

بررسی ویژگی‌های فیلم خوراکی بر پایه نانو سلولز باکتریایی اکسید شده با روش TEMPO حاوی پروتئین

هیدرولیز شده حاصل از میوه درخت کاج

نجم الدین پیروسی^۱، پیمان آریایی^{۲*}، مهرو اسماعیلی^۳، محمد احمدی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

* مسئول مکاتبه: Email:p.aryaye@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه فیلم هوشمند و فعال بر اساس سلولز باکتریایی اکسید شده با روش TEMPO حاوی پروتئین هیدرولیز شده دانه کاج تولید شد. بدین منظور ابتدا پروتئین میوه دانه کاج با استفاده از آنزیم تجاری آلکالاز هیدرولیز و سپس غلظت‌های مختلف آن (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) به فیلم نانو سلولز باکتریایی افزوده و ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم‌ها بررسی شد. با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیز شده دارای مقادیر بالای پروتئین (۹۰/۲۱ درصد) و اسید آمینه بود که بالاترین مقادیر اسید آمینه مربوط به آرژنین ۲۱/۸۸ درصد، گلوتامیک اسید ۱۷/۳۳ درصد (اسیدهای آمینه غیر ضروری) و لوسین ۶/۷۵ درصد (اسیدهای آمینه ضروری) بوده است. بر اساس نتایج فیلم‌ها، افزایش غلظت پروتئین، سبب کاهش مقاومت کششی و افزایش کشش تا قبل از نقطه پارگی فیلم، نفوذ پذیری بخار آب و کدورت شد ($P < 0/05$) اما تاثیر معنی‌داری بر رطوبت و حلالیت نداشت ($P > 0/05$). فیلم‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بودند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت افزایش یافت ($P < 0/05$)، و همچنین این فیلم‌ها خاصیت ضد میکروبی بالایی علیه باکتری‌های پاتوژن داشت و خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاتر از *شیرشیاکلی* بود. فیلم نانو سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۱/۵ درصد دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بود ($p < 0/05$). بنابراین به نظر می‌رسد، فیلم نانو سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده میوه کاج به علت دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند در بسته بندی هوشمند محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پپتید زیست فعال، آلکالاز، نانو سلولز باکتریایی، رادیکال آزاد، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیرشیاکلی*

فیلم‌های خوراکی ساخته شده از بیوپلیمرهای طبیعی (پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها) در سال‌های اخیر به دلیل تجزیه پذیری زیستی و پتانسیل‌های آنها برای کاهش مشکلات جدی زیست محیطی مرتبط با مواد پلاستیکی غیر قابل تجزیه زیستی، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۳). سلولز باکتریایی یک شکل بسیار خالص از مواد سلولز تولید شده توسط باکتری *استوباکتر زایلینوم*^۱ است که دارای سطح ویژه بالا، خاصیت مکانیکی عالی و سازگاری زیستی خوب است. این ماده در برخی از خواص مانند خلوص زیاد، بلورینگی و درجه پلیمریزاسیون با سلولز گیاهی تفاوت دارد (۳۹). در سال‌های اخیر، یاف سلولز در الیاف نانو اندازه‌ای جدا شده‌اند که به آنها نانوالیاف سلولزی می‌گویند. نانوالیاف سلولزی را می‌توان با روش‌های شیمیایی و مکانیکی از منابع سلولز جدا کرد. در روش‌های جداسازی شیمیایی از مواد شیمیایی استفاده می‌شود (۱۴، ۳۸، ۴۰). اکسیداسیون سلولز باکتریایی TEMPO^۲ روشی موثر برای شکستن پیوندهای هیدروژنی و تفکیک آنها به نانوالیاف نازک با حفظ مزایای اولیه و گسترش کاربردهای آن است. سلولز باکتریایی اکسید شده TEMPO (TOBC)^۳ برای کاربردهایی نظیر جدا کننده باتری لیتیم، ابرخازن‌ها، مراقبت از پوست، پانسمان زخم و... مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۸). همچنین استفاده از فیلم TOBC به همراه آنتوسیانین استخراج شده از سیب زمینی بنفش به منظور افزایش ماندگاری میگو نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۴۰). به منظور تولید بسته‌بندی فعال جدید برای افزایش کیفیت و ماندگاری محصولات غذایی طی دوره نگهداری، افزودن پروتئین هیدرولیز شده به عنوان یک عامل ضد باکتری طبیعی امری مفید و ضروری می‌باشد. در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری تولید شده‌اند. در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹، ۲۳). گونه‌ی کاج تدا (*Pinus faeda*) نوعی درخت از دسته مخروطیان است، درختی است بزرگ با میوه مخروطی شکل که ارتفاع درخت به ۲۰ تا ۳۰ متر می‌رسد. میوه آن ۱۰ تا ۱۹ سانتی‌متر طول و ۳ تا ۴ سانتی‌متر پهنا دارد. در ابتدا سبز رنگ بوده، ولی موقع رسیدن قهوه‌ای می‌شود، فلس‌های بارور نازک و لوزی تا تخم مرغی شکل و نوک آنها بریده یا دنداندار است و دانه‌ها بین فلس‌های باز قرار گرفته‌اند (۴۱). بیشترین دانه‌های مورد مطالعه مغز بادام، فندق، گردو، پسته و بادام هندی است، با این حال، تنها تعداد کمی از محققان ویژگی‌های دانه کاج را بررسی کرده‌اند. دانه‌های کاج حاوی محتوای بالای پروتئین، اسیدهای چرب اشباع نشده و فیبر غذایی، کربوهیدرات‌های کم مولکولی، ویتامین‌ها، اسید فولیک، نیاسین، آلفا-توکوفرول، مواد معدنی، فیتواسترول‌ها و پلی فنول‌ها می‌باشند (۳۰، ۳۵). دانه کاج همچنین غنی از اسیدهای آمینه به ویژه اسیدهای آمینه ضروری که در بسیاری از موارد کمیاب هستند، مانند لایزین، متیونین و ترئونین می‌باشد، به همین دلیل، یکی از منابع مهم و با ارزش پروتئین‌های گیاهی به شمار می‌رود. با توجه به اینکه دانه کاج با داشتن ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای بالا، اثرات مفیدی روی سلامتی انسان داشته و در عین حال منبع پروتئینی ارزان قیمتی است که سالانه به مقدار زیادی در سراسر جهان، به صورت ضایعات از دست می‌رود، می‌توان به منظور مصارف انسانی، استخراج و یا هیدرولیز کرده و در فرمولاسیون مواد غذایی به کار برد (۲۱، ۴۱). هدف از انجام این تحقیق، بررسی امکان تولید فیلم خوراکی برپایه نانو سلولز باکتریایی حاوی

^۱ *Acetobacter xylinum*

^۲ ۲,۲,۶,۶ tetramethylpiperidine-1-oxyl radical

^۳ TEMPO-oxidized bacterial cellulose

پروتئین هیدرولیز شده میوه دانه کاج بوه است و سپس خصوصیات فیزیکی و مکانیکی مانند نفوذپذیری نسبت به بخار آب، حلالیت فیلم، شفافیت و ضخامت و مقاومت کششی فیلم خوراکی مورد بررسی قرار گرفت.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

بسیست عدد مخروط گونه‌ی کاج تدا در منطقه آستارا (ایران) از پنج اصله درخت تقریباً هم سن از یک منطقه جنگل کاری شده تهیه و به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خزر منتقل گردید. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) از شرکت نووازیم (دانمارک) تهیه و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش که از شرکت مرک آلمان تهیه شده بود، از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

دانه کاج توسط آسیاب کاملاً خرد شده و بصورت آرد (با اندازه ذرات مش ۴۰) در آمد و تا زمان استخراج پروتئین در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور استخراج پروتئین خام، آرد دانه کاج با بافر ۰/۱ مولار تریس-HCL در pH ۹ به نسبت ۱:۲۰ (w:v) با هم مخلوط شدند و این مخلوط در حمام آبی متحرک در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه با دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. غلظت پروتئین با استفاده از سرم آلبومین گاوی (^۱BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۵). سپس به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده، پیش تیمار حرارتی با حرارت دادن پروتئین خام در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه تولید شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز (۸/۵)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، در ادامه آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه گیری (زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۱۸۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پروتئین-های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، پس از این مرحله با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشور کره) بصورت پودر درآمد (۲۴، ۲۵).

۲-۳-درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (^۲TCA) اندازه گیری شد. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰rpm و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۲۴):

فرمول ۱:

^۱ Bovine Serum Albumin

^۲ Trichloro acetic acid

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد / میزان پروتئین در نمونه) = درجه هیدرولیز

۲-۴- ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۲۵).

۲-۵- تهیه فیلم نانوالیاف سلولز (TOBC)

نانو الیاف سلولز باکتریایی اکسید شده با روش اکسیداسیون با واسطه TEMPO در دمای اتاق مطابق روش گزارش شده توسط ایگوساکی^۱ و همکاران، (۱۷) تولید شد. سلولز باکتریایی در محلول ۰/۱ مولار NaOH در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد جوشانده و با آب یونیزه (DI) شستشو داده شد تا اینکه pH خنثی و محیط باقیمانده و سلولهای چسبیده حذف شوند. سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در خشک کن انجمادی قرار داده شد. ۰/۵ گرم از سلولز باکتریایی خشک شده به قطعات کوچک بریده و توسط یک هموژنایزر با سرعت بالا (۴۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون نانوالیاف خرد شدند. سوسپانسیون نانوالیاف باکتری سلولز با افزودن ۱/۲۵ mg/ml آب دیونیزه رقیق و سپس ۰/۱ گرم NaBr و ۰/۰۱ گرم TEMPO سوسپانسیون اضافه، و واکنش با ریختن ۴۰ میلی لیتر NaClO ۱۴٪ تحت هم زدن مداوم آغاز شد. مقدار pH با افزودن محلول NaOH ۰/۵ مولار در محدوده ۱۰-۱۰/۵ ثابت شد واکنش با افزودن ۱۰ میلی لیتر اتانول پایان یافت و الیاف با محلول ۰/۱ مولار HCL اسیدی و سپس TOBC ۳ بار با آب دیونیزه شسته شد. در نهایت، آب دیونیزه به TOBC افزوده شد تا غلظت ۱ درصد به دست آید و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای تهیه فیلم های نانو الیاف سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده، ۱۰۰ گرم سوسپانسیون ۰/۱ درصد TOBC، غلظت های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) در یک بشر ریخته و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت با دور ۶۰۰ بر روی دستگاه مغناطیسی هم زده شد. همزن مخلوط از طریق غشای استات سلولز (۰/۲۲ میکرومتر اندازه منافذ، قطر ۴۷ میلی متر) با فیلتراسیون خلاء تحت فشار منفی در ۰/۱- مگاپاسکال فیلتر شد. پس از جدا کردن غشای فیلتر، فیلم های به دست آمده به مدت ۳ روز در دمای اتاق خشک و در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شدند (۴۰).

۲-۶- اندازه گیری خواص فیزیکی فیلم ها

۲-۶-۱- اندازه گیری ضخامت

ضخامت نمونه ها با یک میکرومتر دیجیتالی (۰/۰۰۱ میلی متر، Mitutoyo ساخت ژاپن) اندازه گیری شد. اندازه گیری ها در پنج نقطه از هر نمونه تکرار شد. میانگین ضخامت محاسبه شده و در تعیین مقاومت کششی و نفوذ پذیری به بخار آب استفاده گردید (۱).

¹ Isogai

۲-۶-۲- اندازه گیری میزان رطوبت

قطعه‌های فیلم در ابعاد ۳×۳ میلی متر بریده شد و هر کدام وزن گردید. مقدار اندازه گیری شده به عنوان وزن اولیه قرار داده شد. سپس قطعه‌های نمونه در آون ۹۰ درجه سانتی گراد تا رسیدن به وزن خشک نهایی قرار داده شد، در ادامه نمونه‌ها وزن و مقدار به عنوان وزن خشک در نظر گرفته شد (۴۲).

۲-۶-۳- ارزیابی حلالیت فیلم در آب

برای تعیین حلالیت، فیلم‌ها در قطعات ۳×۲ سانتی متر بریده شد و سپس در دیسکاتور حاوی سیلکاژل به مدت ۲ روز قرار داده شدند. پس از طی این مدت فیلم‌ها با استفاده از ترازوی با دقت یک هزارم گرم توزین شده و در بشر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفتند (۴۲). درصد حلالیت از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \text{وزن خشک اولیه} / (\text{وزن خشک نهایی} - \text{وزن خشک اولیه}) = \text{درصد حلالیت}$$

۲-۶-۴- اندازه گیری نرخ عبور بخار آب از درون فیلم‌ها (WVP)

برای انجام این آزمایش از روش شماره ۹۶ E مصوب ASTM استفاده گردید (۱). برای انجام آزمایش درون سلول‌های اندازه گیری نفوذپذیری، آب ریخته شد. سپس سطح سلول بوسیله روکش با استفاده از پارافین مذاب پوشانده شد. سلول‌ها درون دیسکاتور حاوی سیلکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد می‌کند. اختلاف رطوبت در دو سمت روکش در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرادیانت فشار بخاری معادل $103 \times 2/337$ پاسکال ایجاد می‌کند. تغییرات وزن سلول‌ها طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه گیری شد. در تمام نمونه‌ها با رسم منحنی تغییرات وزن سلول نسبت به زمان، یک خط راست ($R^2 > 0/99$) حاصل شد. نرخ انتقال بخار آب معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول بود و از رابطه زیر حاصل شد. سطح سلول‌ها ۰/۰۰۲۸۷ متر مربع بود.

$$\text{سطح سلول} / \text{شیب خط} = \text{نرخ انتقال بخار آب}$$

۲-۶-۵- کدورت

نمونه‌های فیلم به صورت چهار گوش بریده شدند و در سمت درونی سلول اسپکتروفتومتر (طیف نورسنج) قرار گرفتند. طیف جذب (۲۰۰-۸۰۰ نانومتر) برای هر نمونه با بکار گیری اسپکتروفتومتر، ثبت شد و کدورت فیلم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۷):

$$\text{ضخامت فیلم (میلی متر)} / \text{جذب در طول موج } 600 \text{ نانومتر} = \text{کدورت فیلم}$$

۲-۷- اندازه گیری خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون‌های مکانیکی فیلم‌ها بر اساس روش اصلاح شده ASTM D0882-۰۲ صورت گرفت. فیلم‌ها در قطعات ۷۶۱ cm بریده و تحت شرایط رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد مشروط شدند. ضخامت آنها در ۵ نقطه اندازه گیری و ضخامت متوسط آنها تعیین شد. ویژگی‌های مکانیکی فیلم (میزان کشش پذیری (درصد) و مقاومت به کشش (مگاپاسکال)) با استفاده از اینستران اندازه گیری شد. در دستگاه اینستران فاصله بین دو فک ۵۰ mm، سرعت حرکت فک بالایی ۵۰ میلی متر بر دقیقه و فک پایینی ثابت بود (۱).

¹-Water vapor permeability

۲-۸- اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم‌ها

درصد به دام اندازی رادیکال (۲-۲- دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل) DPPH با استفاده از روش تغییر یافته سیرپاتوران و هارت^۱ (۳۶) انجام گرفت. ۲۵ میلی گرم از فیلم در ۳ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۵ دقیقه به آرامی هم زده شد. سپس ۸/۲ میلی لیتر از عصاره فیلم به لوله های آزمون حاوی ۰/۲ میلی لیتر محلول یک میلی مولار DPPH در متانول افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در اتاق نگهداری شد. میزان جذب لوله های آزمون و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. درجه بی رنگ شدن این ترکیب بیانگر قدرت به دام اندازی رادیکال آزاد توسط آنتی اکسیدان مربوطه می باشد. در نهایت با استفاده از فرمول زیر، درصد فعالیت به دام اندازی رادیکال های آزاد DPPH تعیین شد.

$$100 \times \left[\frac{\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان جذب کنترل}}{\text{میزان جذب کنترل}} \right] = \text{درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد DPPH}$$

۲-۹- اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

سوش میکروب های *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189) و *شرشیاکلی* (PTCC 1399) از کلکسیون میکروبی دانشگاه تهران تهیه گردید. ابتدا به کمک لوپ استریل، مقداری از هر باکتری را از داخل آمپول های استریل حاوی آن برداشته و به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت BHI Broth اضافه شد. محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرمخانه گذاری و پس از طی این مدت از لوله ها با استفاده از لوپ استریل روی محیط کشت Nutrient Agar کشت خطی داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، گرمخانه گذاری گردید. ۳ تا ۵ کلنی که به خوبی ایزوله شده بود و شکل یکسانی داشت، با استفاده از سواب استریل، به لوله های حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی انتقال داده شد. به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ کدورت سوسپانسیون ها مورد بررسی قرار گرفت. وقتی کدورت در حد نیم مک فارلند، که معادل جمعیتی در حدود 10^8 CFU/g^۸ رسید، بعد از حدود ۱۵ دقیقه سوسپانسیون، آماده تلقیح شد. با استفاده از سواب استریل، از هر کدام از لوله های حاوی سوسپانسیون روی محیط های اختصاصی خود کشت داده شد، به طوری که تمام سطح پلیت با سوسپانسیون آغشته گردید. برای این کار هر بار ۶۰ درجه پلیت چرخانده شده و در آخر دور پلیت نیز تلقیح شد تا تراکم مطلوب به دست آید (۷). برای انجام آزمون های تشخیص فعالیت ضد میکروبی، فیلم ها به شکل دیسک های دایره ای به قطر ۶ میلی متر با استفاده از چاقوی دایره ای بریده شد. با استفاده از روش Agar diffusion فیلم های خوراکی بریده شده به قطر ۶ میلی متر را روی محیط های کشت تلقیح شده با سوسپانسیون در فاصله مناسب با هم جاگذاری شده و پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از طی مدت زمان مورد نظر، قطر هاله شفاف در اطراف فیلم بر اساس میلی متر گزارش شد (۷).

۲-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان اختلاف معنی داری میانگین ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

^۱-Siripatrawan and Harte

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر پروتئین و درجه هیدرولیز

مقادیر پروتئین ابتدایی دانه کاج $28/3 \pm 0/78$ درصد و مقادیر پروتئین در زمان ۱۸۰ دقیقه برابر با $90/21 \pm 3/12$ درصد بوده است. درجه هیدرولیز به عنوان یک پارامتر ناظر بر میزان هیدرولیز پروتئین مورد استفاده قرار می گیرد، این فاکتور بیشتر به عنوان یک شاخص جهت مقایسه میان پروتئین های هیدرولیز شده ی مختلف کاربرد دارد. روند هیدرولیز (جدول ۱) در ۹۰ دقیقه اول با سرعت بیشتری انجام شد و سپس سرعت هیدرولیز تا پایان آزمایش کند شد و با افزایش زمان هیدرولیز، در زمان ۱۵۰ دقیقه بهبود قابل توجهی در درجه هیدرولیز مشاهده نشد. که نشان می دهد که حداکثر شکافتگی پپتیدها در طول ۹۰ دقیقه هیدرولیز رخ داده است. اما در مجموع بالاترین مقادیر درجه هیدرولیز در زمان ۱۵۰ دقیقه مشاهده شد و در این زمان اختلاف معنی داری با زمان ۱۸۰ دقیقه نداشت. این نتایج با نتایج هیدرولیز گلوتن گندم (۲۰) و هیدرولیز زرده تخم مرغ (۲) مطابقت داشت.

جدول ۱: مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده

آزمون	درجه هیدرولیز
زمان هیدرولیز	
۳۰	$24/75 \pm 0/94^c$
۶۰	$34/69 \pm 0/61^d$
۹۰	$42/25 \pm 0/78^c$
۱۲۰	$45/78 \pm 0/45^b$
۱۵۰	$46/99 \pm 0/75^a$
۱۸۰	$47/01 \pm 0/28^a$

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین $\pm$ انحراف از معیار)

(۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند. (a, b, c, ...)

۳-۲- ترکیب اسید آمینه

در مطالعه حاضر (جدول ۲) ۱۷ اسید آمینه شناسایی شد که از میان آنها ۸ اسید آمینه ضروری و ۹ اسید آمینه غیر ضروری بوده اند. بر اساس نتایج بدست آمده، بالاترین مقادیر اسید آمینه مربوط به آرژنین $21/88$ درصد و پس از آن گلوتامیک اسید $17/33$ درصد (اسیدهای آمینه غیر ضروری) و سپس لوسین $6/75$ درصد (اسیدهای آمینه ضروری) بوده است. در مجموع، پروتئین های دانه کاج سرشار از آرژنین و گلوتامیک اسید گزارش شده اند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۲۱). Matthäus و همکاران، (۲۱) به بررسی ترکیبات اسید آمینه ۴۱ نمونه دانه کاج (با ۲۲ گونه متفاوت) پرداختند، آنها نیز اعلام نمودند ۱۷ اسید آمینه در دانه کاج موجود می باشد که بالاترین اسید آمینه دانه کاج مربوط به آرژنین و پس از آن گلوتامیک اسید می باشد. اسیدهای آمینه آبرگیز (HAA^1) (فیل آلانین، پرولین، متیونین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین) و اسیدهای آمینه آروماتیک (AAA^2) (فیل آلانین، هیستیدین، تریپتوفان، تیروزین)، مسئول اغلب خواص کاربردی و زیستی پروتئین های هیدرولیز شده

¹-Hydrophobic amino acids

²-Aromatic amino acids

همچون فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطان و کاهش قند و فشار خون می باشند (۱۳، ۴۳). مجموع اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک در مطالعه حاضر به ترتیب برابر با ۲۹/۹۰ و ۹/۱۷ بوده است. با توجه با مقادیر بالای آنها هیدرولیز تولیدی می توان انتظار اثرات زیست فعال بودن آنان را در میزبان داشت. همچنین مقادیر ایزولوسین، لوسین، تروئین، والین، هیستیدین و تیروزین بالاتر از توصیه های FAO^۱/WHO^۲ (۸) برای پروتئین های حیوانی می باشد (به جز فنیل آلانین و لایزین) بنابر این به نظر می رسد پروتئین دانه کاج از کیفیت غذایی مناسبی برخوردار هستند و می تواند به عنوان منبع پروتئین در رژیم غذایی دام و طیور نیز مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۲: ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	FAO/ WHO, 1990
هیستیدین ^۱	۲/۶۶	۱/۹
ایزو لوسین ^۱	۲/۸۵	۲/۸۰
لوسین ^۱	۶/۷۵	۶/۶۰
لایزین ^۱	۲/۵۹	۵/۸۰
متیونین ^۱	۱/۳۰	
فنیل آلانین ^۱	۳/۷۸	۶/۳۰
تروئین ^۱	۳/۴۵	۳/۴
والین ^۱	۳/۵۹	۳/۵
آسپارتیک اسید	۵/۷۸	
آرژنین	۲۱/۸۸	
پرولین	۵/۵۷	
سرین	۵/۱۳	
آلانین	۳/۳۳	
سیستین	۳/۴۷	
گلوتامیک اسید	۱۷/۳۳	
تیروزین	۲/۷۳	۱/۱
گلايسين	۵/۸۴	
HAA ^۲	۲۹/۹۰	
AAA ^۲	۹/۱۷	
میزان اسید آمینه کل		۹۸/۰۳

^۱ اسید آمینه ضروری

^۲ مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تربیتوفان، پرولین، متیونین و سیستین)

^۳ مجموع مقادیر اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین، هیستیدین، تربیتوفان و تیروزین)

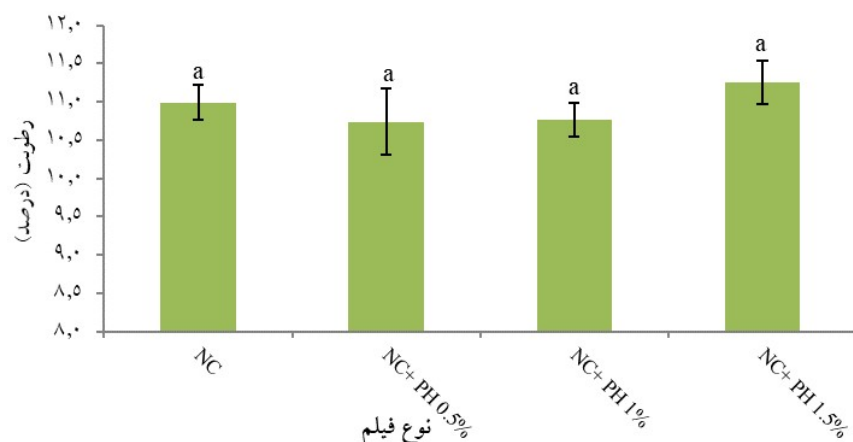
^۱ Food and Agriculture Organization

^۲ World Health Organization

۳-۳- ویژگی های فیزیکی فیلم

۳-۳-۱- بررسی مقادیر رطوبت و حلالیت

مقادیر رطوبت (نمودار ۱) در مطالعه حاضر مابین ۱۰/۹۹-۱۱/۲۵ درصد بوده است. افزودن پروتئین هیدرولیز شده دانه کاج تاثیر معنی داری بر مقادیر رطوبت نداشته است. این نتایج با نتایج سالگودا^۱ و همکاران (۳۱) در ارتباط با فیلم مرکب دانه سویا و پروتئین آفتاب گردان حاوی پروتئین هیدرولیز شده پلاسما هم خوانی دارد. آنها نیز اعلام نمودند افزودن پروتئین هیدرولیز شده تاثیر بر مقادیر رطوبت فیلم نداشت. همچنین دی الیورا^۲ و همکاران (۵) اعلام نمودند افزودن پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلزینات تاثیر معنی داری بر مقادیر رطوبت فیلم ندارد. مقادیر رطوبت در مطالعه آنها مابین ۱۲/۲۲-۱۰/۷۵ درصد بوده است.



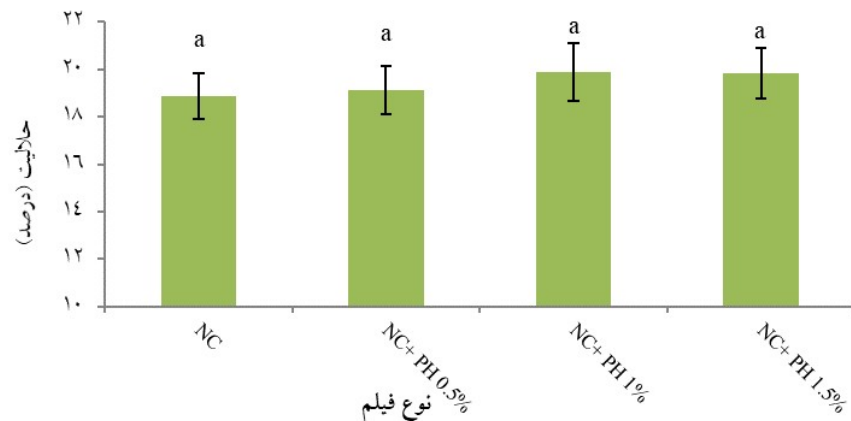
نمودار ۱: درصد رطوبت در فیلم ها

حلالیت و محتوی رطوبت دو فاکتور مهم فیلم های زیست تخریب پذیر می باشند که بر مقاومت فیلم به آب به ویژه در محیط های مرطوب تاثیر گذار می باشند. نتایج مربوط به حلالیت (نمودار ۲) و رطوبت در مطالعه حاضر با هم، هم خوانی داشت. اختلاف معنی داری در مقادیر حلالیت در فیلم های مختلف مشاهده نشد و مقادیر حلالیت ما بین ۱۸/۸۸-۱۹/۸۴ بوده است. بنابراین حلالیت فیلم نانو سلولز با افزودن پروتئین هیدرولیز شده نیز تغییر معنی داری نکرده است ($P > 0.05$). این نتایج با نتایج Giménez و همکاران (۱۲) فیلم ژلاتین پوست گل ماهی مرکب^۳ (*Dosidicus gigas*) حاوی ژلاتین هیدرولیز شده ماهی مرکب هم خوانی دارد. آنها نیز اعلام نمودند افزودن ژلاتین هیدرولیز شده در سطح ۱۰-۰ درصد تاثیری بر مقادیر حلالیت فیلم نداشت. همچنین این نتایج با نتایج دی الیورا و همکاران (۵) پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلزینات و نتایج با نتایج سالگودا و همکاران (۳۲) در ارتباط با فیلم پروتئین آفتاب گردان هم خوانی دارد.

¹ Salgado

² De Oliveira

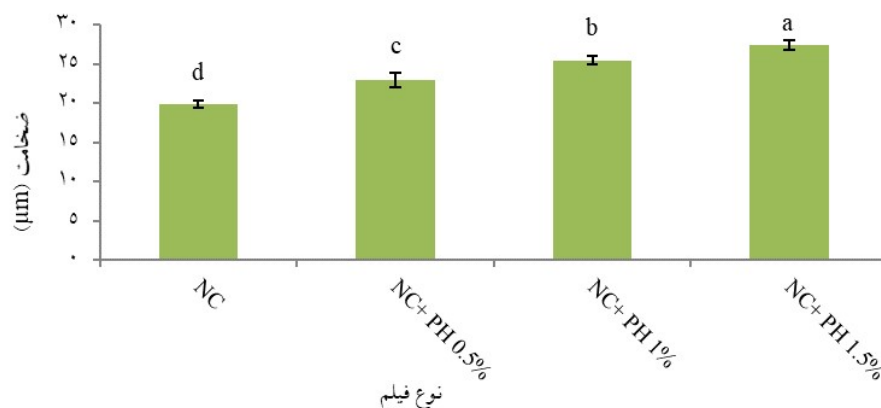
³ Elaborated squid



نمودار ۲: درصد حلاطیت در فیلم ها

۳-۳-۲- بررسی ضخامت فیلم ها

ضخامت از فاکتورهای مهم فیلم است که به طور مستقیم روی ویژگی های بیولوژیکی و ماندگاری محصول بسته بندی شده تأثیر می گذارد. همچنین یک عامل اساسی است که بر خواص مکانیکی، شفافیت و WVP فیلم ها نیز تأثیر می گذارد (۶). نتایج مربوط به مقادیر ضخامت (نمودار ۳) در مطالعه حاضر نشان داد با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم میزان ضخامت افزایش یافت به طوری که کمترین مقادیر ضخامت در فیلم نانوسلولز بوده است (۱۹/۹۴ میکرومتر) و بیشترین مقادیر در فیلم نانو سلولز+ پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵ درصد مشاهده شد (۲۷/۴۵ میکرومتر) ($P < 0.05$). علت این امر، احتمالاً به دلیل افزایش محتوای جامد پس از افزودن پروتئین هیدرولیز شده می باشد، که نتایج مشابهی توسط دی الیورا و همکاران (۵) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات و قاسمی^۱ و همکاران (۱۱) در ارتباط با فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده اسکلت کپور نقره ای ماهی مشاهده شد.

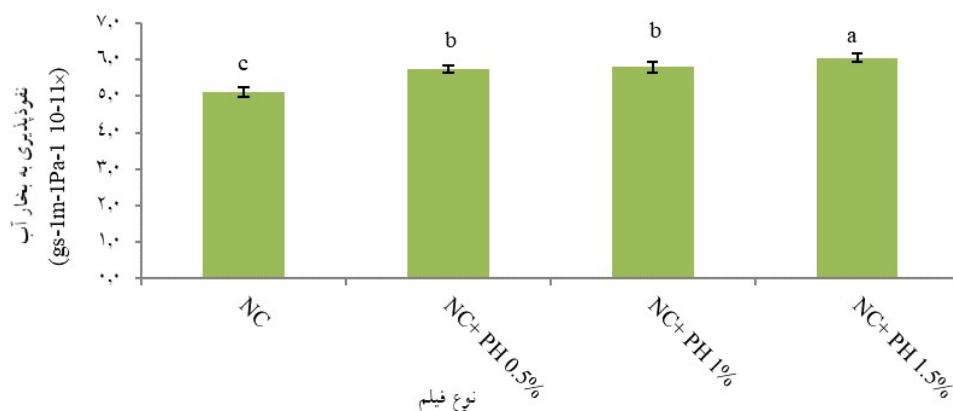


نمودار ۳: ضخامت فیلم ها

^۱-Ghasemi

۳-۳-۳- بررسی نفوذ پذیری به بخار آب WVP

یکی از مهم ترین عوامل در تعیین مناسب بودن یک فیلم جهت بسته بندی مواد غذایی، نفوذپذیری بخار آب (WVP) می باشد، یکی از علل افت کیفیت ماده غذایی، مبادلات رطوبت بین ماده غذایی و محیط اطراف آن است و فیلم باید از انتقال رطوبت جلوگیری کند و یا آن را کاهش دهد (۴). به طور کلی عوامل مختلفی مانند نوع ترکیبات و میزان برهمکنش بین آنها، ضخامت، حلالیت و نفوذپذیری مولکول های بخار آب در ماتریس فیلم بر میزان WVP تأثیر می گذارد (۱۱). نتایج مربوط به مقادیر WVP (نمودار ۴) در مطالعه حاضر نشان داد با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم میزان WVP افزایش یافت به طوری که کمترین مقادیر WVP در فیلم نانوسلولز بوده است ($-11 \text{ gs}\cdot\text{lm}\cdot\text{lPa}$ $5/12 \times 10$) و بیشترین مقادیر در فیلم نانو سلولز + پروتئین هیدرولیز شده $1/5$ درصد مشاهده شد ($-11 \text{ gs}\cdot\text{lm}\cdot\text{lPa}$ $6/05 \times 10$) ($P < 0/05$). علت این امر، دارا بودن اثر پلاستی سایزری پروتئین هیدرولیز شده با وزن مولکولی کم می باشد. وجود پروتئین منجر به افزایش گروه های آبدوست در ساختار فیلم شده و متعاقباً وجود مولکول های آب بیشتر در آن منجر به افزایش WVP فیلم می شود همچنین افزایش ضخامت لایه های پروتئین هیدرولیز شده نیز بر مقادیر WVP تأثیر گذار می باشد (۵، ۱۱). نتایج مشابهی توسط دی الیورا و همکاران (۵) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات و قاسمی و همکاران (۱۱) در ارتباط با فیلم کربوکی متیل سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده اسکلت کپور نقره ای ماهی، مشاهده شد.

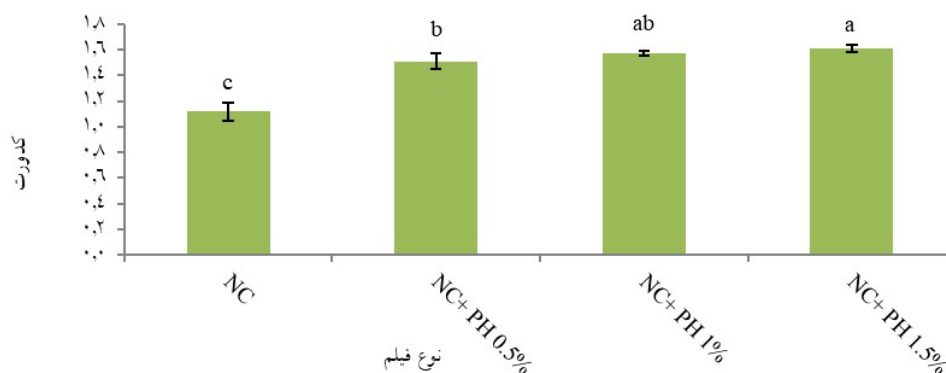


نمودار ۴: نفوذپذیری فیلم ها در برابر بخار آب

۳-۳-۴- بررسی مقادیر کدورت

ویژگی های نوری فیلم ها، مانند رنگ، شفافیت و عبور نور، ویژگی های مهمی هستند که بر ظاهر، پذیرش، تجاری سازی، بازارپسندی و مناسب بودن آنها برای کاربردهای مختلف تأثیر می گذارند. نتایج مربوط به مقادیر کدورت (نمودار ۵) در مطالعه حاضر نشان داد با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم میزان کدورت افزایش یافت به طوری که کمترین مقادیر کدورت در فیلم نانوسلولز بوده است ($1/12$) و بیشترین مقادیر در فیلم نانو سلولز + پروتئین هیدرولیز شده $1/5$ درصد مشاهده شد ($1/61$) ($P < 0/05$). افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب افزایش کدورت فیلم می شود، بنابراین شفافیت را کاهش و کدورت را افزایش می دهد (۱۱). نتایج مشابهی توسط دی الیورا و همکاران (۵) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات مشاهده

شد، آنها اعلام نمودند افزایش پراکندگی نور (یعنی کاهش شفافیت) در ارتباط با افزایش تجمع پروتئین در فیلم آلزینات می باشد. تغییرات در شفافیت فیلم ممکن است سبب کاهش تقاضا مصرف کننده ها باشد، اما سرعت انتقال نور مرئی کم یک مزیت برای بسته بندی مواد غذایی است زیرا وجود نور می تواند باعث تغییرات رنگ و طعم، از دست دادن مواد مغذی و در نهایت فساد اکسیداتیو مواد غذایی شود.

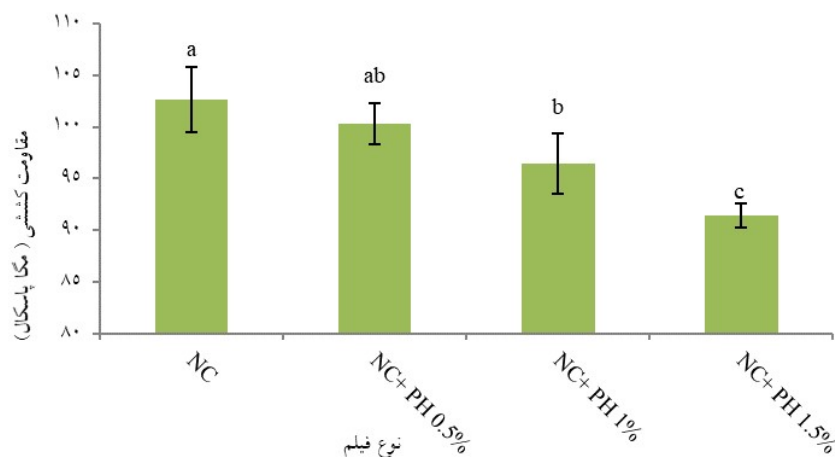


نمودار ۵: کدورت فیلم‌ها

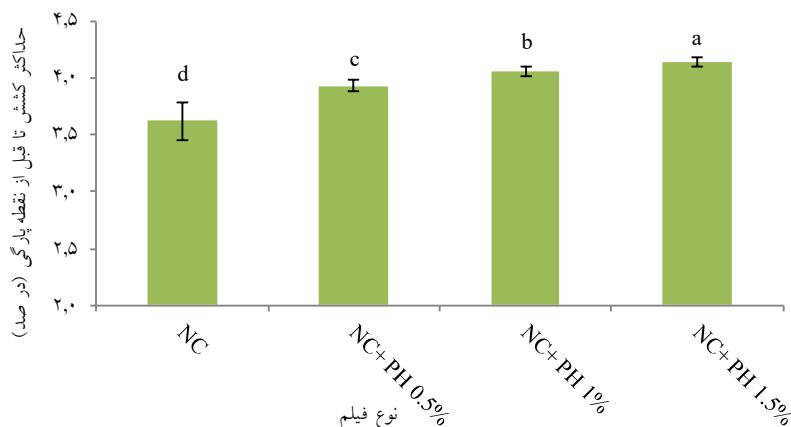
۳-۴- بررسی ویژگی‌های مکانیکی فیلم

خواص مکانیکی بیانگر قدرت فیلم برای حفظ یکنواختی ماده غذایی بسته بندی شده است. خواص مکانیکی فیلم‌های خوراکی تحت تأثیر نوع و غلظت فیلم، حلال و نرم کننده، روش تولید فیلم، رطوبت نسبی، دمای اندازه گیری و پوشش دهی با سایر زیست پلیمرها قرار دارد. معمولاً با افزودن مواد ضد میکروبی خواص کششی فیلم های زیست تخریب پذیر تضعیف می گردد (۱۹). مقادیر مقاومت کششی (نمودار ۶) در فیلم نانو سلولز برابر با ۱۰۲/۶۲ مگاپاسکال و حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی در فیلم نانو سلولز ۳/۶۲ در صد بوده است که نشان دهنده رفتار مکانیک مناسب فیلم نانو سلولز می باشد، این نتایج تقریباً با نتایج Wen و همکاران (۴۰) در ارتباط با فیلم سلولز باکتریایی هم خوانی داشت آنها مقادیر مقاومت کششی را ۱۱۳/۳۰ مگاپاسکال و حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی ۲/۳۱ درصد اعلام نمودند. افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب کاهش مقاومت کششی و افزایش حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی شد ($P < 0.05$) به طوریکه کمترین میزان مقاومت کششی و بیشترین میزان حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی (نمودار ۷) در فیلم نانو سلولز+ پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵ درصد مشاهده شد (به ترتیب ۹۱/۴۲ مگاپاسکال و ۴/۱۴ درصد). جیمز^۱ و همکاران، (۱۲) اعلام نمودند، پپتیدهای کوچک برهمکنش زنجیره به زنجیره ضعیف تری را با پیوند هیدروژنی ایجاد می کنند. خواص مکانیکی فیلم‌ها ارتباط نزدیکی با توزیع و چگالی برهم کنش های درون و بین مولکولی بین زنجیره های پلیمری در شبکه های فیلم دارد. بنابراین، افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم نانو سلولز می تواند با کاهش نیروهای بین مولکولی و افزایش تحرک زنجیره های پروتئینی، بر خواص مکانیکی لایه ها تأثیر بگذارد (۱۲).

^۱-Giménez



نمودار ۶: مقاومت کشتی فیلم‌ها



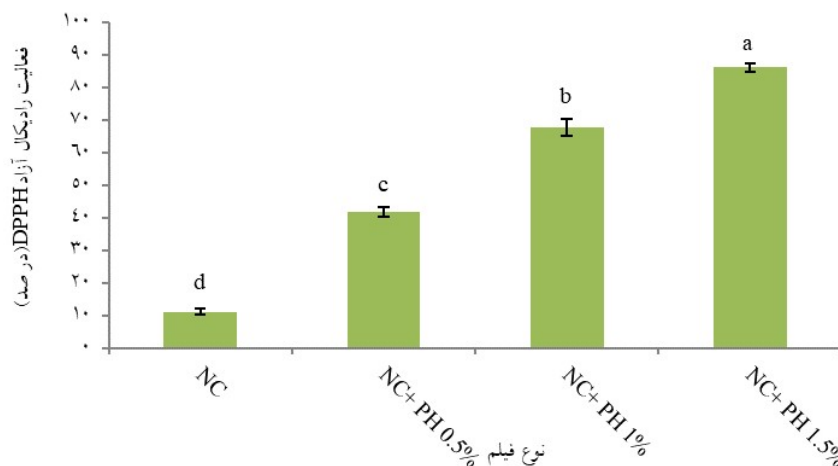
نمودار ۷: حداکثر کشت تا قبل از نقطه پارگی فیلم‌ها

۳-۵- اندازه‌گیری خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم‌ها

با توجه به نتایج کمترین مقادیر خاصیت آنتی اکسیدانی (نمودار ۸) در فیلم نانوسلولز بوده است. با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم مهار رادیکال آزاد DPPH^۱ فیلم‌ها افزایش یافت و با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری مشاهده شد. به طوری که بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH فیلم‌ها در فیلم نانو سلولز + پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵ درصد مشاهده شد (۸۶/۰۷ درصد) ($P < ۰/۰۵$). علت این امر، خاصیت آنتی اکسیدانی پپتیدها می‌باشد. پپتیدها با شکستن زنجیره واکنش‌های رادیکال آزاد می‌توانند سرعت فرآیندهای اکسیداسیون آنزیمی و غیر آنزیمی را کاهش دهند. پپتیدهای آنتی اکسیدانی به طور کلی از ۳ تا ۱۶ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و اجزای اصلی آنها هیستیدین، متیونین، تیروزین، سیستئین و لایزین است که این اسیدهای آمینه قدرت ضد اکسایشی بالایی دارند (۳۴، ۳۷). دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی در پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال گیاهی، نظیر کلزا، هسته انگور، کنجاله کنجد و جوانه شبدر در شرایط آزمایشگاهی توسط

^۱ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

سایر محققین نیز گزارش شده است (۱۰، ۲۲، ۲۳، ۳۹). دی‌الورا و همکاران (۵) نشان داد که افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه در فیلم‌های آلزینات، سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها (افزایش ظرفیت حذف رادیکال DPPH) می‌شود.



نمودار ۸: خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

۳-۶- اندازه‌گیری خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها

مکانیسم اثر پیتید ضد میکروبی عمدتاً مبتنی بر تعامل الکترواستاتیکی پیتیدها با غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها است. پیتیدهای ضد میکروبی با عملکرد نفوذپذیری غشاء مشخص می‌شوند. آنها می‌توانند وارد غشاء شوند و در نتیجه آن را مختل کنند. با توجه به نتایج (جدول ۳) کمترین مقادیر خاصیت ضد میکروبی در فیلم نانوسلولز بوده است با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها علیه هر دو باکتری (*شیرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) در فیلم نانو سلولز + پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵ درصد مشاهده شد. پتانسیل ضد میکروبی فیلم‌های حاوی پیتیدها ممکن است به دلیل زیست فعال بودن آنها باشد مکانیسم اثر ضد میکروبی پیتیدها عمدتاً مبتنی بر تعامل الکترواستاتیکی پیتیدها با غشای سلولی میکروارگانیسم‌ها است. پیتیدهای ضد میکروبی با عملکرد نفوذپذیری غشاء، می‌توانند وارد غشاء شوند و در نتیجه آن را مختل کنند. این تغییرات باعث عدم تعادل در محتویات سلولی می‌شود که فرآیندهای همانندسازی، رونویسی و ترجمه توالی DNA را با اتصال به اهداف خاص درون سلولی، از نظم خارج می‌کند (۵، ۲۹، ۳۷). همچنین خاصیت ضد میکروبی فیلم‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده علیه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاتر از باکتری گرم منفی *شیرشیاکلی* بود. باکتری‌های گرم منفی دارای یک پوشش سلولی هستند که از نظر ساختاری و عملکردی پیچیده‌تر از پوشش سلولی باکتری‌های گرم مثبت است. باکتری‌های گرم منفی دارای مولکول‌های لیپیدی ساکارید در غشاهای خود هستند که با کاهش تشکیل ترکیبات آبگریز به عنوان یک مانع عمل می‌کنند (۲۶، ۳۳).

جدول ۳: فعالیت ضد میکروبی پروتئین‌های هیدرولیز شده

نوع فیلم	باکتری	
	اشیرشیاکلی	استافیلوکوکوس اوروئوس
نانو سلولز	-	-
نانو سلولز+پروتئین ۵/۵ درصد	-	++
نانو سلولز+پروتئین ۱ درصد	++	+++
نانو سلولز+پروتئین ۱/۵ درصد	+++	+++

+++>18 mm, ++=13-18 mm, +=7-13 mm, -<7mm

۴- نتیجه گیری نهایی

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، پروتئین هیدرولیز شده دارای ۱۷ اسید آمینه بود که از میان آنها ۸ اسید آمینه ضروری و ۹ اسید آمینه غیر ضروری بوده اند و بالاترین مقادیر اسید آمینه مربوط به آرژنین ۲۱/۸۸ درصد و پس از آن گلوتامیک اسید ۱۷/۳۳ درصد (اسیدهای آمینه غیر ضروری) و سپس لوسین ۶/۷۵ درصد (اسیدهای آمینه ضروری) بوده است. همچنین نتایج مربوط به ویژگی‌های فیلم نشان داد افزایش غلظت پروتئین سبب کاهش مقاومت کششی و افزایش کشش تا قبل از نقطه پارگی فیلم نانو سلولز شد و افزودن پروتئین هیدرولیز شده بر روی رطوبت و حلالیت تاثیر معنی داری نداشت، اما سبب افزایش نفوذ پذیری بخار آب و افزایش کدورت شد همچنین خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی با افزایش غلظت افزایش یافت. بنابراین کاربرد این فیلم‌ها به علت دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی می تواند در نگهداری مواد غذایی بسیار مفید باشند البته برای افزایش کارایی این نوع بسته بندی‌ها در آینده تحقیقات بیشتری در زمینه زمان زیست تخریب پذیری و تأثیر این پلیمرها در ویژگی‌های ماده غذایی لازم است.

۵- منابع

1. ASTM. 1996. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American society for Testing and Material.
2. Bao, Zj., Zhao, Y., Wang, Xy. 2017. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. *J Food Sci Technol*, 54: 669-678.
3. Cazon, P., Velazquez, G., Ramirez, J. A., Vazquez, M. 2017. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 68: 136-148.
4. Dashipour, A., Razavilar, V., Hosseini, H., Shojae-Aliabadi, S., German, J. B., Ghanati, K., Khaksar, R. 2015. Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing Zataria multiflora essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 606-613.
5. De Oliveira Filho, J. G., Rodrigues, J. M., Valadares, A. C. F., Almeida, A. B., Lima, T. M., Takeuchi, K. P., Egea, M. B. 2019. Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 92: 267-275.

6. Ebrahimi, B., Mohammadi, R., Rouhi, M., Mortazavian, A. M., Shojaee-Aliabadi, S., Koushki, M. R. 2018. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 87: 54- 60.
7. Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., Candoğan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci*, 86 (2): 283-8.
8. FAO/WHO 1991. Protein quality evaluation. Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations. 66.
9. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., Varidi, M.J. 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, *Science of food and agriculture*, 15: 3165–3176.
10. Ghanbarinia, S. H., Ariaii, P., Safari, R., Najafian, L. 2022. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. *Animal science journal*, 93: 3798-3.812.
11. Ghasemi, Z., Alizadeh Khaled-Abad, M., Almasi, H., Nikoo, M. 2022. Carboxymethyl cellulose based bioactive edible films with *Lactobacillus casei* and fish protein hydrolysates. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 17 (6): 85-102.
12. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., Montero, M. P. 2009. Improvement of the antioxidant properties of squid skin gelatin films by the addition of hydrolysates from squid gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23: 1322–1327.
13. Guo, J., Swanepoel, A., Joao, R., Salze, G., Rhodes, M. and Davis, D.A., 2020. Hydrolysed salmon meal as a replacement for salmon meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 26(2): 368-381.
14. Huang, C., Ji, H., Yang, Y., Guo, B., Luo, L., Meng, Z. 2020a. TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofiber membranes as high-performance separators for lithium-ion batteries. *Carbohydrate Polymers*, 32: 185-199.
15. Huang, X., Luo, X., Liu, L., Dong, K., Yang, R., Lin, C. 2020b. Formation mechanism of egg white protein/κ-carrageenan composite film and its application to oil packaging. *Food Hydrocolloids*, 105: 364-381.
16. Hubbe, M. A., Rojas, O.J., Lucia, L.A., Sain, M. 2008. Cellulosic Nanocomposites: A Review. *BioResources*, 3: 929-980.
17. Isogai, A., Saito, T., Fukuzumi, H. 2010. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. *Nanoscale*. 3: 71–85.
18. Jun, S. H., Park, S. G., Kang, N. G. 2019. One-pot method of synthesizing TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofibers using immobilized TEMPO for skincare applications. *Polymers*, 11(6): 10-24.
19. Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga- Santos, P., Tadini, C. C. 2010. Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT- Food Science and Technology*, 43(7): 1088- 1094.
20. Kong, X., Zhou, H., Qian, H. 2007. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 102: 759–763.
21. Matthäus, B., Li, P., Ma, F., Zhou, H., Jiang, J., Özcan, M.M., 2018. Is the Profile of Fatty Acids, Tocopherols, and Amino Acids Suitable to Differentiate *Pinus armandii* Suspected to Be Responsible for the Pine Nut Syndrome from Other *Pinus* Species Chem. *Biodivers*, 15 (1): 172-189.
22. Mirsadeghi Darabi, D., Ariaii, P., Safari, R., Ahmadi, M. 2022. Effect of clover sprouts protein hydrolysates as an egg substitute on physicochemical and sensory properties of mayonnaise. *Food Science & Nutrition*, 10: 253–263.

23. Mirzapour, Z., Ariaii, P., Safari, R. 2022. Evaluation the Effect Hydrolyzed Canola Meal Protein with Composite Coating on Physicochemical and Sensory Properties of Chicken Nugget. *Int J Pept Res Ther*, 28: 97-111.
24. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18 (7): 950-956.
25. Otoni, C. G., Moura, M. R., Aouada, F. A., Camilloto, G. P., Cruz, R. S., Lorevice, M. V., Mattoso, L. H. 2014. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. *Food Hydrocolloids*, 41: 188-194.
26. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of Food Science and Agriculture*, 93: 1718–1726.
27. Peng, Y., Li, Y. 2014. Food Hydrocolloids Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36: 287–293.
28. Pourjavaheer, S., Almasi, H., Meshkini, S., Pirs, S., Parandi, E. 2017. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. *Carbohydrate Polymers*, 156: 193–201.
29. Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., Kovics, G. 2016. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *Journal of Food Science & Technology*, 53 (9): 3381–3394.
30. Safari, S., Yousefi, M., Khawari, A., Sajjadi, M., Nazari, ML., Alipour, A., Salehi, MH., Mousavi, Y. 2017. Effect of Afghan Chehelghoza (*Pinus gerardiana* L.) on sperm parameters of male rats. *J. Food Nutrition. Disorders*, 6 (5): 1–12.
31. Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., Mauri, A. N. 2011. Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6): 1433-1440.
32. Salgado, P. R., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Mauri, A. N., Montero, M. P. 2012. Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds. *Food Hydrocolloids*, 29(2): 374-381.
33. Shahosseini S.R. Javadian S.R., Safari R. 2021. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 30 (2): 123-146.
34. Shahosseini, S.R., Javadian, S.R. Safari, R. 2022. Effects of Molecular Weights - Assisted Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant and Anticancer Activities of *Liza abu* Muscle Protein Hydrolysates. *International Journal for Peptide Research & Therapeutics*, 28 (2): 1-11.
35. Singh, G., Kumar, D., Dash, A. K. 2021. *Pinus gerardiana* Wallichex. D. Don. -A review. *Phytomedicine Plus*, 1(2): 100024.
36. Siripatrawan, U., Harte, B. R. 2010. Food Hydrocolloids Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8): 770–775.
37. Tkaczewska, J. 2020. Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 106: 298–311.

38. Van Hai, L., Zhai, L., Kim, H. C., Kim, J. W., Choi, E. S., Kim, J. 2018. Cellulose nanofibers isolated by TEMPO-oxidation and aqueous counter collision methods. *Carbohydrate Polymers*, 191: 65–70.
39. Varedesara, M.S., Ariaii, P., Hesari, J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Science and Nutrition*, 9: 2180–2190.
40. Wen, Y., Liu, J., Jiang, L., Zhu, Z., He, S., He, S., Shao, W. 2021. Development of intelligent/active food packaging film based on TEMPO-oxidized bacterial cellulose containing thymol and anthocyanin-rich purple potato extract for shelf life extension of shrimp. *Food Packaging and Shelf Life*, 29: 100709.
41. Yathisha, U.G., Bhat, I., Karunasagar, I. and Mamatha, B.S. 2018. Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (15): 2363-2374.
42. Zaki, z. 2011. Ornamental trees. *Gillan University Publication*. (Persian)
43. Zolfi, M., Khodaiyan, F., Mousavi, M. Hashemi, M. 2014. The improvement of characteristics of biodegradable films made from kefiran–whey protein by nanoparticle incorporation. *Carbohydratepolymers*, 109: 118-125.

Investigating the properties of edible film based on bacterial nanocellulose oxidized by TEMPO method containing hydrolyzed protein obtained from pine tree fruit.

Najmeddin Pirveisi¹, Peiman Ariaii^{2*}, Mahro Esmacili³, Mohammad Ahmadi³

¹ PhD student, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

² Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

³ Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

*Corresponding author: Email: p.aryaye@yahoo.com

Abstract

In this study, intelligent and active film was produced based on oxidized bacterial cellulose by TEMPO method containing hydrolyzed pine seed protein. For this purpose, first, the protein of the pine seed fruit was hydrolyzed by the commercial alcalase hydrolysis enzyme, and then its different concentrations (0, 0.5, 1 and 1.5%) were added to the bacterial nanocellulose and physical characteristics, mechanical, antioxidant and antimicrobial properties of the films were investigated. According to the results, the hydrolyzed protein had high amounts of protein (90.21%) and amino acids, the highest amounts of amino acids corresponding to arginine 21.88%, glutamic acid 17.33% (non-essential amino acids) and then leucine 6.75% (essential amino acids). Based on the results of the films, by increase in protein concentration, tensile strength was decreased and elasticity before the point of film rupture, water vapor permeability and turbidity were increased ($P < 0.05$), but it did not have a significant effect on moisture and solubility ($P > 0.05$). The films had high antioxidant activity and antioxidant activity increased with increasing concentration ($P < 0.05$), and also these films had high antimicrobial properties against pathogenic bacteria and antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* was higher than *Escherichia coli*. Nano cellulose film containing hydrolyzed protein with a concentration of 1.5% had the highest antioxidant and antimicrobial activity ($p < 0.05$). Therefore, it seems that nano cellulose film containing hydrolyzed protein of pine fruit can be used in intelligent packaging of food products due to its antioxidant and antimicrobial properties.

Keywords: bioactive peptide, alcalase, bacterial nanocellulose, free radical, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*