کاربرد آنزیم ترانس گلوتامیناز در تهیه فیلم‌های خوراکی بر پایه کیتوزان

سیده معصومه عرب[1]، مجتبی یوسفی اصلی[2]، نسیم خورشیدیان[3*]، مهدی فرهودی[4]

تاریخ دریافت مقاله: فروردین ماه ۱۳۹٤

تاریخ پذیرش مقاله: مرداد ماه ۱۳۹٤

چکیده

تولید فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر و خوراکی با ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری مناسب، یکی از چالش‌های مهم در صنعت بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد. فیلم‌های خوراکی نه تنها به طور فیزیکی غذا را محافظت می‌کنند، بلکه موجب کاهش از دست رفتن رطوبت، محدود نمودن جذب اکسیژن و کاهش مهاجرت لیپیدها در ماده غذایی می‌شوند. پلیمرهای با منشأ طبیعی مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها بهترین مواد در ساخت فیلم های خوراکی می‌باشند، چرا که کاملاً زیست تخریب‌پذیر می‌باشند و همچنین می‌توانند مانند مکمّلی در افزایش ارزش غذایی برخی از غذاها مؤثر باشند. با این حال، حلالیت زیاد در آب و نفوذپذیری فراوان در برابر بخار آب و مقاومت مکانیکی کم، استفاده از این پلیمرها را محدود نموده است. مطالعات متعدّدی به منظور بهبود ویژگی این فیلم‌ها از طریق ساخت فیلم‌های چند لایه و کامپوزیتی و یا ایجاد اتصال عرضی بین اجزای سازنده فیلم به طریق فیزیکی و شیمیایی صورت گرفته است. در این مقاله مروری، کاربرد آنزیم ترانس گلوتامیناز در تهیه فیلم‌های خوراکی بر پایه کیتوزان و اثر آن بر ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری این فیلم‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی

کیتوزان[5]، فیلم خوراکی، آنزیم ترانس گلوتامیناز[6]، اتصال عرضی

۱- مقدمه

در حال حاضر، اغلب پلیمرهای مورد استفاده در صنعت بسته‌بندی، منشأ پتروشیمیایی دارند و دلیل اصلی آلودگی محیط زیست می‌باشند. از این رو، تقاضا برای مواد بسته‌بندی زیست تخریب‌پذیر در حال افزایش است[۱]. جز اصلی تشکیل‌دهنده این بیو پلاستیک‌ها شامل پلیمرهای زیستی با منشأ معدنی مانند پلی‌استرها[7] و پلی‌وینیل الکل[8] و با منشأ طبیعی مانند پلی‌ساکاریدها[9]، پروتئین‌ها، لیپیدها[10] و پلی‌استرهای ساخته شده توسط

۱- دانشجوی دوره دکتری رشته علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی(arab.sepideh@gmail.com).

۲- دانشجوی دوره دکتری رشته علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی(m.yousefi2006@gmail.com).

۳- دانشجوی دوره دکتری رشته علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی.

(* نویسنده مسئول: nkhorshidian85@yahoo.com)

٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (farhoodi@sbmu.ac.ir)

5- Chitosan
6- Glutaminase
7- Polysters
8- Ethylene vinyl alcohol
9- Polysaccharide
10- Lipid

میکروارگانیسم‌های مختلف است[۲]. با این حال، اغلب بیوپلاستیک‌های تولید شده مقاومت مکانیکی مناسبی ندارند و تلاش بر این است که علاوه بر شناسایی منابع جدید پلیمرهای زیستی، روش‌هایی نیز به منظور افزایش مقاومت آن‌ها توسعه یابد[۳]. یکی از روش‌های به کار رفته برای این منظور، استفاده از مواد شیمیایی ایجادکننده اتصال عرضی در ساختار فیلم‌ها مانند فرمالدئید[۱]، گلوتارآلدئید[۲] و گلی‌اکسال[۳] است ولی به دلیل سمیّت این ترکیبات، استفاده از آن‌ها در فیلم‌های خوراکی چندان مناسب نیست. علاوه بر این، از اشعه γ و آنزیم‌های مختلف مانند پراکسیداز، تیروزیناز[٤] و ترانس گلوتامیناز[٥] نیز در این زمینه استفاده شده است [۱۱-٤]. ترانس گلوتامیناز یا پروتئین - گلوتامین[٦] – γ- گلوتامیل ترانسفراز[۷] (EC 2.3.2.13) به دسته دوم از طبقه‌بندی آنزیم‌ها یعنی ترانسفرازها تعلّق دارد. این آنزیم، تشکیل اتصالات ایزوپپتیدی[۸] بین گروه γ- کربوکسی آمید گلوتامین[۹](دهنده گروه آسیل[۱۰]) و گروه آمین نوع اول (پذیرنده گروه آسیل) را کاتالیز[۱۱] می‌کند. آنزیم ترانس گلوتامیناز به طور گسترده‌ای در طبیعت توزیع شده و در خیلی از بافت‌های حیوانی و مایعات بدن وجود دارد و در بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی[۱۲] نیز مانند: انعقاد خون، التیام زخم و کراتینه شدن[۱۳] بافت‌ها دخالت دارد. در زمان شناسایی این آنزیم در اوایل دهه ۱۹۸۰، استخراج آن از منابع حیوانی صورت می‌گرفت ولی به دلیل هزینه زیاد و مناسب نبودن استفاده از آن در مواد غذایی، منابع میکروبی جایگزین شدند. آنزیم ترانس گلوتامیناز یک زنجیره پلی‌پپتیدی[۱٤] منفرد با وزن مولکولی ۳۸ KDa است که از ۳۳۱ اسید آمینه تشکیل شده است و دارای نقطه ایزوالکتریک[۱۵] ۸/۹ می‌باشد. دمای اپتی موم[۱٦] برای فعالیت آنزیم، ۵۵ درجه سانتی‌گراد و اپتی موم pH برای فعالیت آن بین ۵ و ۸ می‌باشد. این آنزیم در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و کمتر از آن فعالیت خود را حفظ می‌کند. تفاوت آنزیم ترانس گلوتامیناز میکروبی و حیوانی این است که آنزیم میکروبی نیازی به یون کلسیم به عنوان کوفاکتور[۱۷] برای فعالیت ندارد. آنزیم ترانس گلوتامیناز از باکتری[۱۸] و قارچ[۱۹] جداسازی شده است. در سال‌های اخیر، این آنزیم به طور گسترده‌ای در صنایع مختلف و از جمله صنعت غذا به منظور بهبود بافت، ویژگی‌های مکانیکی و خاصیت امولسیفایری[۲۰] پروتئین‌ها به کار رفته است [۱۲]. همچنین مطالعاتی در زمینه استفاده از آن به عنوان ماده ایجادکننده اتصال عرضی در فیلم‌های خوراکی تهیه شده از مخلوط پروتئین‌های مختلف و پلی‌ساکاریدها صورت گرفته است. یکی از پلی‌ساکاریدهایی که استفاده گسترده‌ای در ساخت فیلم‌های خوراکی دارد، کیتوزان می‌باشد. کیتوزان شکل داستیله شده[۲۱] پلی‌ساکارید کیتین[۲۲] است که در پوسته خارجی بسیاری از حشرات، میگو، خرچنگ و لابستر[۲۳] وجود دارد و از واحدهای گلوکز آمین و N- استیل گلوکز آمین تشکیل شده است. فیلم‌های تهیه شده از کیتوزان نفوذپذیری کمی به اکسیژن دارند و مانع بسیار خوبی برای بخار آب و گازها می‌باشند. فیلم‌های کیتوزانی معمولاً از طریق تبخیر حلال، ایجاد اتصال عرضی به وسیله مواد شیمیایی و یا واکنش‌های متقابل فیزیکی با سایر ترکیبات مانند پروتئین‌ها تهیه می‌شوند[۱۳]. اگر چه، فیلم‌های تهیه شده به وسیله روش‌های فیزیکی، خواص مکانیکی و

1- Formaldehyde
2- Aldehyde
3- Glyoxal
4- Tyrosinase
5- Gglutaminase
6- Glutamine
7- Glutamyl transferase
8- Isopeptide
9- Glutamin
10- Acyl
11- Catalyzed
12- Biological
13- Keratin
14- Ply¬Pptydy

15- Isoelectric
16- Optimum
17- Cofactor
18- Streptoverticillium sp
19- Physarumpolycephalum
20 -Emulsifier
21- Deacetylated by
22- Chitin
23- Lobster

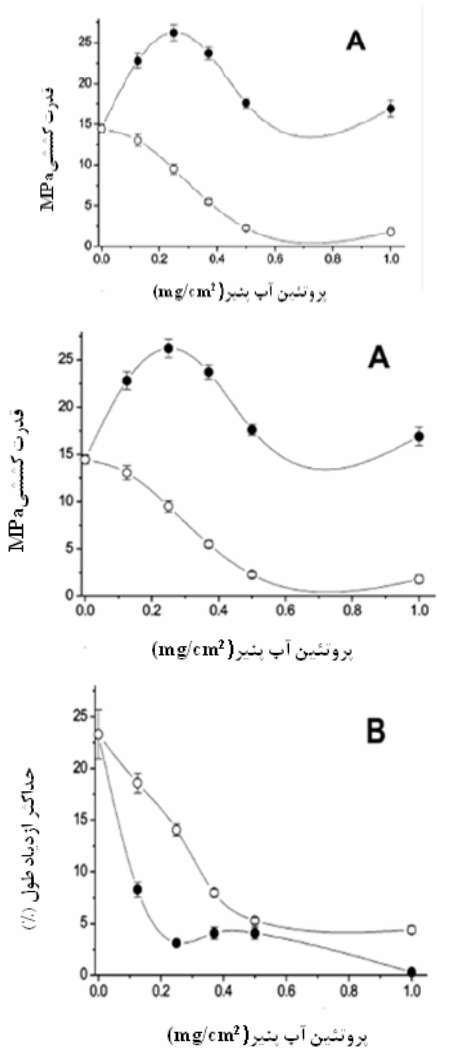
نفوذپذیری ضعیف‌تری در مقایسه با فیلم‌های ساخته شده توسط روش‌های شیمیایی دارند. از طرف دیگر، ایجاد اتصال عرضی به وسیله مواد شیمیایی، موجب ایجاد مواد سمّی و اثرات نامطلوبی در مواد بسته‌بندی می‌گردد. بنابراین، امکان استفاده از روش‌های آنزیمی هم در تهیه فیلم‌ها و هم بهبود ویژگی‌های آن، موضوع تحقیق در بسیاری از مطالعات اخیر بوده است.

۲- فیلم‌های کیتوزان – پروتئین آب پنیر

آب پنیر یک محصول جانبی در فرآیند تولید پنیر است که با وجود روش‌های متعدّد برای بازیافت آن، همچنان مقادیر زیادی از آن به هدر می‌رود و نگرانی‌های زیادی در ارتباط با آلودگی محیط زیست ایجاد نموده است. یکی از موارد استفاده از آب پنیر، تهیه فیلم‌های خوراکی است. در مطالعه انجام شده توسط دی پیرو[1] و همکاران فیلمی از کیتوزان و آب پنیر در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز تهیه شد. غلظت کیتوزان ۹/۲ mg /cm^2 و غلظت پروتئین بین صفر تا ۱ mg /cm^2 متغیر بود. فرآیند ایجاد اتصال عرضی توسط ترانس گلوتامیناز در pH =٦ انجام شد و همه فیلم‌های تهیه شده، دارای ویژگی‌های نوری مناسبی بودند و خواص خوراکی بودن فیلم‌های تهیه شده در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز، به وسیله سرین پروتئازها[2] بررسی شد که نشان‌دهنده تجزیه پذیری آسان این فیلم‌ها بود.

شکل(۱A) تأثیر مقدار پروتئین را بر قدرت کششی فیلم‌های کیتوزان – پروتئین آب پنیر در حضور و غیاب آنزیم نشان می‌دهد. بدون حضور آنزیم، افزودن پروتئین آب پنیر به طور معنی‌داری مقاومت مکانیکی فیلم‌های تهیه شده از کیتوزان را کاهش داد. در مقابل، بهبود قابل توجّهی در مقاومت مکانیکی فیلم‌های کیتوزان- پروتئین آب پنیر تهیه شده در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز مشاهده شد. در واقع، یک روند افزایشی در میزان قدرت کششی تا میزان ۰/۲۵ mg پروتئین به ازای هر cm^2 فیلم دیده شد. افزایش بیشتر میزان پروتئین موجب کاهش در قدرت کششی شد که اگر چه نسبت به فیلم‌های تهیه شده از کیتوزان خالص بالاتر بود.

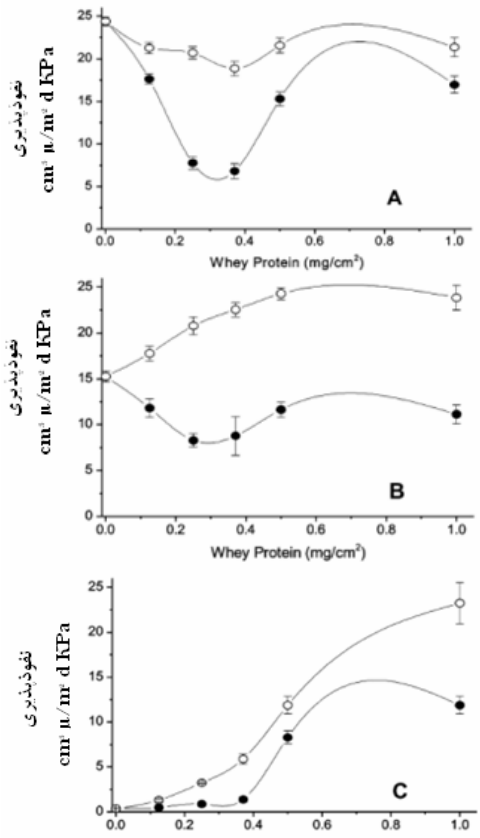
اثر افزودن مقادیر مختلف پروتئین آب پنیر بر حداکثر ازدیاد طول در نقطه شکست فیلم‌های کیتوزان در(شکل ۱B) مشاهده می‌شود. یک کاهش قابل توجّه در انعطاف‌پذیری بسته به افزایش مقدار پروتئین با آنالیز[3]



شکل ۱- تأثیر مقدار پروتئین بر(A) قدرت کششی و (B) ازدیاد طول در نقطه شکست فیلم‌های CWP در حضور(○) و عدم حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز(●)

1- Di Pierro
2- Proteases
3- Analysis

کردن فیلم‌های تهیه شده در حضور و عدم حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز مشاهده شد و اثرات آن در فیلم‌های ساخته شده در حضور آنزیم بیشتر بود. به منظور بررسی تأثیر اتصال عرضی بر خواص ممانعت‌کنندگی فیلم‌های CWP[1]، نفوذپذیری به اکسیژن، دی اکسید کربن و بخار آب، اندازه‌گیری و با فیلم‌های بدون اتصال عرضی مقایسه شد. افزودن پروتئین به ماتریس[2] کیتوزان، به مقدار جزئی نفوذپذیری به اکسیژن را کاهش داد، در حالی که ویژگی‌های ممانعت‌کنندگی به طور مؤثری با استفاده از آنزیم بهبود پیدا کرد(شکل A ۲). نفوذپذیری اندک مشاهده شده در فیلم‌های CWP حاوی ۰/۳۷ mg – ۰/۲۵ پروتئین به ازای هر cm^2 از



شکل ۲- تأثیر مقدار پروتئین بر(A) نفوذپذیری به اکسیژن،(B) نفوذپذیری به دی اکسید کربن و(C) بخار آب در فیلم‌های CWP در حضور(○) و عدم حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز(●)

فیلم قابل توجّه است و رفتار نفوذپذیری مشابهی در فیلم‌ها نسبت به دی اکسید کربن مشاهده شد(شکل B ۲). در مقابل، فیلم‌های CWP تهیه شده بدون حضور آنزیم، نفوذپذیری بیشتری نسبت به CO_2 در مقایسه با فیلم‌های کیتوزانی خالص داشتند. در مجموع، افزودن پروتئین آب پنیر به ماتریس پلی‌ساکاریدی موجب افزایش WVP شده و این اثر به میزان جزئی ولی به طور معنی‌دار در فیلم‌های تهیه شده در حضور آنزیم کمتر بود(شکل 2C).

اگرچه باید متذکّر شد که فیلم‌های حاوی ۰/۳۷ mg – ۰/۱۲۵ پروتئین آب پنیر به ازای هر cm^2 در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز، از نظر نفوذپذیری نسبت به بخار آب مشابه فیلم‌های ساخته شده با کیتوزان خالص داشتند.

نتایج مربوط به ارزیابی خواص مکانیکی نشان داد که مقاومت مکانیکی فیلم‌های تهیه شده تحت تأثیر آب پنیر قرار داشت. افزودن پروتئین کروی به ماتریس[3] پلی‌ساکاریدی موجب تجزیه ساختار سه بعدی فیلم‌های کیتوزانی می‌شود. افزودن آنزیم ترانس گلوتامیناز موجب افزایش مقاومت مکانیکی فیلم‌ها شده و در فیلم‌هایی که مقادیر کمتری پروتئین آب پنیر به آن‌ها افزوده شده بود، مقاومت مکانیکی بیشتر بود. ترانس گلوتامیناز موجب ایجاد اتصال عرضی بین باقی‌مانده‌های گلوتامین و لیزین[4] در پروتئین‌های آب پنیر می‌گردد و ایجاد چنین اتصالاتی، حرکت بین مولکولی زنجیره‌ها را در ماتریس کیتوزان کاهش داده و در نتیجه باعث افزایش قدرت کششی و کاهش کشسانی فیلم‌ها در مقادیر کمتر پروتئین می‌گردد.

علاوه بر این، نفوذپذیری به اکسیژن و دی اکسید کربن فیلم‌های حاوی مقادیر اندک پروتئین و ساخته شده در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز، به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود که به دلیل وجود ساختار فشرده‌تر در نتیجه تشکیل اتصالات عرضی می‌باشد. در فیلم‌های کیتوزانی با مقادیر زیاد پروتئین آب پنیر، نفوذپذیری به بخار آب

1- Chitosan-whey protein
2- Matrix
3- Matrix
4- lysine

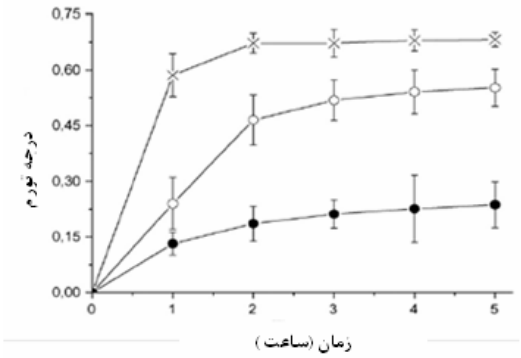
افزایش پیدا کرد. این امر در نتیجه قابل دسترس بودن گروه‌های قطبی جدید به دلیل مقدار بیشتر ساختارهای پلی‌پپتیدی است. بنابراین تغییرات در خواص هیدروفیلیک[1] فیلم‌های کیتوزان – پروتئین آب پنیر که مرتبط با تشکیل اتصالات آمیدی ثانویه به وسیله ترانس گلوتامیناز و با خاصیت هیدروفیلیک کمتر است، عامل اصلی در کمتر بودن نفوذپذیری نسبت به بخار آب در فیلم‌های تهیه شده با آنزیم در مقایسه با فیلم‌های تهیه شده در غیاب آنزیم می‌باشد[١٤].

۳- فیلم‌های کیتوزان – اووآلبومین[2]

دی پیرو و همکاران (۲۰۰۷)، فیلم‌هایی متشکل از کیتوزان و اوآلبومین در حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز و بدون آنزیم تهیه کردند. محلول مورد استفاده برای ساخت فیلم با مخلوط کردن ۱۷٦ µl محلول ۵۰ ٪ (v/v) گلیسرول[3]، کیتوزان (غلظت نهایی ۹/۲ mg /cm^2) و پروتئین سفیده تخم مرغ(mg /cm^2) به دست آمد. در موردد فیلم‌های تهیه شده در حضور آنزیم، ۲۲/۵ U آنزیم ترانس گلوتامیناز افزوده شد و ویژگی‌هایی مانند حلالیت فیلم‌ها در محلول‌های بافری، مقدار تورم، قابلیت هضم توسط تریپسین[4]، ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری به بخار آب اندازه‌گیری شد.

ضخامت فیلم‌های کیتوزان با افزودن جز پروتئینی از µm ۵/۷ ± ۷٦/۳ به µm ۸/٦ ± ۹۲ افزایش پیدا نمود. اگرچه تیمار با آنزیم ترانس گلوتامیناز، فیلم‌هایی با میانگین ضخامت µm ۹ ± ۷٦/۳۸ ایجاد نمود. این کاهش ضخامت مربوط به ماتریس سه بعدی فیلم پس از ایجاد اتصال عرضی است. فیلم‌های تهیه شده با آنزیم پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون[5] در دمای ^0C ۲۵ در محلول‌هایی با pH مختلف نامحلول بودند. به منظور ارزیابی قابلیت‌هضم، فیلم‌های کیتوزان- اووآلبومین تهیه شده با آنزیم تحت تیمار با تریپسین گاوی قرار گرفتند. پس از ۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ^0C ۲۵، مقادیر زیادی پپتیدهای محلول آزاد شد.

سینتیک[6] تورم فیلم‌ها در محلول‌های با pH =۷ در دمای ^0C ۲۵ مورد مطالعه قرار گرفت(شکل ۳). تحت این شرایط، بیشترین مقدار تورم در همه فیلم‌ها پس از ۲ ساعت انکوباسیون به دست آمد. افزودن اووآلبومین به ماتریس کیتوزان موجب تولید فیلم‌هایی با درجه تورم کمتر شد و این درجه تورم به طور قابل توجّهی در اثر تیمار با آنزیم ترانس گلوتامیناز کاهش یافت. درجه تورم یک ماده پلیمری به میزان و نوع واکنش‌های متقابل بین مولکولی زنجیره‌ها بستگی دارد. بنابراین، این امر نشان-دهنده تشکیل اتصال فیزیکی بین ماتریس کیتوزان و مولکول های پروتئینی در فیلم‌های تیمار شده با آنزیم و بدون تیمار است.



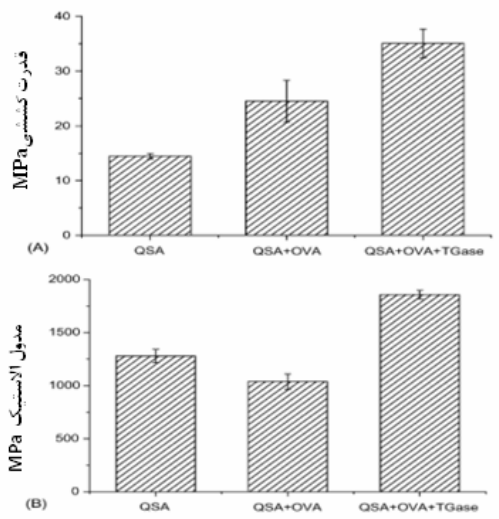
شکل ۳- درجه تورم در دمای ^0C ۲۵ و pH =۷ فیلم‌های کیتوزان و فیلم‌های کیتوزان در حضور (●) و بدون وجود آنزیم ترانس گلوتامیناز (○)

شکل(٤) قدرت کششی و مدول الاستیک[7] را در فیلم‌ها نشان می‌دهد. فیلم‌های تهیه شده از کیتوزان و اووآلبومین میزان قدرت کششی بیشتر و مدول الاستیک کمتری در مقایسه با فیلم‌های تهیه شده از کیتوزن خالص را دارا بودند. این اثر مربوط به تشکیل اتصالات بین مولکولی غیرکووالانسی[8] بین مولکول‌های پروتئین و

1- Hydrophilic
2- Albumin
3- Glycerol
4- Trypsin
5- Incubation

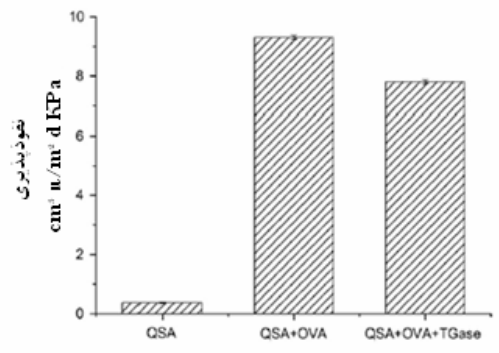
6- Kinetics
7- Modulud of elastic
8- Un Covalent

زنجیره‌های پلی‌ساکارید می‌باشد. از طرف دیگر، بهبود قابل توجّهی در مقاومت مکانیکی و الاستیسیته[1] فیلم‌های تهیه شده در حضور آنزیم مشاهده می‌گردد. این امر ناشی از ایجاد اتصالات کووالانسی[2] بین باقی‌مانده‌های گلوتامین و لیزین[3] موجود در زنجیره‌های پروتئینی می‌باشد. وجود این اتصالات عرضی حرکت زنجیره‌ها را در ماتریس کیتوزان محدود نموده و باعث افزایش قدرت کششی می‌گردد.



شکل ٤ - قدرت کششی (A) و مدول الاستیک (B) فیلم‌های کیتوزان و کیتوزان- اووآلبومین تهیه شده در حضور و عدم حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز (QSA : کیتوزان و OVA : اووآلبومین)

شکل(۵) نفوذپذیری به بخار آب را در فیلم‌ها نشان می‌دهد. افزودن پروتئین به ماتریس کیتوزان به طور قابل توجّهی مقدار wvp[4] را افزایش داد ولی این اثر در فیلم‌های تهیه شده در حضور آنزیم به طور معنی‌داری کمتر بود [۱۵].



شکل ۵- نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های کیتوزان و کیتوزان- اووآلبومین تهیه شده در حضور و عدم حضور آنزیم ترانس گلوتامیناز (QSA : کیتوزان و OVA : اووآلبومین)

٤- فیلم‌های کیتوزان – ژلاتین

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷، اثر اتصال عرضی ایجاد شده توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز و(EDC)[5] بر خاصیت هضم و زیست تخریب‌پذیری ژلاتین[6] ماهی و فیلم‌های کیتوزان – ژلاتین ماهی بررسی شد. (فیلم‌های کیتوزان – ژلاتین (٤:١ w/w) با مخلوط کردن محلول ۲٪ کیتوزان با محلول ۲۵ ٪ ژلاتین تهیه شدند). نشان داده شد که فیلم‌های ژلاتینی اصلاح نشده، تقریباً به طور کامل توسط تریپسین و پروتئیناز N و ٦۰٪ به وسیله پپسین[7]، هیدرولیز[8] شد و همچنین ژلاتین و فیلم‌های ژلاتین – کیتوزان اصلاح شده با ترانس گلوتامیناز حداقل توسط یکی از آنزیم‌های گوارشی هیدرولیز شدند. این نتایج نشان داد که ایجاد اتصال عرضی در فیلم‌های ژلاتینی توسط ترانس گلوتامیناز، به طور معنی‌داری میزان حساسیت به زیست تخریب‌پذیری را تغییر نمی‌دهد و الحاق کیتوزان در فیلم‌های ژلاتینی، مقدار حساسیت ژلاتین به هیدرولیز آنزیمی را نیز کاهش نمی‌دهد. حساسیت فیلم‌های دارای اتصال عرضی ایجاد شده توسط آنزیم و تجزیه به وسیله

1- Elasticity
2- Covalent
3- Lysine
4- Water vapour permeability

5- 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide
6- Gelatin
7- Pepsin
8- Hydrolysis

پروتئیناز N تولید شده به وسیله باسیلوس سبتلیس[1]، نشان داد که این فیلم‌ها می‌توانند در حضور آنزیم‌های پروتئیناز تولید شده به وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف، مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین، فیلم‌های کیتوزان – ژلاتین اصلاح شده آنزیمی قابلیت کاربرد به عنوان فیلم‌های خوراکی زیست تخریب‌پذیر را دارند.

فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین اصلاح نشده ممانعت‌کننده‌های مناسبی در برابر آب نبودند. خاصیت ممانعت‌کنندگی فیلم‌های کیتوزان – ژلاتین ماهی در اثر ایجاد اتصال عرضی توسط EDC و یا ترانس گلوتامیناز بهبود چندانی پیدا نکرد (جدول۱).

جدول۱- نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های کیتوزان، ژلاتین ماهی و کیتوزان- ژلاتین ماهی

اجزای تشکیل‌دهنده فیلم	نفوذپذیری به بخار آب ($g\times mm/KPa\times h\times m^2$)
کیتوزان	[a]۲/۳۱
ژلاتین ماهی	[a]۲/۵٤
ژلاتین ماهی – کیتوزان	[a]۲/٤۲
ژلاتین ماهی – کیتوزان اصلاح شده با EDC	[a]۲/۵۳
ژلاتین ماهی - کیتوزان اصلاح شده با TGase	[a]۲/٤۰
LDPE	۰/۰۰۳

افزودن گلیسرول نیز تا مقدار ۲۰٪، اثری بر نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های اصلاح شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز را نداشت. تنها زمانی که غلظت گلیسرول به ۳۰٪ می‌رسید، نفوذپذیری به بخار آب حدود ۳۵٪ افزایش پیدا می‌کرد. در مورد فیلم‌های اصلاح شده توسط EDC در هیچ یک از مقادیر به کار رفته گلیسرول، نفوذپذیری به بخار آب تغییر ننمود (جدول ۲). این نتایج نشان می‌دهد که ممکن است ایجاد اتصال عرضی توسط مواد شیمیایی، ساختار پلیمر را در مقایسه با اتصال عرضی ایجاد شده توسط آنزیم فشرده‌تر نماید.

جدول ۲- تأثیر گلیسرول بر نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین ماهی

غلظت گلیسرول (٪ جرمی سوبسترا)	نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های اصلاح شده با TGase در غلظت ۰/۲ mg/ml	نفوذپذیری به بخار آب در فیلم‌های اصلاح شده با EDC در غلظت mM ۳۰
صفر	[a]۲/٤۰	[a]۲/۵۳
۲۰	[a]۲/٤۵	[a]۲/۵۰
۲۵	[a]۲/٤۵	[a]۲/٤۵
۳۰	[b]۳/۲٦	[a]۲/۵٦

ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین در (جدول۳) مشاهده می‌گردد. قدرت کششی در فیلم‌های اصلاح نشده MPa ٤٦ بود. قدرت کششی در فیلم‌های اصلاح شده با EDC و آنزیم ترانس گلوتامیناز به ترتیب ٤۰ ٪ و ۲۵ ٪ کاهش یافت(جدول ۳). با این حال، مقدار قدرت کششی در گستره MPa ۱۰۰- ۱۰ بوده و بالاتر از فیلم‌های[2] LDPE است. اصلاح آنزیمی تغییری در میزان ازدیاد طول در فیلم‌ها ایجاد نکرد ولی ایجاد اتصال عرضی توسط EDC موجب افزایش آن از ۲٪ به ۹٪ شد (جدول۳).

گلیسرول[3] در غلظت ۱۵٪، انعطاف‌پذیری در فیلم‌های اصلاح شده توسط آنزیم را تغییر نداد. ازدیاد طول فیلم‌های حاوی گلیسرول در غلظت ۲۰٪، ۸ برابر بیشتر از نمونه‌های بدون گلیسرول بود، اگرچه میزان قدرت کششی ۲/۵ برابر کمتر بود. در فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین حاوی ۲۵٪ و ۳۰ ٪ گلیسرول، مقدار ازدیاد طول ۱٦۷٪ و ٤۲۰٪

1- Bacillus subtilis

2- Low Density Polyethylene

3- Glycerol

بود ولی مقدار قدرت کششی به طور قابل توجّهی کاهش یافت.

فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین اصلاح شده با EDC، ازدیاد طول حدود ۱۱۰٪ در حضور ۱۵٪ گلیسرول داشتند ولی مقدار قدرت کششی حدود ۵ برابر کمتر از فیلم‌های بدون گلیسرول بود. گلیسرول در این غلظت، بر روی ازدیاد طول در فیلم‌های اصلاح شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز تأثیری نداشت(جدول ۳) [۱۶].

جدول ۳- تأثیر گلیسرول بر قدرت کششی و ازدیاد طول در فیلم‌های کیتوزان- ژلاتین ماهی

غلظت گلیسرول (٪ جرمی سوبسترا)	فیلم‌های اصلاح شده با TGase در غلظت ۰/۲ mg/ml		فیلم‌های اصلاح شده با EDC در غلظت ۳۰ mM	
	E(%)	TS(MPa)	*E*(%)	TS(MPa)
صفر [B]	۱/۹	۴۶/۳	۱/۹	۴۶/۳
صفر	۲/۴	۳۵/۳	۸/۸	۲۸/۸
۱۵	۳/۵	۱۵/۱	۱۱۲/۴۵/۷	
۲۰	۲۰	۱۳/۴	۱۱۵/۹	۴/۳
۲۵	۱۶۷/۶	۴/۱	۱۱۷/۹	۳/۷
۳۰	۴۲۰/۱	۱/۸	۱۴/۲	۲/۹

۵- نتیجه گیری

فیلم‌های ساخته شده از کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، ویژگی ممانعت‌کنندگی مناسبی در برابر اکسیژن و دی اکسید کربن دارد ولی از طرفی دارای مقاومت مکانیکی ضعیفی بوده و نسبت به رطوبت حساس است. بنابراین مطالعاتی در زمینه بهبود ویژگی‌های مکانیکی و نفوذپذیری توسط آنزیم ترانس گلوتامیناز صورت گرفته است. استفاده از این آنزیم در فیلم‌های بر پایه کیتوزان موجب ایجاد اتصالات عرضی بین زنجیره‌ها و کاهش تحرک در ماتریس کیتوزان شده و مقاومت کششی را در فیلم‌ها افزایش می‌دهد. علاوه بر این، به دلیل ایجاد ساختاری فشرده‌تر، موجب کاهش نفوذپذیری به گازها و بخار آب می‌گردد و بنابراین استفاده از فیلم‌های خوراکی اصلاح شده با آنزیم ترانس گلوتامیناز پتانسیل زیادی برای استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی دارد.

۶- منابع

1. Kester J.J. and Fennema O.R. (1986)."Edible films and coating: a review". Food Technol. 40:47–59.
2. Briassoulis, D. (2004). "An overview on the mechanical behavior of biodegradable agricultural films". J. Polym. Environ. 12: 65–81.
3. Montgomery, R. (2004)."Development of biobased products". Bioresour. Technol. 91: 1–29.
4. Lacroix, M., Le, T.C.,Ouattara, B.,Yu, H., Letendre, M., Sabato, S.F., Mateescu, M.A., and Patterson, G. (2002). "Use of gamma irradiation to produce films from whey, casein and soy proteins: Structure and functional characteristics". Radiat. Phys. Chem. 63: 827–832.
5. Ghorpade, V.M., Li, H., Gennadios, A., and Hanna, M.A. (1995). "Chemically modified soy protein films". T ASAE 38: 1805–1808.
6. Rhim, J.W. and Weller, C.L. (2000). "Properties of formaldehyde adsorbed soy protein isolate films". Food Sci. Biotechnol. 9: 228–233.
7. Marqui´e, C. (2001)."Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties". J. Agr. Food Chem. 49: 4676–4681.
8. Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. and Rigal, L. (2002). "Effect of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermomoulded films produced from sunflower protein isolate". Polymer 43: 5417–5425.
9. Bourtoom, T. (2009). "Edible protein films: properties enhancement". Int. Food Res. J. 16: 1–9.

10. Stuchell, Y.M. and Krochta, J.M. (1994)."Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films". J. Food Sci. 59: 1332–1337.
11. Chen, T., and Embree, H.D., Wu, L. -Q., Payne, G.F. (2002). "In vitro proteinpolysaccharide conjugation: Tyrosinase catalyzed conjugation of gelatin and chitosan". Biopolymers 64: 292–302.
12. Kieliszek M and Misiewicz. A. (2014)."Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review". Folia Microbiol :59:241–250
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):837-42.
14. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A.E., Masi, P., and Porta, R. (2006). "Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: Analysis of their mechanical and barrier properties". Biomacromolecules **7**: 744–749.
15. Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Masi, P., and Porta R. (2007). "Transglutaminase-catalyzed preparation of chitosan–ovalbumin films". Enzyme Microb. Tech. 40: 437–441.
16. Sztuka, K. and Ko‡odziejska, E.I. (2008). "Effect of transglutaminase and EDC on biodegradation of fish gelatin and gelatin-chitosan films". Eur. Food Res. Technol. 226:1127–1133.

آدرس نویسنده

شـهرک غـرب- بلـوار فرحـزادی- خیابـان شـهید حافظی(ارغوان غربی)- پلاک ٤٦- انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غـذایی کـشور- دانـشکده علـوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شـهید بهشتی- گروه آموزشی علـوم و صـنایع غـذایی- کد پستی ۱۹۸۱٦۱۸۵۷۳.