 0% wt. clay C+: 7% wt. clay

۳-۲- نفوذپذیری نسبت به بخار آب (WVP)

در این مطالعه، تنها فاکتور موثر بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم ها، مقدار کفیران بود ($P < 0.05$)؛ بطوری که در فیلم های با مقدار ۳/۵ گرم کفیران، کمترین میزان WVP و در فیلم های با مقدار ۶/۵ گرم کفیران بیشترین WVP بدست آمد. با افزایش مقدار کفیران در فیلم ها، نفوذپذیری به بخار آب با شیب ملایمی روند

[۱۸]، آلژینات [۲۴]، کیتوزان [۲۶] و آگار [۲۷] نیز به اثبات رسیده است.

در مورد برهمکنش نانورس با آلفاتوکوفرول (شکل B۳) نیز می توان گفت که با افزایش آلفاتوکوفرول تا ۱۰۰ پی پی ام، در مقادیر نانورس ۱/۷۵٪ تا ۵/۲۵٪ UTS مقدار ثابت ۰/۱ مگاپاسکال را نشان می دهد و در مقدار ۵/۲۵٪ نانورس و ppm ۵۰ آلفاتوکوفرول مقاومت کششی افزایش می یابد و به ۰/۲ می رسد. احتمالاً در حضور آلفاتوکوفرول کم، بعلت سازگاری و سطح تماس بیشتر نانورس و پلیمر، ایجاد پیوندهای شیمیایی بین نانورس و ماتریکس پلیمر افزایش می یابد و مقاومت کششی نانوکامپوزیت بیشتر می شود. در حضور آلفاتوکوفرول بالاتر از ppm ۱۰۰، افزایش مقادیر نانورس در ماتریکس فیلم، تأثیری در افزایش یا کاهش مقاومت کششی ندارد و مقادیر ثابتی نشان می دهد. این امر احتمالاً به این علت است که آلفاتوکوفرول با قرارگیری در فضای بین لایه های سطحی نانورس، مانع تماس کافی سیلیکات های لایه ای و رشته های بیوپلیمر شده و در نتیجه تأثیرگذاری نانورس در بهبود خواص مکانیکی را کمتر می کند. در تأیید نتایج، آلفاتوکوفرول در فیلم های پلی لاکتیک اسید - نشاسته [۳۱] و نشاسته - کیتوزان [۳۲] موجب افزایش مقاومت کششی فیلم شده است. همان طور که در شکل C ۳ مشخص است، تنها فاکتور موثر بر مدول یانگ، مقدار نانورس است. با افزایش نانورس، مدول یانگ با شیب ملایمی افزایش یافت و کمترین مقدار آن در فیلم های با سطح ۱/۷۵٪ نانورس و مقدار بیشینه آن در فیلم های حاوی ۵/۲۵٪ نانورس بدست آمد. علت این افزایش، همان طور که ذکر شد، بخاطر توزیع یکنواخت نانوذرات در فیلم و سازگاری نانوذره با ماتریکس پلیمری است که منتج به تشکیل پیوندهای بیشتر و در نتیجه افزایش الاستیسیته فیلم شده است. تغییرات مقادیر ازدیاد طول تا نقطه شکست غیرمعنی دار بوده و از ارائه نتایج آن خودداری شده است.

نشان دهند و به همین دلیل اثر معنی داری برای تأثیر نانورس در WVP مشاهده نشده است.

آلفاتوکوفرول، هیچ گونه تأثیری بر نفوذپذیری به بخار آب فیلم کفیران نشان نداد. مشابه این نتایج، در فیلم پلی لاکتیک اسید [۲۹] و کازئینات سدیم [۳۰] نیز آلفاتوکوفرول تأثیری بر نفوذپذیری به بخار آب نشان نداد. احتمالاً به علت مقدار کم استفاده از آن و همچنین احتمال جایگیری آن در فضای بین لایه های نانورس، تأثیر آن در نفوذپذیری فیلم کفیران مشهود نبوده است.

۳-۳- خواص مکانیکی

تغییرات استحکام کششی فیلم های بیونانوکامپوزیت کفیران در شکل ۳ نشان داده است. بررسی UTS نشان داد که نانورس، کفیران و آلفاتوکوفرول این پارامتر را در سطح احتمال $P < 0.05$ با ضریب تبیین ۰/۸۵ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۷۸ تحت تأثیر قرار می دهند. نانورس هم با میزان کفیران (شکل A۳) و هم با غلظت آنتی اکسیدان (شکل B۳) برهم کنش می دهد. همان طور که مشاهده می شود، در مقادیر ثابت کفیران در ۴/۲۵ تا ۵/۱۵ گرم، با افزایش نانورس مقاومت کششی فیلم افزایش می یابد. دلیل اصلی برای بهبود خصوصیات مکانیکی، برهم کنش قوی بین ماتریکس پلیمری و لایه های سیلیکاتی نانورس است. صفحات وسیع لایه های نانورس سطح تماس بیشتری با بیوپلیمر ایجاد می کند و تشکیل اتصالات بین رشته ای، مقاومت مکانیکی فیلم را افزایش می دهد [۱۸]. برهم کنش نانورس و کفیران به این صورت است که در فیلم های با محتوای نانورس کمتر از ۲/۴۵٪، UTS مقدار ثابت ۰/۰۸ مگاپاسکال را نشان می دهد که ناشی از توزیع یکنواخت نانوذرات در ماتریکس فیلم است. اما در مقادیر بالای نانورس (بیشتر از ۳/۱۵٪)، UTS با افزایش میزان کفیران کاهش می یابد. با افزایش میزان کفیران، نسبت وزنی نانورس به بیوپلیمر کاهش می یابد و در نتیجه نقش نانورس در ایجاد اتصالات بین رشته ای و تقویت استحکام مکانیکی کمتر می شود. تأثیر مثبت نانورس در افزایش مقاومت مکانیکی فیلم نشاسته

از نظر آماری بر پارامتر اختلاف کلی رنگ فیلم‌های کفیران، نانورس بیشترین تأثیر و برهم‌کنش کفیران و نانورس کمترین تأثیر را دارند. کفیران و نانورس و برهم‌کنش نانورس و آلفاتوکوفرول تأثیر افزایشی و آلفاتوکوفرول و برهم‌کنش کفیران و نانورس تأثیر کاهشی در اختلاف کلی رنگ فیلم‌های کفیران دارند ($P < 0.05$).

مطابق شکل A، کفیران و نانورس اثر برهم‌کنشی بر پارامتر اختلاف کلی رنگ نشان می‌دهند. با افزایش مقدار کفیران از ۳/۵ تا ۶/۵ گرم در مقدار ثابت نانورس، اختلاف کلی رنگ افزایش می‌یابد و همچنین، اختلاف کلی رنگ فیلم‌ها، با افزایش مقدار نانورس از ۰٪ تا ۷٪ وزنی کفیران، در مقدار ثابت کفیران بیشتر می‌شود. بیشترین مقدار اختلاف کلی رنگ مربوط به فیلم‌های با ۳/۵ گرم کفیران و ۷٪ نانورس و کمترین مقدار آن در فیلم‌های با ۳/۵ گرم کفیران و بدون نانورس بدست آمده است. پودر نانورس، رنگی مایل به زرد داشته و افزودن آن باعث کاهش شفافیت فیلم می‌شود. همچنین با افزایش میزان کفیران نیز ضخامت فیلم بیشتر شده و شفافیت کمتر می‌شود.

معادله پیش‌بینی‌کننده اندیس زردی با ضریب تبیین ۰/۷۸ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۷۳ در زیر آمده است. اطلاعاتی که از معادله بدست می‌آید، نشان دهنده این است که کفیران تأثیر منفی و کاهشی بر اندیس زردی دارد، اما در نتیجه برهم‌کنش با نانورس تأثیر افزایشی بر این اندیس نشان می‌دهد. آلفاتوکوفرول تأثیر افزایشی در اندیس زردی می‌گذارد، اما برهم‌کنش آن با نانورس اثر کاهشی بر اندیس زردی نشان می‌دهد. نانورس موجب کاهش اندیس زردی می‌شود، اما در برهم‌کنش آن با آلفاتوکوفرول تأثیر کاهشی و در برهم‌کنش با کفیران اثر افزایشی بر این اندیس نشان می‌دهد. در این میان، برهم‌کنش نانورس و آلفاتوکوفرول بیشترین اثر و کفیران کمترین اثر را بر اندیس زردی دارد ($P < 0.05$).

$$YI = 0.000822 - 3 \times 10^{-0.5} * A - 5/8 \times 10^{-0.5} * C + 4/74 \times 10^{-0.5} * D + 4.17 \times 10^{-0.5} * A * C - 8.3 \times 10^{-0.5} * C * D$$

در بررسی برهم‌کنش آلفاتوکوفرول و نانورس (شکل B) مشاهده می‌شود که اندیس زردی با افزایش نانورس، در فیلم‌های با حد پایین آلفاتوکوفرول با شیب ملایمی افزایش و در فیلم‌های

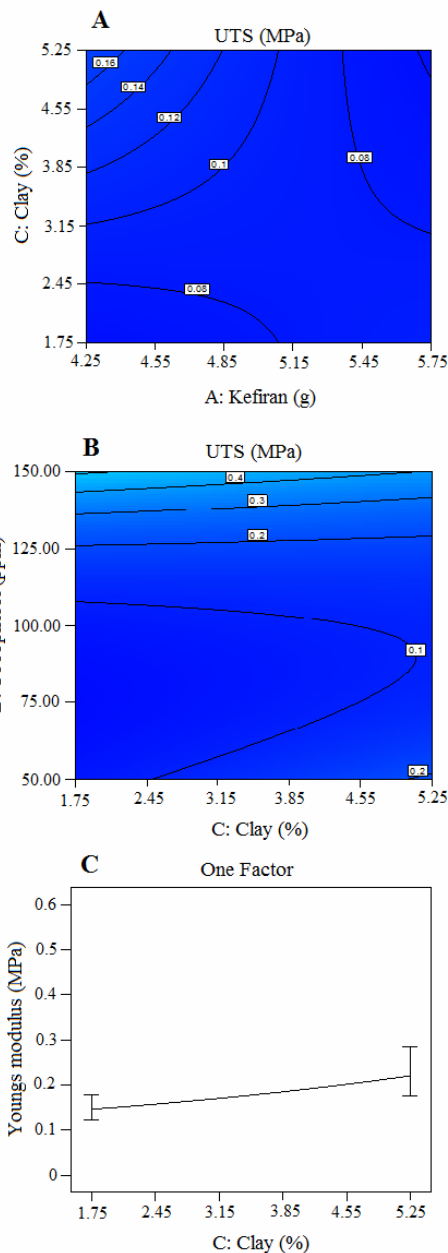


Fig 3 Effects of kefir/nanoclay interactions (A) and nanoclay/alpha-tocopherol interactions (B) on tensile strength and effect of nanoclay contents on Young's modulus (C) of bionanocomposite films.

۳-۴- خواص رنگی

معادله پیش‌بینی‌کننده اختلاف کلی رنگ فیلم‌های کفیران با ضریب تبیین ۰/۸۹ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۸۶ بصورت زیر است:

$$\Delta E = 34.66772 + 2.289783 * A + 6.32928 * C - 2.11254 * D - 1.72562 * A * C + 3.431891 * C * D$$

در این پژوهش، DPPH برای بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول در ترکیب با فیلم کفیران در طول مدت نگهداری فیلم داخل روغن مورد استفاده قرار گرفت. از نظر آماری، در بین فاکتورهای تأثیرگذار بر قدرت مهارکنندگی فیلم، میزان کفیران، غلظت نانورس و آلفاتوکوفرول و زمان نگهداری فیلم داخل روغن در سطح احتمال $P < 0.05$ معنی دار بودند. زمان نگهداری فیلم داخل روغن، بیشترین و محتوای نانورس، کمترین تأثیر را بر قدرت آنتی اکسیدانی فیلم داشتند. مقدار کفیران، نانورس و آلفاتوکوفرول تأثیر افزایشی بر این پارامتر نشان می دهد و با افزایش زمان نگهداری فیلم داخل روغن، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد کاهش می یابد. معادله پیش بینی کننده قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلم با ضریب تبیین 0.89 و ضریب تبیین اصلاح شده 0.88 بصورت مقابل است:

$$\text{DPPH} = 38.75146 + 6.227559 * A - 16.2301 * B + 2.750922 * C + 4.911524 * D$$

شکل ۵ تأثیر عوامل مختلف بر قدرت آنتی اکسیدانی فیلم فعال کفیران را نشان می دهد. مطابق نمودار A۵، با افزایش مقدار کفیران از $3/5$ به $6/5$ گرم، قدرت آنتی اکسیدانی فیلم، با شیب ملایمی از 30 به 44 درصد افزایش می یابد. Koktash و همکاران [۲] گزارش کردند که خود بیوپلیمر کفیران نیز بدلیل ترکیبات دیگری که ممکن است در حین تخمیر تولید شوند، خاصیت آنتی اکسیدانی نشان می دهد. بنابراین با افزایش میزان کفیران، قدرت مهار DPPH در فیلم بیشتر می شود.

با افزایش مدت زمان نگهداری فیلمها در داخل روغن، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلم با شیب تندی کاهش می یابد (نمودار B۵). دلیل این امر، مهاجرت آنتی اکسیدان از فیلم به درون روغن بوده است. مسلم است که با گذشت زمان، آلفاتوکوفرول مطابق قوانین پدیده انتشار، از بستر فیلم کفیران به داخل روغن مهاجرت می کند و بنابراین با گذشت زمان، خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم کمتر خواهد شد. مشابه این نتیجه، قدرت آنتی اکسیدانی تانیک اسید و کاتچین در فیلم کازئینات سدیم نیز با افزایش زمان نگهداری فیلم، کاهش یافته است [۳۴]. حضور نانورس در ترکیب فیلم، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلم را چندان تحت تأثیر قرار نمی دهد و تأثیر افزایشی خیلی

با حد بالای آلفاتوکوفرول با شیب تندی کاهش می یابد. اختلاف اندیس زردی در فیلمهای با حد بالا و حد پایین آلفاتوکوفرول، با بیشترین مقدار نانورس و فیلم های بدون نانورس معنی دار است، اما این اختلاف در فیلم های بدون نانورس بیشتر است. بیشترین مقدار زردی مربوط به فیلمهای بدون نانورس و حد بالای آلفاتوکوفرول بدست آمده است. بطور کلی می توان نتیجه گرفت که نانورس و آلفاتوکوفرول هر دو باعث افزایش اندیش زردی فیلم کفیران می شوند اما تأثیر آلفاتوکوفرول بیشتر از نانورس بوده و افزایش نانورس می تواند تا حدودی اثر منفی آلفاتوکوفرول در زردی فیلم را کاهش دهد. مشابه نتایج این پژوهش، ثابت شده است که زردی در فیلم پلی لاکتیک اسید با حضور آلفاتوکوفرول افزایش می یابد [۳۳].

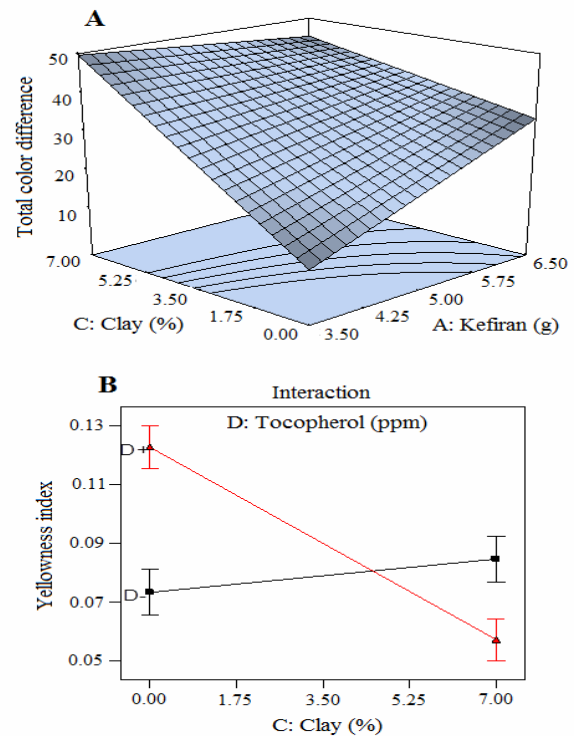


Fig 4 Effect of nanoclay/kefiran interactions on total color difference (A) and effect of nanoclay/alpha-tocopherol interactions on yellowness index (B) of bionanocomposite films.

D⁻: lower level of alpha-tocopherol (50 ppm)

D⁺: upper level of alpha-tocopherol (200 ppm)

۳-۵- قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلمهای

کفیران

ترکیبات آنتی اکسیدانی در فیلم های زیست تخریب پذیر نیز گزارش شده است [۳۵ و ۳۶]. قدرت آنتی اکسیدانی فیلم به مقدار آنتی اکسیدان افزوده شده به آن بستگی دارد. مسلماً با افزایش میزان آلفاتوکوفرول در بستر فیلم کفیران، خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم بیشتر خواهد شد.

طبق نتایج ارائه شده در شکل ۵، بیشترین قدرت مهارکنندگی DPPH در فیلم های با کفیران ۶/۵ گرم، آلفاتوکوفرول ppm ۲۰۰، نانورس ۷٪ و با نگهداری فیلم داخل روغن بمدت ۱۵ روز مشاهده شد و کمترین مقدار آن در فیلم های با کفیران ۳/۵ گرم، بدون نانورس و بدون آلفاتوکوفرول بدست آمد.

کمی روی این پارامتر دارد (نمودار C۵). نانوذرات با ایجاد مسیره های زیگزاگ نرخ رهایش ترکیبات فعال را کاهش می دهند. اما تأثیر کم نانورس در این پژوهش، احتمالاً به سازگاری بالای آلفاتوکوفرول و روغن مربوط است که باعث می شود نرخ رهایش بالا بوده و نانورس نتواند نقش موثری در کنترل مهاجرت آنتی اکسیدان ایفا کند. هرچند که بصورت نسبی توانسته است با کاهش رهایش آلفاتوکوفرول، قدرت آنتی اکسیدانی فیلم را در طول زمان حفظ کند.

همان طور از نمودار D۵ بدست می آید، با افزایش آلفاتوکوفرول از صفر به ppm ۲۰۰، مقدار قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد فیلم با شیب ملایمی افزایش می یابد. این تأثیر در مورد سایر

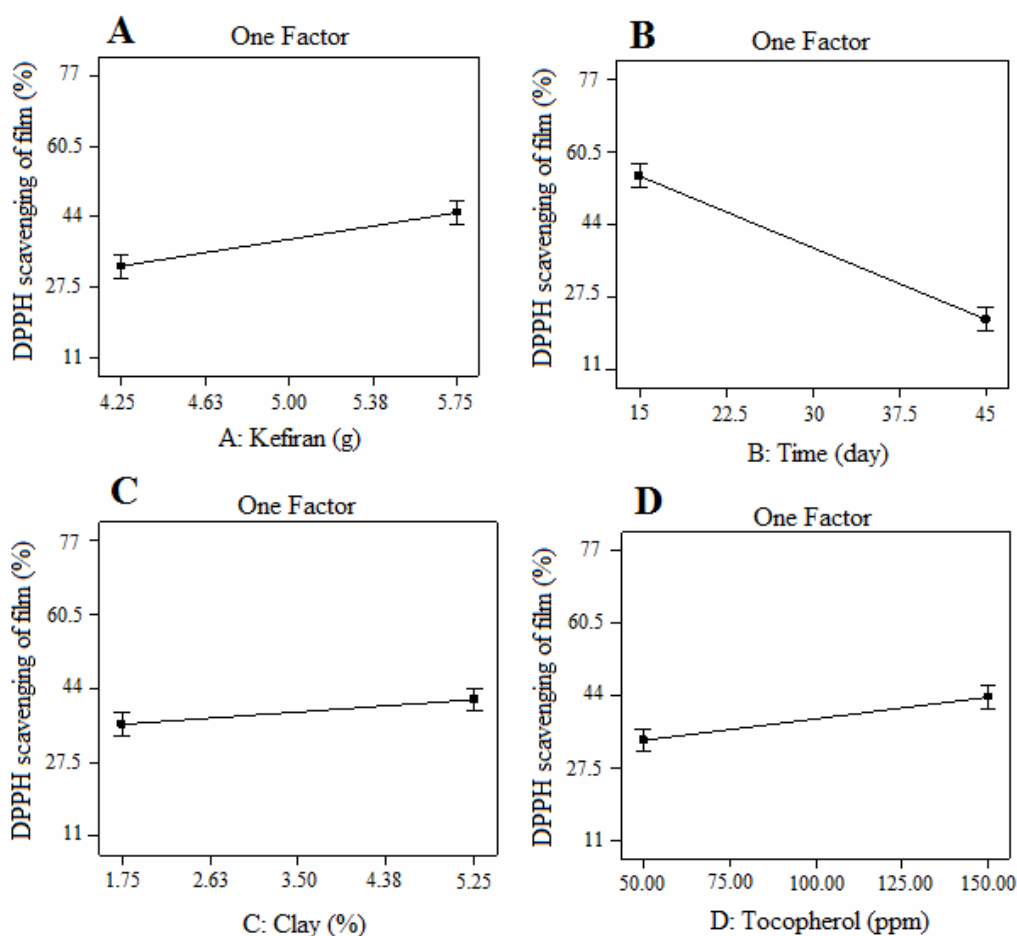


Fig 5 effects of kefiran contents (A), immersion time of films in oil (B), clay contents (C) and alpha-tocopherol contents on antioxidant activity of bionanocomposite films

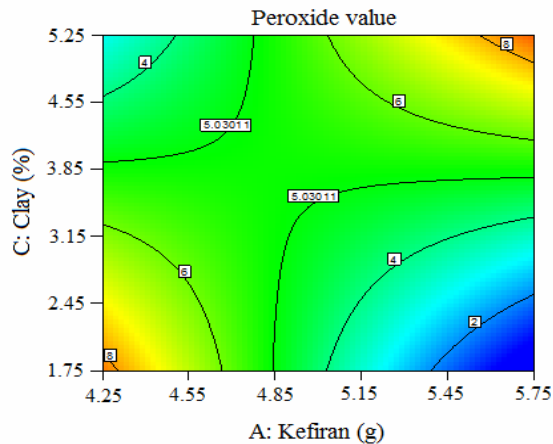


Fig 6 Effect of kefir/nanoclay interactions in bionanocomposite films on peroxide value of soybean oil

۳-۷- تعیین شرایط فیلم بهینه

در دستیابی به فیلم بهینه، از نتایج بدست آمده از آزمون‌ها استفاده شد. مشخصات شرایط بهینه برای دستیابی به بهترین خواص، مطابق جدول ۲ پیش بینی شده است. در نهایت با در نظر گرفتن این شرایط، فیلم بهینه با مقادیر ۶/۲ گرم کفیران، ۲/۶۴٪ نانورس و ۲۰۰ ppm آلفاتوکوفرول بدست آمد و بهترین زمان نگهداری فیلم داخل روغن تا ۳۱/۸۱ روز بود. در این شرایط، سایر مشخصات فیلم با درجه مطلوبیت ۶۰٪ بصورت جدول ۳ بدست آمد.

Table 2 Optimum conditions for achieving to bionanocomposite films with the best characteristics

Factor	Goal
Kefiran (g)	is in range
Time (day)	maximize
Clay (%)	is in range
Alpha-tocopherol (ppm)	is in range
ΔE	minimize
YI	minimize
UTS (MPa)	maximize
YM (MPa)	maximize
DPPH scavenging	maximize
PV	is in range

۳-۶- عدد پراکسید (PV)

معادله پیش‌بینی کننده عدد پراکسید با ضریب تبیین ۰/۷۴ و ضریب تبیین اصلاح شده ۰/۷۰ در سطح احتمال $P < 0.05$ بصورت مقابل است:

$$PV = 5.016202 - 0.65225 * A + 0.862865 * C + 3.487004 * A * C$$

از نظر آماری، نه تنها مقدار کفیران و نانورس بر عدد پراکسید روغن تأثیرگذار بودند، بلکه برهم‌کنش بین کفیران و نانورس نیز تأثیر مهمی در عدد پراکسید داشت. اطلاعات مربوط به عدد پراکسید در شکل ۶ آورده شده است.

در فیلم‌های حاوی نانورس کمتر از ۳/۸۵٪، با افزایش مقدار کفیران، عدد پراکسید روغن کاهش می‌یابد، همچنین در فیلم‌های با کفیران کمتر از ۴/۸۵ گرم، با افزایش نانورس نیز عدد پراکسید کاهش می‌یابد. کم‌ترین مقادیر عدد پراکسید روغن در فیلم‌های با کفیران بالا و نانورس کم مشاهده می‌شود. دلیل این امر این است که اولاً همان‌طور که اشاره شد، خود کفیران خاصیت آنتی اکسیدانی ضعیفی دارد و با افزایش غلظت کفیران این تأثیر بیشتر می‌شود. همچنین در مقادیر کم نانورس، تأثیر آن در کنترل رهایش آلفاتوکوفرول به داخل روغن کمتر می‌شود. در نتیجه آنتی اکسیدان بیشتری از فیلم وارد روغن شده و بنابراین پایداری اکسیداتیو روغن افزایش و عدد پروکسید کاهش می‌یابد. با افزایش محتوای کفیران در فیلم‌ها و محتوای نانورس به بیشتر از ۳/۸۵٪، عدد پراکسید افزایش می‌یابد. دلیل این پدیده، افزایش تراکم بین مولکولی در اثر افزایش میزان کفیران و همچنین افزایش اتصالات بین رشته‌ای بدلیل حضور لایه‌های نانورس بیشتر می‌باشد. به این دو دلیل، نرخ رهایش آلفاتوکوفرول از فیلم به داخل روغن کمتر شده و در نتیجه عدد پراکسید روغن در طول زمان افزایش می‌یابد. این نتایج نشان داد که غلظت بیوپلیمر و همچنین حضور نانوذرات می‌توانند به کنترل رهایش آنتی اکسیدان از فیلم فعال به داخل مواد غذایی کمک کنند. Almasi و همکاران [۳۷] در تحقیق مشابه ثابت کردند که حضور نانوفیبر سلولز اصلاح شده، مهاجرت آنتی اکسیدان TBHQ از فیلم نانوکامپوزیت پلی لاکتیک اسید به داخل روغن را کاهش می‌دهد.

Table 3 The calculated values for properties of optimum bionanocomposite film

ΔE	YI	TS (MPa)	DPPH (%)	PV (meq O ₂ /kg)	Desirability
31.71263	0.000946	2.476491	55.23626	0.802028	0.606451

های رنگی فیلم موثر است. با افزایش غلظت آلفاتوکوفرول، خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم بیشتر شد اما نانورس به دلیل کنترل رهایش آلفاتوکوفرول به داخل روغن، باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم در طول زمان شد. بطور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که با ترکیب آلفاتوکوفرول و کفیران می توان فیلم فعال آنتی اکسیدانی تولید نمود و با استفاده از نانورس، علاوه بر بهبود خواص فیزیکی فیلم، رهایش آنتی اکسیدان از فیلم کفیران را نیز کنترل نمود. همچنین ثابت شد که شرایط قابل بیونانوکامپوزیت فعال کفیران، با استفاده از روش سطح پاسخ قابل بهینه سازی است و می توان با استفاده از این بیوپلیمر و آنتی اکسیدان طبیعی آلفاتوکوفرول، فیلم آنتی اکسیدانی فعال مناسبی برای افزایش پایداری اکسیداتیو مواد غذایی چرب طراحی و تولید نمود.

۵- منابع

- [1] Ghanbarzadeh B., Almasi H., Boidegradable polymers. In: Chamy R and Rosenkranz F (Eds). Biodegradation- life of science. InTech Publications, Croatia, 2013, pp. 141-186.
- [2] Kok-tash T., Seydim A., Ozer B., Guzelseydim Z., Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *Journal of Dairy Science*. 2013; (96), 780-789.
- [3] Ghasemlou M., Khodaiyan F., Jahanbin K., Gharibzahedi T., Taheri S., Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium. *Journal of Food Chemistry*, 2012; (133): 383-389.
- [4] Piermaria J., de la Canala M., Abraham A., Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 2008; (22): 1520-1527.
- [5] Shahabi-Ghahfarrokhi I., Khodaiyan F., Mousavi M., Yousefi H., Effect of irradiation on the physical and mechanical properties of kefiran biopolymer film. *International Journal*

درجه مطلوبیت، نشانگر درجه وصول به هدفی است که برای تولید فیلم بهینه در نظر گرفته شده است و این عدد بین صفر تا یک متغیر است. هرچه قدر این عدد به یک نزدیک تر باشد، بهینه سازی بهتری انجام شده است. در فیلم بهینه، فاکتورهای رنگ از جمله اختلاف رنگ کلی با درجه مطلوبیت ۰/۶۳ و اندیس زردی با درجه مطلوبیت ۰/۴۴ بدست آمده است. استحکام کششی با حداکثر درجه بهینه سازی برابر یک، نشانگر فیلم بهینه با مقاومت کششی بالاست. در رسیدن به هدف افزایش مدت زمان نگهداری روغن، بهینه سازی چندان موفقیت آمیز نبوده و مقدار مطلوبیت ۰/۳۷ را نشان می دهد. خواص آنتی اکسیدانی فیلم، بطور قابل توجهی با درجه مطلوبیت بالا از جمله عدد پراکسید ۱، و قدرت آنتی اکسیدانی فیلم ۰/۶۶ در فیلم بهینه بدست آمده است. میانگین هندسی فاکتورهای بهینه برابر ۰/۶۰ است. درجه مطلوبیت بالاتر از ۰/۵۰ موفقیت بهینه سازی را نشان می دهد (شکل ۷).

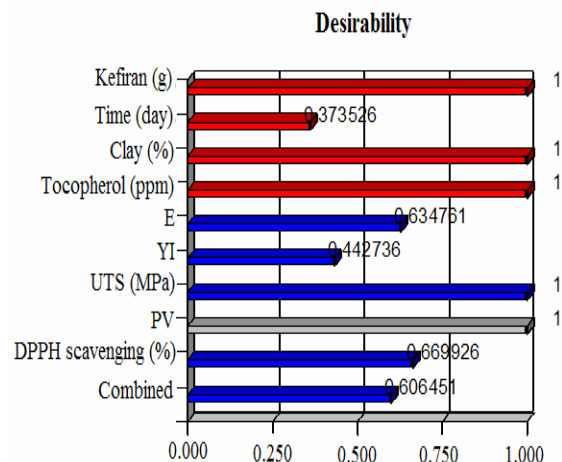


Fig 7 Desirability of various factors calculated for optimum kefiran/nanoclay/alpha-tocopherol bionanocomposite film

۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیوپلیمر مورد استفاده و غلظت نانورس بر روی خواص مکانیکی و بازدارندگی فیلم کفیران تأثیرگذار هستند اما آلفاتوکوفرول تنها بر روی ویژگی

- vinyl alcohol copolymer (EVOH) films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010; (58): 10958-10964.
- [15] Souza C.O., Silva L.T., Silva J.R., Lopez J.A., Veiga-Santos P., Druzian J.I., Mango and acerola pulps as antioxidant additives in cassava starch bio-based Film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011; (59): 2248-2254.
- [16] Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. Antioxidants: Science, technology, and applications. *John Wiley & Sons, Inc.* 2005.
- [17] Zolfi M., Khodaiyan F., Mousavi M., Hashemi M. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran-whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 2014; (109): 118-125.
- [18] Almasi H., Ghanbarzadeh B., Entezami A.A., Physicochemical properties of starch-CMC-nanoclay biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010; (46): 1-5.
- [19] Gontard N., Duchez C., Cuq B., Guilbert S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. *Food Science and Technology*, 1994; (29): 39-50.
- [20] ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material. E96-05. Annual book of ASTM, 2005, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- [21] ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-10. Annual book of ASTM, 2010, Philadelphia, PA: American Society for testing and Materials.
- [22] Byun Y., Kim Y.T., Whiteside S., Characterization of an antioxidant polylactic acid (PLA) film prepared with α -tocopherol, BHT and polyethylene glycol using film cast extruder. *Journal of Food Engineering*, 2010; (100): 239-244.
- [23] AOAC 1990. Peroxide value of oils and fats. Method 965.33. In: Williams S, editor. Official methods of analysis. Washington (DC): AOAC.
- [24] Alboofetileh M., Rezaei M., Hosseini H., Abdollahi M. Effect of montmorillonite clay and biopolymer concentration on the physical and mechanical properties of alginate of *Biological Macromolecules*, 2015; (74): 343-350.
- [6] Shahabi-Ghahfarrokhi I., Khodaiyan F., Mousavi M., Yousefi, H., Preparation of UV-protective kefiran/nano-ZnO nanocomposites: Physical and mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015; (72), 41-46.
- [7] Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydrate Polymers*, 2011; (84): 477-483.
- [8]. Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2011; (49): 814- 821.
- [9] Ghasemlou M., Khodaiyan F., Oromiehie A., Yarmand M.S. Development and characterization of a new biodegradable edible film made from kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. *Food Chemistry*, 2011; (127): 1496-1502.
- [10] Ghanbarzadeh B., Oleyaei A., Almasi H. Nano-structured materials utilized in natural biopolymer films for food packaging applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015; 55(12): 1699-1723.
- [11] Othman S.H., Bio-nanocomposite materials for food packaging applications: Types of biopolymer and nano-sized filler. *Agriculture & Agricultural Science Proceeds*, 2014; (2): 296-303.
- [12] Ahvenainen R., Active and intelligent packaging: An introduction. In: Ahvenainen R, (ed.), Novel food packaging techniques. Woodhead Publishing, Cambridge, U.K. 2003, pp. 5-21.
- [13] Gemili S., Yemenicioglu A., Altinkaya S.A., Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*, 2010; (96): 325-332.
- [14] Decastillo C.L., Alonso J.M., Catala R., Gavara R., Munoz P.H., Improving the antioxidant protection of packaged food by incorporating natural flavonoids into ethylene-

- blends films into ethanol. *Journal of Food Engineering*, 2013; (116), 814-828.
- [32] Bonilla J., Talon E., Atarés L., Vargas M., Chiralt A. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidant properties of wheat starch-chitosan films, *Journal of Food Engineering*, 2013; 118: 271–278.
- [33] Manzanarez-Lopez F., Soto-Valdez H., Auras R., Peralta E. Release of α -tocopherol from poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 2011; 104(4): 508–517.
- [34] Helal A., Tagliacruzchi D., Conte A., Desobry S. Antioxidant properties of polyphenols incorporated in casein/sodium caseinate films. *International Dairy Journal*, 2012; (25); 10-15.
- [35] Bitencourt C.M., Favaro-Trindade C.S., Sobral P.J.A., Carvalho R.A. Gelatin based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films, *Food Hydrocolloids*, 2014; (40), 145-152.
- [36] Martuccia J.F., Gendeb L.B., Neiraa L.M., Ruseckaitea R.A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 2015; (71), 205–213.
- [37] Almasi H., Ghanbarzadeh B., Dehghannya J., Entezami A.A., Khosrowshahi Asl, A., Development of a novel controlled-release nanocomposite based on poly(lactic acid) to increase the oxidative stability of soybean oil. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 2014; 31(9): 1586–1597.
- nanocomposite films, *Journal of Food Engineering*, 2013; (117): 26–33.
- [25] Tunc S., Duman O. Preparation and characterization of biodegradable methyl cellulose/montmorillonite nanocomposite films. *Applied Clay Science*, 2010; 48(3): 414–424.
- [26] Casariego A., Souza B.W.S., Cerqueira M.A., Teixeira J.A., Cruz L., Daz R., Vicente A.A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocolloids*, 2009; 23(7): 1895–1902.
- [27] Rhim J. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 2011; (86): 691–699.
- [28] Martins J.T., Cerqueira M.A., Vicente A.A. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 2012; (27), 220-227.
- [29] Jamshidian M., Arab Tehrany E., Imran M., Akhtar M.J., Cleymand F., Desobry S. Structural, mechanical and barrier properties of active PLA-antioxidant films. *Journal of Food Engineering*, 2012; (110), 380-389.
- [30] Fabra M.J., Hambleton A., Talens P., Debeaufort F., Chiralt A. Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 2011; (25), 1441-1447.
- [31] Wook Hwang S., Kie Shim J., Selke S., Soto-Valdez H., Matuana L., Rubino M., Auras R. Migration of α -tocopherol and resveratrol from poly(L-lactic acid)/starch

Optimization of physical, barrier and antioxidant properties of Kefiran-nanoclay bionanocomposite film containing alpha-tocopherol by using surface response method

Atalu, S. ¹, Alizadeh-khaledabad, M. ^{2*}, Almasi, H. ³

1. M.Sc. graduate of Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Associate Professor of Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor of Department of Food Science, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

(Received: 2016/12/04 Accepted:2017/02/20)

In this research, Kefiran based bionanocomposite active film containing nanoclay and alpha-tocopherol was prepared. The effect of kefiran content (3.5, 4.25, 5.75 and 6.5 gr), nanoclay content (0, 1.75, 3.5, 5.25 and 7 %wt. of kefiran) and concentration of alpha-tocopherol (0, 50, 100, 150 and 200 ppm) on the barrier, mechanical and color properties and also antioxidant effect of film on the increasing of oxidative stability of soybean oil were investigated by using surface response method. Results indicated that water solubility and water vapor permeability were increased by increasing kefiran content and were decreased by nanoclay increasing. Also, tensile strength and young's modulus of films were increased by increasing nanoclay content. But alpha-tocopherol had no effect on mechanical properties. Total color difference and yellowness index of films were also increased by addition of nanoclay and alpha-tocopherol. The antioxidant activity of films was decreased by increasing of their retention inside the oil. But increasing of nanoclay and alpha-tocopherol caused to increase of antioxidant activity. Also, nanoclay caused to increase the peroxide value of soybean oil by release controlling of antioxidant. For optimization purpose, the desirability function method was employed. The optimum film was obtained by 6.2 g kefiran, 2.64% nanoclay and 200 ppm alpha-tocopherol. The best retention time of film in oil was achieved as 31.81 days. At this condition, the overall desirability of 60% was achieved.

Keywords: Kefiran, Alpha-tocopherol, Physical properties, Antioxidant activity, Optimization.

* Corresponding Author E-Mail Address: m.alizadeh@urmia.ac.ir