



بررسی اثر اسید کافئیک و اسید تانیک بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی، مورفولوژیکی و استحکام هیدروژل

تهیه شده از ژلاتین ماهی سردآبی

الناز پارسایی^۱، عبدالرضا محمدی نافچی^{۲*}، لیلا نوری^۳

۱-دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲-دانشیار دانشگاه USM مالزی

۳-استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله: تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۲۷	<p>ژلاتین اساساً از دنا تورا سیون کلاژن بدست می آید. ژلاتین های بدست آمده از ماهیان سردآبی، دمای ژل سازی-ذوب کمی دارند. تیمارهای شیمیایی و فیزیکی را می توان جهت اصلاح شبکه ژلاتین از طریق برقراری اتصالات عرضی بین زنجیره های ژلاتین، به منظور بهبود خواص ژل، بکار برد. در این تحقیق، توسط اسید تانیک و اسید کافئیک، هر یک در غلظت های ۱، ۳ و ۵ درصد اتصالات عرضی در هیدروژل های برپایه ژلاتین ماهی سردآبی برقرار شد و تأثیر غلظت عوامل اتصال دهنده عرضی بر خواص فیزیکوشیمیایی هیدروژل های ژلاتین مورد بررسی قرار گرفت. استحکام ژل و درجه اتصال عرضی، با افزایش غلظت اسید تانیک از ۱ تا ۳ درصد افزایش یافت، که این افزایش در استحکام ژل از $325/00 \text{ N/mm}^2$ به $343/62$ و درجه اتصال عرضی از $82/01$ به $84/99$ درصد گزارش شد. ولی در سطح بالاتر اسید تانیک، کاهش در میزان استحکام ژل و درجه اتصال عرضی به ترتیب $301/90 \text{ N/mm}^2$ و $75/48$ درصد مشاهده شد. با این حال، این ویژگی های هیدروژل ها، با افزایش سطوح اسید کافئیک، به طور پیوسته افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). نسبت متورم شدن نیز در اثر تلفیق سطوح مختلف تانیک اسید و کافئیک اسید، کاهش نشان داد. حداکثر میزان نسبت متورم شدن برای شاهد، 1732.30 درصد و حداقل میزان متورم شدن برای اسید تانیک ۳ درصد، 594.79 درصد بود. ژلاتین های اتصال یافته عرضی توسط اسید تانیک به طور قابل توجهی دمای دنا تورا سیون را بهبود بخشیده و پایداری حرارتی آنها بیشتر از ژلاتین-اسید کافئیک بود. به طوری که این دما در هیدروژل تیمار نشده ۸۹ درجه سانتی گراد بود و در هیدروژل های تیمار شده با اسید کافئیک و اسید تانیک، به ترتیب تا دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۹۸ درجه سانتی گراد افزایش یافت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه های هیدروژل بیانگر اسفنجی بودن ساختار هیدروژل های برپایه ژلاتین ماهی سردآبی بود. افزودن عوامل اتصال دهنده عرضی، تنها اندازه حفرات موجود در ژلاتین را کمی کاهش داد و تأثیر قابل توجهی نداشت.</p>
کلمات کلیدی: هیدروژل، ژلاتین ماهی سردآبی، درجه اتصال عرضی، اسید تانیک، اسید کافئیک.	
DOI: 10.52547/fsct.18.02.21	
*مسئول مکاتبات: amohammadi@usm.my	

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر، کاربرد پلیمرهای طبیعی در فرآیند آماده‌سازی فیلم‌های خوراکی به منظور بسته‌بندی مواد غذایی و دارویی، افزایش یافته‌است [۱]، [۲]. پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و مشتقات آن‌ها، برخی از نمونه‌های این مواد پلیمری هستند، که از آن‌ها برای تولید فیلم‌های خوراکی استفاده می‌شود [۳]، [۴]. ژلاتین، یک پروتئین به دست آمده از هیدرولیز کلاژن است. پوست، استخوان، غضروف و تاندون حیوانات نظیر خوک، ماهی و گاو، برخی از منابع استخراج ژلاتین هستند [۵]، [۶]. زیست‌تخریب پذیر بودن، قابلیت بازیافت [۷]، فرآوری بالا همراه با قیمت پایین [۸]، الاستیسیته بهبود یافته، سازگاری و پایداری ژلاتین [۹]، [۱۰]، دلایل مهم کاربرد این پروتئین در صنایع غذایی و دارویی هستند.

ژلاتین ماهی، یک ترکیب ارزان است که از پوست و باقیمانده‌های استخوان ماهی به دست می‌آید [۱۱]. ژلاتین ماهی رفتار و مشخصات متفاوتی نسبت به ژلاتین پستانداران از خود نشان می‌دهد. ژلاتین ماهی، مخصوصاً ژلاتین ماهی سردآبی، دارای مقادیر بالای اسید آمینه آب‌گریز بوده و مقادیر اسیدهای آمینه پرولین و هیدروکسی پرولین آن کم است و قابلیت ژل‌سازی پایین‌تر و دمای ذوب کمتری نسبت به ژلاتین پستانداران دارد [۱۲]. از آنجایی که ژلاتین دارای آب‌گریزی پایین بوده و خواص مکانیکی ضعیفی دارد، خواص ممانعت‌کنندگی کمی در برابر بخار آب نشان می‌دهد [۱۳].

اصلاح ساختاری ژلاتین می‌تواند سبب بهبود خواص مکانیکی و ممانعت‌کنندگی آن گردد. از روش‌های مختلفی نظیر تیمارهای فیزیکی (مانند تیمارهای پرتودهی و التراسوند) و شیمیایی (مانند استفاده از آلدئیدها، گلو تار آلدئید^۱ و نمک‌های کلسیم) ترکیب با سایر پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها نظیر کیتوزان و کازئین، استفاده از اتصال‌دهنده‌های عرضی مانند ژنیپین^۲، فورمالدئید^۳، آنزیم ترانس‌گلو تامیناز^۴ و محصولات گیاهی طبیعی نظیر ترکیبات فنولی (اسید فرولیک، اسید تانیک، اسید کافئیک و غیره) برای اصلاح

ساختاری ژلاتین استفاده می‌شود [۱۴]. ژلاتین ماهی، یک جایگزین مناسب برای ژلاتین خوکی در نواحی منع مصرف آن می‌باشد. همچنین پوست ماهی، به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات فرعی به دست آمده از فرآوری ماهی مورد توجه می‌باشد، که سبب ایجاد آلودگی و تولید زباله می‌گردد. با این حال، این محصول جانبی می‌تواند یک منبع با ارزش برای ژلاتین به شمار آید، زیرا حاوی بیشترین میزان کلاژن است [۱۵].

هیدروژل، به شبکه‌های پلیمری کسان اشباع از آب گفته می‌شود. این شبکه‌های سه‌بعدی، آب‌دوست و دارای اتصالات عرضی هستند، که در تماس با آب متورم شده، اما حل نمی‌شوند. هیدروژل‌ها می‌توانند دارای شکل‌های فیزیکی مختلف، شامل: ورقه، میکروذره، نانوذره، ساختار پوششی و فیلم باشند.

ژل، بسته به ماهیت محیط آبی و ساختار پلیمر، با نسبت‌های مختلف آبدار می‌شود. بدین معنی که هر چه تعداد گروه‌های آب‌دوست ژل بیشتر باشد، قابلیت نگهداری آب در آن نیز افزایش می‌یابد. این مقدار، از ۱۰ درصد تا چند برابر وزن ساختار پلیمر متغیر است. محتوای آبی هیدروژل‌ها نقش مهمی در تعیین ویژگی‌های کلی شبکه پلیمری ایفا می‌کند. هیدروژل‌ها بر اساس منشاء پلیمر، به دو دسته هیدروژل‌های طبیعی نظیر کلاژن و پلی‌ساکارید و هیدروژل‌های ترکیبی مانند پلی‌آکریل‌آمید و اتیلن‌گلاکول تفکیک می‌شوند [۱۶].

ترکیبات فنولی طبیعی، به طور کلی در گیاهان و میوه‌ها یافت می‌شوند و به طور وسیعی از آن‌ها، به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در فرآوری مواد غذایی استفاده می‌شود. بیش از نیم قرن است که واکنش‌های بین فنول‌های طبیعی و پروتئین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در متون علمی گزارش شده است که تعدادی از ترکیبات فنولی طبیعی، واکنش‌پذیری خوبی با پروتئین‌ها از خود نشان داده‌اند و سبب بهبود خصوصیات ژل یا فیلم در مواد برپایه ژلاتین گردیده‌اند [۱۷]، [۱۸]. به طور کلی، چهار واکنش بین ترکیبات فنولی و پروتئین، شامل باندشدن هیدروژنی، واکنش‌های یونی، هیدروفوبی و کووالانست تأیید شده‌اند [۱۹]، [۲۰].

عراقی و همکاران [۲۱]، به اصلاح ژلاتین ماهی سردآبی با استفاده از عوامل اتصال‌دهنده‌ی عرضی فنولی (اسید فرولیک و اسید کافئیک) پرداختند. در این تحقیق، از طریق ترکیب ژلاتین ماهی و غلظت‌های مختلف (۰، ۱، ۳ و ۵ درصد) اسیدهای فنولی فرولیک

1. Glutaraldehyde
2. Genipin
3. Formaldehyde
4. Transglutaminase enzyme

شده توسط پلی‌فنول‌ها در غلظت $30 \mu\text{g/g}$ ، بیشترین سطح فشردگی را داشت. ژلاتین-پلی‌فنول اتصال‌یافته عرضی، به طور قابل توجهی دارای دمای دناتوراسیون بهبودیافته بود و ثبات حرارتی بیشتری نسبت به ژلاتین-ژنپین از خود نشان داد. با این حال، تحقیقات کمی بر روی واکنش‌های بین ترکیبات فنولی و پروتئین‌ها در زمینه تشکیل مواد اتصال‌دهنده عرضی، مخصوصاً در زمینه ساختارهای شیمیایی ترکیبات واسط و شیمی اتصالات کووالانت صورت گرفته است. از این رو، هدف از این تحقیق، هدایت واکنش‌های اتصال عرضی ژلاتین حاصل از ماهی سردآبی، با استفاده از ترکیبات فنولی طبیعی اسید کافئیک و اسید تانیک، به عنوان عوامل اتصال‌دهنده عرضی، بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه مورد استفاده

در این تحقیق، اسید تانیک (شرکت مرک^۵ آلمان)، اسید کافئیک (شرکت مرک آلمان)، همچنین ژلاتین ماهی سردآبی (شرکت سیگما-آلدריך^۶ کشور کانادا) مورد استفاده گردید.

۲-۲- آماده‌سازی تیمارهای مختلف هیدروژل

تیمارهای مورد بررسی در تحقیق، در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت تهیه نمونه‌های مختلف هیدروژل، ۵ گرم ژلاتین ماهی سردآبی در آب دی‌یونیزه به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حل شد. اسید تانیک و اسید کافئیک، هر کدام در غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد در آب دی‌یونیزه حل شده و توسط هیدروکسید سدیم یک نرمال به $\text{pH} > 9$ رسیده و با تزریق مستقیم اکسیژن به مدت یک ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس محلول ژلاتین و اسید تانیک/اسید کافئیک با هم مخلوط شده و به مدت یک ساعت در همان شرایط بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. سپس در دمای اتاق سرد شده و حدود ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا هیدروژل تشکیل گردد [21].

و کافئیک، تیمارهای مختلف فیلم تهیه شدند. فیلم‌ها در pH بالاتر از ۱۰ و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس تحت تزریق مداوم گاز اکسیژن و افزودن پلاستی‌سایزر سوربیتول-گلیسرول آماده‌سازی شدند. نتایج نشان داد که حلالیت، نفوذپذیری به اکسیژن و نفوذپذیری به بخار آب در تیمارهای حاوی اسید کافئیک کاهش یافت و بیشترین اثر مربوط به غلظت ۵ درصد این اسید فنولی بود. بین حلالیت و غلظت ترکیبات فنولی موجود در فیلم‌های حاوی اسید فرولیک، رابطه خطی وجود داشت، با این حال، افزودن اسید فرولیک تغییر قابل توجهی در نفوذپذیری به بخار آب و اکسیژن ایجاد نکرد. مقایسه بین دو ترکیب فنولی مورد استفاده در این تحقیق نشان داد که اسید کافئیک بیشترین اثر را در کاهش حلالیت، نفوذپذیری به بخار آب و نفوذپذیری به اکسیژن داشت. اسید کافئیک در مقایسه با اسید فرولیک، کارآمدتر است و می‌تواند از طریق بهبود خواص ممانعت‌کنندگی و فیزیکوشیمیایی، سبب افزایش ایمنی بسته‌بندی‌های زیست‌تخریب پذیر گردد.

توسلی و همکاران [۲۲]، خواص نانوفیبر ژلاتین دارای اتصال عرضی با اسید کافئیک، به عنوان ترکیب فنولی، را مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های این تحقیق حاکی از آن بود که ایجاد اتصال عرضی در ژلاتین به کمک اسید کافئیک منجر به افزایش معنی‌داری در هدایت الکتریکی گردید. این در حالی است که ایجاد اتصال عرضی سبب کاهش گرانیوی و کشش سطحی شد. بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی، شکل الیاف تغییر چندانی نداشت، اما پراکنندگی قطر در الیاف مشاهده شد. همچنین قطر متوسط الیاف نسبت به ژلاتین فاقد اتصال عرضی افزایش معنی‌داری را نشان داد. در بررسی مربوط به طیف‌سنجی مادون‌قرمز، این احتمال وجود دارد که اسید کافئیک با گروه‌های C-N-C مولکول ژلاتین پیوند داده باشد.

ژائو و همکاران [۲۳]، اثرات اتصالات عرضی ژلاتین-پلی‌فنول و ژلاتین-ژنپین بر ساختار هیدروژل‌های ژلاتین را مورد بررسی قرار دادند. بیشترین میزان استحکام ژل در اتصالات پلی‌فنول‌ها، در غلظت‌های بالاتر از 360 N/mm^2 میکروگرم پلی‌فنول‌ها در هر گرم ژلاتین به دست آمد ($136/9 \text{ N/mm}^2$)، در حالی که بیشترین میزان استحکام در نمونه‌های اتصال‌یافته با ژنپین، مربوط به 300 N/mm^2 میلی‌گرم ژنپین در هر گرم ژلاتین خشک مشاهده شد ($9/8 \text{ N/mm}^2$). میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که ژلاتین اصلاح

5. merck
6. Sigma-aldrich

Table 1 Different hydrogel treatments

Treatments	Treatments Code
Control sample	C
Crosslinking hydrogel with 1% Tannic acid	TA1
Crosslinking hydrogel with 3% Tannic acid	TA3
Crosslinking hydrogel with 5% Tannic acid	TA5
Crosslinking hydrogel with 1% Caffeic acid	CA1
Crosslinking hydrogel with 3% Caffeic acid	CA3
Crosslinking hydrogel with 5% Caffeic acid	CA5

۲-۳- روش آزمایش

۲-۳-۱- اندازه گیری میزان استحکام ژل

میزان استحکام ژل هیدروژل های اتصال یافته ی عرضی، با استفاده از دستگاه بافت سنج غذایی و بر طبق روش بیان شده توسط [۲۴] با کمی اصلاحات ارزیابی شد. سل بار مورد استفاده ۵ کیلو نیوتن بود. هیدروژل های لوله ای، در مرکز صفحه دستگاه بافت سنج قرار گرفته و توسط یک پروب سیلندری دارای قطر ۵ میلی متر سوراخ شدند. حداکثر نیرو و فاصله نفوذ طی سوراخ کردن هیدروژل ها به دست آمد. نیروی شکست با استفاده از رابطه (1) محاسبه شده و بر حسب نیوتن بر میلی متر مربع (N/mm²) گزارش گردید: که در این رابطه σ ، F و r ، به ترتیب نیروی شکست، حداکثر نیرو و قطر پروب سیلندری بودند. هر نمونه با سه بار تکرار مورد آزمون قرار گرفت.

رابطه (۱):

$$\sigma = \frac{F \times 9.81}{\pi \times r^2}$$

۲-۳-۲- تعیین سینتیک جذب آب (تورم یا آماس)

نسبت های متورم شدن هیدروژل های تولیدی، بر طبق روش بیان شده توسط [۲۵] ارزیابی شدند. بدین صورت که هیدروژل ها در دمای محیط قرار گرفته و خشک شدند و توزین گردیدند. سپس در آب مقطر دارای دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰۰ دقیقه قرار داده شدند، تا مجدداً آب را جذب نمایند. نمونه ها توسط کاغذ صافی تخلیص شدند تا قبل از توزین نمونه ها، آب سطحی خارج گردد. سپس هر ۱۵ دقیقه، توزین نمونه ها انجام گرفت. نسبت تورم با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد؛ که در آن: W_0 و W_d به ترتیب وزن نمونه هیدراته شده و وزن نمونه خشک شده بر حسب گرم بودند.

رابطه (۲):

$$SR = \frac{(W_0 - W_d)}{W_d} \times 100$$

۲-۳-۳- ارزیابی درجه اتصال عرضی

درجه اتصال عرضی نمونه های هیدروژل، با استفاده از بررسی طیف UV جهت شناسایی گروه های ϵ -آمینو، قبل و بعد از اتصال عرضی با استفاده از ۶،۴،۲-تری نیترو بنزن سولفونیک اسید (TNBS) ارزیابی شد [۲۶]. رابطه بین جذب و محتوای ϵ -آمینو، از طریق رابطه (۳) محاسبه گردید؛ که در آن: $L/mol.cm$ $1.04 \times 10^4 \times 1/46$ جذب مولی تیرپتوفان-لیزین (THP-lys)، b طول مسیر سل بر حسب cm و X وزن نمونه بر حسب g بود. رابطه (۳):

$$\frac{0.020 L}{\text{مول گروه های آمینو}} = \frac{2}{(1.46 \times 10^4 L_{(cm/mol)}) \times (b)(x)}$$

۲-۳-۴- آزمون کالریمتری افتراقی

بررسی های حرارتی نمونه های هیدروژل، با استفاده از دستگاه کالریمتری روبشی مجهز به یک خنک کننده ی نیتروژن مایع در دمای اتاق انجام گرفت. تقریباً ۱۲-۱۰ میلی گرم از نمونه خشک شده، به طور سربسته و محکم در یک صفحه آلومینیومی دوخته شد. از صفحه دوخته شده ی خالی، به عنوان رفرنس استفاده گردید. توسط حرارت دهی بخش ها از ۱۰ تا ۱۵۰ درجه سانتی گراد در سطح روبشی ۵ K/min و در سرعت جریان نیتروژن مایع ۵۰ mL/min، ترموگرام مربوطه تهیه گردید [۲۷].

۲-۳-۵- بررسی ریز ساختار هیدروژل

ساختار هیدروژل های خشک شده، توسط میکروسکوپ الکترونی

7. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)

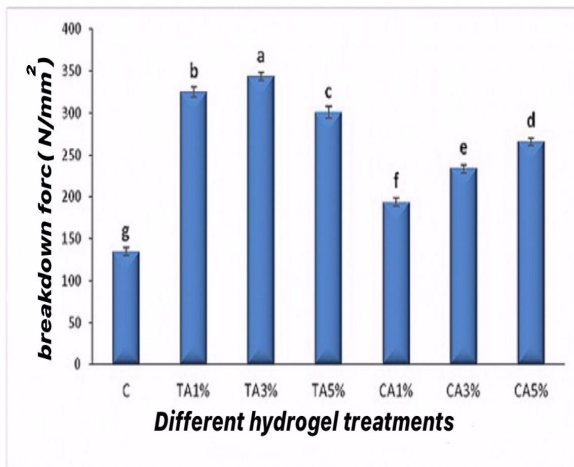


Fig 1 Comparison of fracture values of different crosslinked hydrogel treatments

TA: Tannic acid; CA: Caffeic acid and numbers afterward show the percentage of acid used. Different letters on bars represent significant difference in 5% level of probability.

از آنجایی که اسید تانیک نسبت به اسید کافئیک، دارای گروه‌های هیدروکسیل بیشتری بر روی حلقه فنولی خود می‌باشد، در نتیجه در غلظت مناسب سبب افزایش نیروی شکست می‌شود، ولی افزایش بیش از حد آن، نیروی شکست را کاهش می‌دهد، از این رو، نسبت به اسید کافئیک، مقادیر کمتری از آن برای ایجاد استحکام ژل مورد نیاز است.

۳-۲- بررسی اثر اسید کافئیک و اسید تانیک بر سیتیک متورم شدن هیدروژل‌ها

نسبت‌های متورم شدن هیدروژل‌های ژل ماهی سردآبی اتصال‌یافته‌ی عرضی توسط سطوح مختلف اسید تانیک و اسید کافئیک، در نمودار ۲ نشان داده شده است. در همه نمونه‌های هیدروژل، با افزایش زمان غوطه‌وری، میزان آب جذب شده توسط هیدروژل‌ها افزایش یافته و میزان تورم آن‌ها بیشتر شد، به طوری که بیشترین میزان متورم شدن در کلیه تیمارها، در بالاترین زمان غوطه‌وری (زمان ۹۰ دقیقه) به دست آمد. حداکثر میزان نسبت متورم شدن برای شاهد، سطوح ۱، ۳ و ۵ درصد اسید تانیک و نسبت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد اسید کافئیک، به ترتیب

رویشی (SEM) در ولتاژ شتاب‌دهنده‌ی ۱۵ kV مشاهده گردید [۲۸].

۲-۴- طرح و روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

متغیرهای مستقل این پژوهش شامل: نوع اسیدهای مورد استفاده (دو نوع؛ اسید تانیک و اسید کافئیک) و غلظت آن‌ها (سه سطح؛ ۱، ۳ و ۵ درصد) بوده و متغیرهای مستقل شامل: آزمون‌های مورد بررسی در هر مرحله بودند.

میانگین هر پارامتر، توسط آنالیز تجزیه واریانس در طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22.0 تجزیه و تحلیل شدند. تفاوت‌های بین تیمارها، در آزمون دانکن و در سطح احتمال ۹۵ درصد بیان شده و نمودارهای مربوطه با Excel 2013 رسم گردیدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی اثر اسید کافئیک و اسید تانیک بر استحکام هیدروژل‌ها

تغییرات در استحکام ژل ژلاتین ماهی سردآبی پس از برقراری اتصالات عرضی با سطوح مختلف اسید تانیک و اسید کافئیک، در نمودار ۱ نشان داده شده است. میزان استحکام ژل کلیه نمونه‌های تیمار شده، به طور قابل توجهی بیشتر از نمونه شاهد بود ($p < 0.05$). بیشترین افزایش در استحکام ژل، در نمونه اتصال‌یافته‌ی عرضی توسط اسید تانیک مشاهده شد. در تیمارهای حاوی اسید تانیک، افزایش غلظت از ۱ تا ۳ درصد سبب افزایش میزان نیروی شکست هیدروژل‌های تولیدی از $325/00 \text{ N/mm}^2$ به $343/62 \text{ N/mm}^2$ شد، ولی با افزایش غلظت این اسید از ۳ تا ۵ درصد، میزان نیروی شکست به $301/90 \text{ N/mm}^2$ کاهش یافت. با این حال، افزایش غلظت اسید کافئیک از ۱ تا ۵ درصد، میزان نیروی شکست هیدروژل‌های اتصال‌یافته‌ی عرضی تولیدی را از $193/99 \text{ N/mm}^2$ به $265/49 \text{ N/mm}^2$ افزایش داد و این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

نمودار ۳ نشان داده شده است. همانطوری که در نمودار مشاهده می‌شود، درجه اتصال عرضی در تیمارهای حاوی اسید تانیک به طور معنی‌داری بیشتر از اسید کافئیک بود ($p < 0.05$)، که این موضوع در ارتباط با حضور گروه‌های هیدروکسیل بیشتر در اسید تانیک نسبت به اسید کافئیک می‌باشد. افزایش تانیک از ۱ تا ۳ درصد، میزان درجه اتصال عرضی ژل‌ها را از ۸۲/۰۱ به ۸۴/۹۹ درصد افزایش داد، ولی افزایش بیشتر آن (از ۳ تا ۵ درصد) موجب کاهش معنی‌دار میزان درجه اتصال عرضی به ۷۵/۴۸ درصد گردید. کمترین میزان درجه اتصال عرضی در هیدروژل تیمار شده با کمترین سطح اسید کافئیک (سطح ۱ درصد) به دست آمد (۶۲/۰۴ درصد) و افزایش سطح این اسید فنولی از ۱ تا ۵ درصد، میزان درجه اتصال عرضی را به ۷۱/۸۸ درصد افزایش داد.

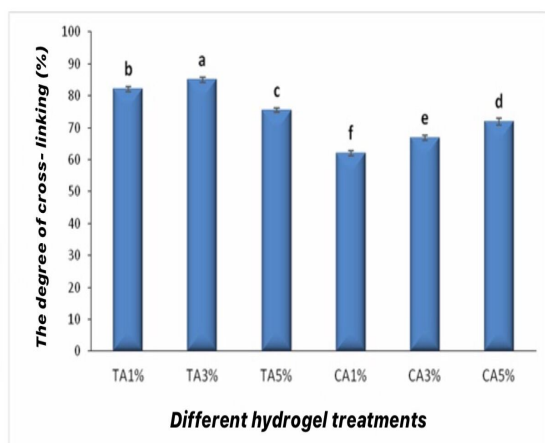


Fig 3 Comparison of crosslinking values of different crosslinked hydrogel treatments

TA: Tannic acid; CA: Caffeic acid and numbers afterward show the percentage of acid used. Different letters on bars represent significant difference in 5% level of probability.

۳-۴- بررسی اثر اسید کافئیک و اسید تانیک بر پایداری حرارتی هیدروژل‌ها (کالریمتری افتراقی یا DSC)

ترموگرام‌های به دست آمده از کالوریمتری افتراقی (DSC)

۱۷۳۲/۳۰، ۷۵۳/۶۰، ۵۹۴/۷۹، ۷۶۵/۲۳، ۹۰۷/۵۷، ۸۱۴/۷۳ و ۷۸۱/۱۶ درصد بود. این نتایج نشان می‌دهد که برقراری اتصال عرضی موجب کاهش قابل توجه نسبت‌های متورم شدن نمونه‌های هیدروژل گردید و اسیدهای فنولی مورد استفاده در این تحقیق توانستند قابلیت جذب آب هیدروژل‌های تولیدی را کاهش داده و آب کمتری را در ساختار هیدروژل به دام اندازند.

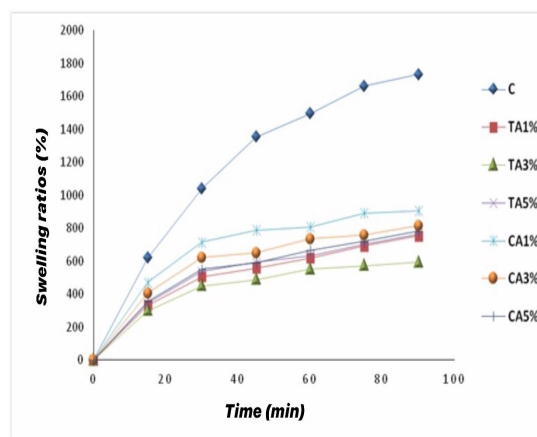


Fig 2 Swelling kinetics of different crosslinked hydrogel treatments

TA: Tannic acid; CA: Caffeic acid and numbers afterward show the percentage of acid used. Different letters on bars represent significant difference in 5% level of probability.

تأثیر اسید تانیک در کاهش جذب آب توسط هیدروژل‌های برپایه ژلاتین ماهی سردابی بیشتر از اسید کافئیک بود. در کلیه زمان‌های غوطه‌وری، افزایش اسید تانیک در ابتدا میزان تورم ژل‌ها را کاهش و سپس افزایش داد، ولی افزایش اسید کافئیک از ۱ تا ۵ درصد منجر به کاهش معنی‌دار میزان تورم ژل‌های تولیدی گردید ($p < 0.05$). همانطوری که در قبل گزارش گردید، کمترین میزان درصد متورم شدن در آخرین زمان غوطه‌وری، در هیدروژل تیمار شده با سطح ۳ درصد اسید تانیک به دست آمد.

۳-۳- بررسی اثر غلظت اسید کافئیک و اسید تانیک بر درجه اتصال عرضی هیدروژل‌ها

درجه اتصال عرضی نمونه‌های مختلف ژلاتین ماهی سردابی، در

از اسید کافئیک عمل کرده و درجه اتصال عرضی را بیشتر افزایش داد، پایداری حرارتی بیشتری نیز نسبت به اسید کافئیک نشان داد. با این حال، افزایش سطح ترکیبات فنولی مذکور، اثر قابل توجهی بر پایداری حرارتی هیدروژل‌های تولیدی نداشت.

میزان پیک حرارتی، در ارتباط با تغییر ساختار ماریچ کلژن می‌باشد و T_d به طور کلی مرتبط با دمای دناوراسیون است. در کل مشخص شده است که افزایش در میزان T_d ، جهت افزایش پایداری حرارتی فیلم‌های ژلاتین مطلوب بوده و برای خواص مکانیکی مواد برپایه ژلاتین حائز اهمیت می‌باشد [۳۰]. تحقیقات نشان داده‌اند که ژلاتین‌های اتصال‌یافته‌ی عرضی توسط پلی‌فنول‌ها، دارای پیک دناوراسیون بالاتری هستند. افزایش در میزان T_d بیانگر افزایش در تعداد اتصالات عرضی در هر مولکول می‌باشد [۳۱].

۳-۵- بررسی اثر اسید کافئیک و اسید تانیک بر ریزساختار هیدروژل‌ها (میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM)

در شکل ۵ تصاویر ریزساختار هیدروژل‌های شاهد و اتصال‌یافته‌ی عرضی توسط اسید تانیک و اسید کافئیک نشان داده شده است. در این تصاویر هیدروژل‌های اتصال یافته عرضی توسط اسید تانیک ۱، ۳ و ۵ درصد به ترتیب با بزرگنمایی ۹۰، ۷۰ و ۶۵، همچنین هیدروژل‌های اتصال یافته عرضی توسط اسید کافئیک ۱، ۳ و ۵ درصد به ترتیب با بزرگنمایی ۷۰، ۷۰ و ۶۵ و نمونه شاهد با بزرگنمایی ۷۰ آورده شده است. هر دو نوع هیدروژل (شاهد و اتصال‌یافته‌ی عرضی) دارای ساختار اسفنجی‌مانند بودند. در بخش عرضی هیدروژل تیمار نشده، ساختارهای متخلخل دارای اندازه‌ی حفرات مختلف و تصادفی قابل مشاهده است، در حالی که در بخش عرضی هیدروژل‌های اتصال‌یافته‌ی عرضی، حجم آزاد کاهش یافته‌است و اندازه‌ی حفرات کوچک‌تر شده است. افزایش سطح اسیدهای فنولی تانیک و کافئیک، اثر قابل توجهی بر ریزساختار هیدروژل‌های تولیدی نشان نداد.

هیدروژل‌های تلفیق شده با سطوح مختلف اسید تانیک و اسید کافئیک، در نمودار ۴ نشان داده شده است. همانطوری که در نمودار مشاهده می‌شود، هم هیدروژل‌های دارای اتصالات عرضی و هم هیدروژل تیمار نشده، دارای یک پیک (پیک مربوط به به دمای انقباض) بودند. فرآیند حرارتی ارائه شده در ترموگرام DSC نشان می‌دهد که در اثر اعمال حرارت، پیوندهای هیدروژنی از هم گسیخته شده و زنجیره‌های پپتیدی مجدداً آرایش می‌یابند [۲۹].

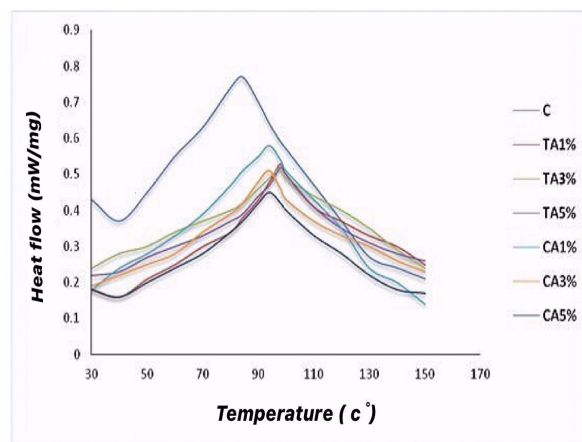


Fig 4 Thermograms of various crosslinked hydrogel treatments

TA: Tannic acid; CA: Caffeic acid and numbers afterward show the percentage of used acid.

Different letters on bars represent significant difference in 5% level of probability.

مقادیر T_d ژلاتین‌های اتصال‌یافته‌ی عرضی، در مقایسه با نمونه شاهد، به دماهای بالاتر انتقال یافت، به طوری که این دما در هیدروژل تیمار نشده ۸۹ درجه سانتی‌گراد بود و در هیدروژل‌های تیمار شده با اسید کافئیک و اسید تانیک، به ترتیب تا دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۹۸ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. تأثیر نوع ترکیب فنولی مورد استفاده بر پایداری حرارتی هیدروژل‌ها، تأییدکننده‌ی نتایج آزمون بررسی درجه اتصال عرضی بود. به طوری که اسید تانیک و کافئیک سبب افزایش درجه اتصال عرضی در هیدروژل ژلاتین ماهی شده و پایداری حرارتی را نیز نسبت به شاهد افزایش دادند و از آنجایی که اسید تانیک قوی‌تر

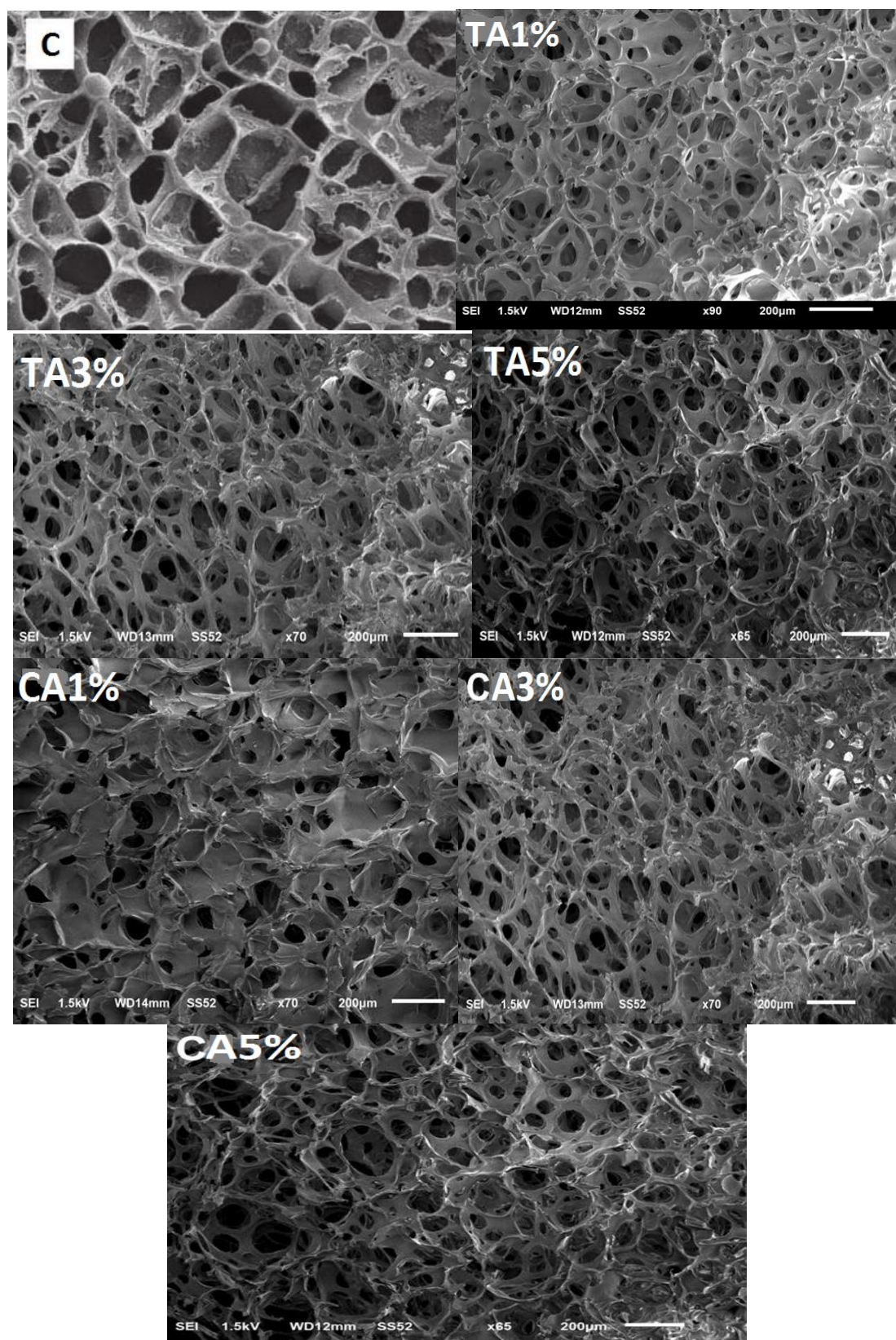


Fig 5 SEM microscope images of different crosslinked hydrogel treatments

- Academic Science of Engineering and Technology, 5: 9-25.
- [5] Voon, H.C., Bhat, R., Mat. Easa, A., Liong, M.T. & Karim, A.A. 2012. Effect of addition of halloysite of bovine gelatin films. Food Bioprocess Technology, 5: 1766-1774.
- [6] Kosaraju, S.L., Puvanenthiran, A. & Lillford, P. 2010. Naturally cross linked gelatin gels with modified material properties. Food Research International, 43: 2385-2389.
- [7] Zhang, X., Do, M.D., Casey, P., Sulistio, A., Qiao, G.G., Lundin, L., Lillford, P. & Kosaraju, S. 2010a. Chemical crosslinking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. Biomacromolecules, 11: 1125-1132.
- [8] de Carvalho, R.A. & Grosso, C.R.F. 2006. Properties of chemically modified gelatin films. Brazilian Journal of Chemistry Engineering, 23: 45-53.
- [9] See, S.F., Hong, P.K., Ng, K.L., Wan Aida, W.M. & Babji, A.S. 2010. Physicochemical properties of gelatins extracted from skins of different freshwater fish species. International Food Research Journal, 17: 809-816.
- [10] Irwandi, J., Faridayanti, S., Mohamed, E.S.M., Hamzah, M.S., Torla, H.H. & Che Man, Y.B. 2009. Extraction and characterization of gelatin from different marine fish species in Malaysia. *International Food Research Journal*, 16: 381-389.
- [11] Sonthornvit, R. & Krochta, J.M. 2000. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. Food Engineering and Physics Properties, 65: 700-703.
- [12] Gonzalez, A., Strumia, M.C., Ines, C. & Igarzabal, A. 2011. Crosslinked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation. Journal of Food Engineering, 106: 331-338.
- [13] Yi, J.B., Kim, Y.T., Bae, H.J., Whiteside, W.S. & Park, H.J. 2006. Influence of cross linking on properties of fish gelatin films. Journal of Food Science, 71: 376-383.
- [14] Bor-Sen, C., Avena-Bustillos, R. J., Bechtel, P. J., Jafri, H., Narayan, R., Imama, S. H., Glenn, G. M. & Orts, W.J. 2008. Cold water fish gelatin films: Effects of crosslinking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. European Polymer Journal, 44: 3748-3753.
- [15] Karim, A.A. & Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. Food

پلی فنولها می توانند سبب یکنواخت تر کردن سطح هیدروژلها گردند [۳۲]. گروه های آمین باقی مانده در زنجیره های ژلاتین، با پلی فنولها واکنش داده یک ساختار شبکه ای متراکم را تشکیل می دهند، که این ساختار متراکم، سبب محدود شدن تحرک زنجیره های ژلاتین آزاد می گردد [۳۳]. از این رو، پایداری حرارتی و خواص مکانیکی هیدروژل های اتصال یافته ی عرضی توسط ترکیبات فنولی بهبود می یابد [۳۴]. به طور کلی، آرایش و پیوستگی مولکول های پروتئین در شبکه ژل مستقیماً در ارتباط با استحکام ژل ژلاتین می باشد [۳۵].

۴- نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج به دست آمده در این تحقیق بیانگر تأثیر مطلوب اسیدهای کافئیک و تانیک به عنوان عوامل اتصال دهنده ی عرضی بر خواص فیزیکی و رئولوژیکی هیدروژل های اتصال یافته عرضی بر پایه ژلاتین ماهی بود. از آنجایی که اسید تانیک در برقراری اتصالات عرضی قوی تر عمل کرده و در سطوح کمتر نسبت به اسید کافئیک قابل استفاده است، این اسید را می توان به عنوان افزودنی برتر جهت افزودنی به هیدروژل های بر پایه ژلاتین ماهی معرفی نمود. همچنین پیشنهاد می شود برای پژوهشهای آینده اثر اسیدهای تانیک و کافئیک یا سایر ترکیبات فنولی به عنوان عوامل اتصال دهنده ی عرضی بر خواص عملکردی سایر هیدروژل های پروتئینی نظیر فیلم های بر پایه نخود، لوبیا، ایزوله پروتئین سویا، زئین و غیره نیز بررسی گردد

۵- منابع

- [1] Zeppa, C., Gouanve, F. & Espuche, E. 2009. Effect of a plasticizer on the structure of biodegradable starch/clay nanocomposites: thermal, water-sorption and oxygen-barrier properties. Applied Polymer Science, 112: 2044-2056.
- [2] Bourtoom, T. 2009. Edible protein films: properties enhancement. International Food Research Journal, 16: 1-9.
- [3] Voon, H.C., Bhat, R., Mat. Easa, A., Liong, M.T. & Karim, A.A. 2012. Effect of addition of halloysite of bovine gelatin films. Food Bioprocess Technology, 5: 1766-1774.
- [4] Nawapat Detduangchan, T.W. 2011. Effect of UV-treatment on properties of biodegradable film from rice starch. World

- a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Analysis Biochemistry*, 207: 129-133.
- [27] Hu, Y., Liu, L., Dan, W., Dan, N., Gu, Z. & Yu, X. 2013. Synergistic Effect of Carbodiimide and Dehydrothermal Crosslinking on Acellular Dermal Matrix. *International Journal of Biology Macromolecule*, 55: 221-23.
- Lowman, A.M. & Dziubla, T.D. (2004). Structural and Dynamic Response of Neutral and Intelligent Networks in Biomedical Environment. *Advanced Chemistry Engineering*, 29: 75-130.
- [28] de Carvalho, R.A. & Grosso, C.R.F. 2006. Properties of chemically modified gelatin films. *Brazilian Journal of Chemistry Engineering*, 23: 45-53.
- [29] Usha, R. & Ramasami, T. 2004. The Effects of Urea and N-Propanol on Collagen Denaturation: Using DSC, Circular Dicroism and Viscosity. *Thermochimistry Acta*, 409: 201-206.
- [30] He, L., Mu, C., Shi, J., Zhang, Q., Shi, B. & Lin, W. 2011. Modification of Collagen with a Natural Cross-Linker, Procyanidin. *International Journal of Biology Macromolecule*, 48: 354-359.
- [31] Zhao, Y. & Sun, Z. 2018. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin-genipin crosslinking on the structure of gelatin hydrogels. *International Journal of Food Properties*, 1-12.
- [32] Balange, A.K. 2009. Enhancement of Gel Strength of Surimi Using Oxidized Phenolic Compounds. A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Food Science and Technology, Prince of Songkla University. 238 pp.
- [33] Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N. & Rubini, K. 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 23: 4827-4832.
- [34] Bubnis, W.A. & Ofner, C. M. 1992. The Determination of ϵ -Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by a Spectrophotometric Method Using Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Analysis Biochemistry*, 207: 129-133.
- [35] Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y. & Roytrakul, S. 2009. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chemistry*, 116(2): 445-451.
- Food Hydrocolloids*, 23(3): 563-576.
- [16] Lowman, A.M. & Dziubla, T.D. 2004. Structural and Dynamic Response of Neutral and Intelligent Networks in Biomedical Environment. *Advanced Chemistry Engineering*, 29: 75-130.
- [17] Cao, N., Fu, Y. & He, J. 2007. Mechanical properties of gelatin films crosslinked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocolloids*, 21: 575-584.
- [18] Xing, F., Cheng, G., Yi, K. & Ma, L. 2005. Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. *Journal of Applied Polymer Science*, 96: 2225-2229.
- [19] Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in food: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.
- [20] Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P. & Williamson, M.P. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 1593-1601.
- [21] Araghi, M., Moslehi, Z., Mohammadi Nafchi, A., Mostahsan, A., Salamat, N. & Daraei Garmakhany, A. 2015. Cold water fish gelatin modification by a natural phenolic cross-linker (ferulic acid and caffeic acid). *Food Science and Nutrition*, 3(5): 370-375.
- [22] Tavasoli kofrani, A. & Goli.s.a.h. 2016. Evaluation of crosslinking properties of gelatin nanofiber with caffeic acid as a phenolic compound. The First International Congress and the 24th National Congress of Food Science and Technology of Iran, 7 pages.
- [23] Zhao, Y. & Sun, Z. 2018. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin-genipin crosslinking on the structure of gelatin hydrogels. *International Journal of Food Properties*, 1-12.
- [24] Yan, M., Li, B., Zhao, X. & Yi, J. 2011. Physicochemical Properties of Gelatin Gels from Walleye Pollock (*Theragra Chalcogramma*) Skin Crosslinked by Gallic Acid and Rutin. *Food Hydrocolloids*, 25: 907-914.
- [25] Charulatha, V. & Rajaram, A. 2003. Influence of Different Crosslinking Treatments on the Physical Properties of Collagen Membranes. *Biomaterials*, 24: 759-767.
- [26] Bubnis, W.A. & Ofner, C. M. 1992. The Determination of ϵ -Amino Groups in Soluble and Poorly Soluble Proteinaceous Materials by



Scientific Research

The effects of caffeic acid and tannic acid on physicochemical, morphological and hydrogel properties of cold-water fish gelatin

Parsaei, E. ¹, Mohammadi Nafchi, A. ^{2*}, Nouri, L. ³

1. Post graduate student, Food Science & Technology Department, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
2. Associate Professor, Food Technology Division, School of Industrial Technology, Universiti Sains, Penang, Malaysia
3. Assistant Professor, Food Science & Technology Department, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 15 October 2020
Accepted 17 November 2020

Keywords:

Hydrogel,
Cold-water fish gelatin,
Degree of crosslinking,
Tannic acid,
Caffeic acid.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.21

*Corresponding Author E-Mail:
amohammadi@usm.my

Gelatin is mainly produced by collagen denaturation. Gelatin obtained from cold-water fish has low sol-gel transition temperatures. Chemical and physical treatments can be used to modify the gelatin network by establishing crosslinks between the gelatin chains to improve the gel's properties. In this study, crosslinking in cold-water fish gelatin-based hydrogels was established by tannic acid (TA) and caffeic acid (CA), each at concentrations of 1, 3 and 5%. The effect of CA and TA concentrations on the physicochemical properties of gelatin hydrogels was investigated. The strength of the gel and the degree of crosslinking were increased with increasing the concentration of tannic acid from 1 to 3%, which increased the strength of the gel from 325.00 to 343.62 N/mm² and the degree of crosslinking from 82.01 to 84.99%. At higher tannic acid levels, a decrease in gel strength and degree of crosslinking was observed 301.90 N/mm² and 75.48%, respectively. However, hydrogels' properties increased steadily with increasing levels of caffeic acid ($p < 0.05$). The swelling rate also decreased due to the combination of different levels of tannic acid and caffeic acid. The maximum swelling rate for the control was 1732.30%, and the minimum swelling rate for 3% tannic acid was 594.79%. The crosslinked gelatins by tannic acid significantly improved the denaturation temperature, and their thermal stability was higher than that of caffeic acid. This temperature was 89° C in untreated hydrogels, increased to 94 °C, and 98 °C in caffeic acid and tannic acid-treated hydrogels. Scanning electron microscopy images of the hydrogel samples showed that hydrogels' structure based on cold-water fish gelatin was spongy. The addition of crosslinking agents only slightly reduced the gelatin's pore size and had no significant effect.