



بررسی خصوصیات ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، فیزیکی و مکانیکی فیلم نانوکامپوزیت (نانو کیتوزان/آلوئه‌ورا) به همراه پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی

مهسا فلاحتی<sup>۱</sup>، پیمان آریایی\*<sup>۱</sup>، ژاله خوشخو<sup>۲</sup>، غلامحسین اسدی<sup>۳</sup>، سید ابراهیم حسینی<sup>۳</sup>

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

۲- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

| اطلاعات مقاله   | چکیده   |
|---|---|
| <p><b>تاریخ های مقاله :</b></p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۴/۲۵</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۷/۱۵</p>                                  | <p>این تحقیق با هدف بررسی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم هوشمند نانوکیتوزان/آلوئه‌ورا حاوی پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی انجام شده است. بدین منظور ابتدا پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی توسط آنزیم آلکالاز تحت تاثیر زمان های مختلف (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه) تهیه شد. سپس ۵ فیلم خوراکی شامل، نانو کیتوزان، نانوکیتوزان و ژل آلوئه‌ورا به همراه غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵٪) تهیه و ویژگی‌های فیلم‌ها بررسی گردید. بر اساس نتایج مربوط به پروتئین هیدرولیز شده، که پروتئین هیدرولیز شده از میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بالایی برخوردار بود. همچنین این پروتئین دارای اسیدهای آمینه هیدروفوب (۳۱/۷۸٪) و اسیدهای آمینه آروماتیک (۱۱/۷۴٪) بالایی بود. نتایج آزمون مکانیکی فیلم نشان داد افزایش غلظت پروتئین سبب کاهش مقاومت کششی، افزایش کشش تا قبل از نقطه پارگی نانو فیلم شد و همچنین بر اساس نتایج مربوط به آزمون‌های فیزیکی، افزایش غلظت پروتئین بر روی رطوبت و حلالیت تاثیر معنی داری نداشت، اما سبب افزایش نفوذ پذیری بخار آب و افزایش کدورت شد (<math>p &lt; 0/05</math>). پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی توانایی بالایی در فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و افزایش غلظت تاثیر مثبتی بر این پارامتر داشت (<math>p &lt; 0/05</math>), همچنین این فیلم‌ها خاصیت ضد میکروبی بالایی علیه باکتری‌های پاتوژن داشتند و خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری استافیلوکوکوس/ارئوس بالاتر از شیشیاکلی بود. فیلم نانوکامپوزیت حاوی ۱/۵٪ پروتئین هیدرولیز شده دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی را دارا بود (<math>p &lt; 0/05</math>). این مطالعه نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم‌های بر پایه نانوکیتوزان/آلوئه‌ورا را بهبود دهد. به طور خاص، فیلم‌های حاوی ۱/۵٪ پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی دارای خواص بهتری مانند قدرت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضد-میکروبی بودند.</p> |
| <p><b>کلمات کلیدی:</b></p> <p>پروتئین گیاهی، فیلم زیست تخریب پذیر، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، باکتری پاتوژن</p> |   |
| <p>DOI:10.22034/FSCT.21.157.220.</p> <p>* مسئول مکاتبات:<br/>p.aryaye@yahoo.com</p>   |   |

## ۱-مقدمه

دلماه‌ای، کیوی و توت فرنگی صورت گرفته است [۶، ۷، ۸، ۹].

در سال‌های اخیر پروتئین هیدرولیز شده حاوی پپتیدهای زیست فعال با استفاده از هیدرولیز آنزیمی از منابع گیاهی مختلف مانند شبدر، جوانه گندم کنجاله کنجد، کلزا و دانه هندوانه در مطالعات مختلف مورد استفاده واقع شده است [۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳]. پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط روش‌های آنزیمی، شیمیایی و یا تخمیری، تولید می‌شوند. در این بین استفاده از آنزیم جهت هیدرولیز منابع پروتئینی، به دلیل شرایط مساعد و مناسب‌تر تولید و فرآورده‌های جانبی کمتر، بیشتر مورد توجه است [۱۴]. هیدرولیز پروتئین‌ها شامل شکستن آنها به پپتیدهای کوچکتر و آمینواسیدهای آزاد است. آنزیم‌های مورد استفاده برای هیدرولیز پروتئین‌ها ممکن است. منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی داشته باشند در مقایسه با آنزیم‌های با منشأ گیاهی و جانوری، آنزیم‌های میکروبی دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به تنوع خواص پروتئولیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف اشاره نمود [۱۵]. به طور کلی آنزیم آلکالاز به دلیل عملکرد در pH قلیایی، درجه‌ی هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره‌ی پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را در مورد تولید پروتئین هیدرولیز شده به خود اختصاص داده است [۱۶، ۱۷]. در ایران سالانه حدود ۸۱۰۰ تن تفاله گوجه فرنگی مرطوب توسط کارخانجات ایجاد می‌شود که در بسیاری از مواقع بدون در نظر گرفتن موارد کاربردی از زنجیره مصرف حذف می‌گردند [۱۸]. دانه‌ی گوجه فرنگی شامل ۹/۲-۳۳/۲۲ درصد پروتئین و ۶-۲۹/۲۰ درصد روغن بوده بنابراین منبع بسیار خوبی برای روغن‌های خوراکی و پروتئین‌های گیاهی می‌باشد [۱۹، ۲۰]. پروتئین دانه‌ی گوجه‌فرنگی دارای اسیدهای آمینه آرژنین، لیزین، هیستیدین، فنیل آلانین، تریپتوفان، لوسین،

فیلم‌ها و پوشش‌های خوراکی را می‌توان لایه نازکی از مواد خوراکی تعریف نمود که از طریق غوطه وری، پاشیدن و غلطاندن بر روی سطح ماده‌ی غذایی قرار می‌گیرند و آلودگی میکروبی را محدود و از دست دادن رطوبت و سرعت تنفس را کنترل می‌کند، در نتیجه زوال را به تاخیر می‌اندازد [۱]. امروزه، انواع مختلف ترکیبات ضد میکروبی در طراحی بسته بندی‌ها و پوشش‌های خوراکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نانوذراتی که خاصیت ضد میکروبی دارند یک دسته‌ی مهم از آنها محسوب می‌شوند. کیتوزان هتروپلیمری ازت‌دار دارای بار الکتریکی مثبت است که از دی استیله شدن پلیمر طبیعی کیتین بدست می‌آید و به دلیل خاصیت ضد میکروبی، زیست تخریب پذیری و غیر سمی بودن به تنهایی یا همراه با سایر ترکیبات به عنوان پوشش جهت نگهداری انواع محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲، ۳]. نانوکیتوزان یک ماده‌ی طبیعی با خواص فیزیکیوشیمیایی عالی است که سازگار با طبیعت و زیست فعال است. علاوه بر این فعالیت آنتی‌باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نانو ذرات کیتوزان نیز گزارش شده است [۴، ۵]. استفاده از نانوذرات کیتوزان در بسته‌بندی مواد غذایی به دلیل سازگار بودن آن با مواد غذایی بسیار امیدوار کننده است [۵]. ژل آلون‌ه‌ورا یک پوشش پلی-ساکاریدی است، که از قسمت‌های داخلی برگ گیاه آلون‌ه‌ورا استخراج می‌شود و ویژگی‌هایی مانند یک لایه محافظ، کاهش از دست رفتن آب میوه و کاهش مقدار گاز در ارتباط با پوست میوه و کاهش تولید اتیلن در میوه خام را دارد [۶، ۷]. تاکنون مطالعات مختلفی بر روی تأثیر ژل آلون‌ه‌ورا در پوشش‌های خوراکی برای افزایش ماندگاری میوه‌ها و سبزی‌های تازه نظیر قارچ، فلفل

در آب غوطه‌ور شدند که در این حال پوسته سبک روی سطح و دانه‌های سنگین ته‌نشین شدند. دانه‌ها پس از جداسازی، در آفتاب خشک شدند و سپس با آسیاب خانگی تبدیل به آرد و از الک مش ۸۰ عبور داده شدند. آرد حاصله با حلال هگزان به نسبت ۱:۱۰ در ۴ مرحله روغن‌گیری و پس از ۱ روز باقیماندن در هوای آزاد، در کیسه‌های پلی اتیلنی انتقال داده شد و در یخچال نگهداری شد [۲۳].

### ۲-۳ تولید کنسانتره پروتئین دانه گوجه فرنگی

جهت استخراج پروتئین دانه گوجه فرنگی ابتدا پودر حاصله از مرحله قبل به نسبت ۱:۱۰ با آب دیونیزه مخلوط و pH آن با افزودن سود ۱ نرمال به ۱۱/۵ تنظیم و به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد، سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور × ۲۶۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت به pH ایزوالکتریک دانه گوجه فرنگی (۷) تنظیم شد و جهت رسوب پروتئین‌ها محلول حاصل با دور × ۲۶۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس کنسانتره پروتئینی حاصل با خشک‌کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۸].

### ۲-۴ هیدرولیز کنسانتره پروتئین هیدرولیز شده

بررسی محتوای پروتئینی نمونه‌ها از طریق روش کلدال انجام شد. برای فرآیند، هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئین دلنه گوجه فرنگی در غلظت ۵ درصد (وزنی حجمی) در بافر فسفات با pH برابر حد اپتیمم (۸/۵) برای آنزیم آلکالاز درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم شد. با رسیدن دمای بن‌ماری به دمای مورد نظر نمونه‌ها درون بن‌ماری قرار داده شدند و پس از ثابت شدن دمای بن‌ماری، آنزیم به نسبت مورد نظر به محلول‌ها اضافه گردید. واکنش در محدوده زمانی مشخص (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. پس از طی زمان مورد نظر به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم ارلن‌ها درون بن‌ماری ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده و سپس با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای

ایزولوسین، متیونین، والین، سیستئین، آلانین، پرولین، گلوتامین، سرین، آسپارژین و ترئونین می‌باشد [۲۱، ۲۲]. از این رو با توجه به مقدار پروتئین مناسب و ارزش تغذیه‌ای بالا می‌توان از ضایعات گوجه فرنگی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی‌های بیولوژیکی مناسب استفاده کرد [۲۰، ۲۱].

مطابق بررسی‌های انجام شده تاکنون تحقیقی در مورد اثر پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی در فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانوکیتوزان-آلوئه‌ورا صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضد-میکروبی فیلم نانوکامپوزیت حاوی نانوکیتوزان-آلوئه‌ورا همراه با پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱- مواد اولیه

تفاله گوجه فرنگی (ضایعات حاصل از فرآوری صنایع تبدیلی گوجه فرنگی) مورد نیاز از کارخانه رب آتا، ایران تهیه گردید. برگ‌های آلوئه‌ورا برای استفاده از ژل آن به صورت تازه خریداری شدند. برگ‌های تازه آلوئه‌ورا از گلخانه‌ی تولیدی در آمل، ایران خریداری شد. نانوکیتوزان (شرکت نانونوین پلیمر، ایران)، معرف فولین سیوکالتیو و رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲ دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما آلدریج آمریکا تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با خلوص آزمایشگاهی و تولیدی شرکت‌های مرک آلمان و سیگما آلدریج آمریکا بودند.

### ۲-۲- آماده سازی آرد گوجه فرنگی

از روش رسوبی برای جداسازی دانه‌ها از تفاله گوجه فرنگی استفاده شد. بدین منظور تفاله‌ها در ظروف پلاستیکی بزرگ

همزن به مدت ۴۵ دقیقه کاملاً حل گردید [۵، ۷]. از روش کستینگ<sup>۱</sup> برای به دست آوردن فیلم‌ها با ریختن ۵۰ میلی لیتر از هر محلول تعیین شده در ظرف ۱۲ سانتی متری شیشه پتری و خشک شدن در شرایط دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت استفاده شد. سپس، فیلم‌ها جدا شده و در کیسه‌های استومیکر نگهداری شد

#### ۲-۸- اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم‌ها

##### ۲-۸-۱- اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها

برای اندازه‌گیری ضخامت از میکرومتر با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر استفاده شد. میزان ضخامت در ۵ نقطه از فیلم اندازه‌گیری و میانگین آن گزارش شد [۲۵]

##### ۲-۸-۲- اندازه‌گیری میزان رطوبت فیلم‌ها

نمونه‌های فیلم با وزن مشخص درون پلیت‌های شیشه‌ای که از قبل به وزن ثابت رسیده و توزین شده بودند (W1) قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آن خشک گردید. نمونه همراه با پلیت پس از این مدت خارج شده و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید (W2). محتوای رطوبت فیلم‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۱ محاسبه گردید [۲۶].

رابطه ۱

$$\text{درصد رطوبت} = (W1 - W2) / W1 \times 100$$

##### ۲-۸-۳- ارزیابی حلالیت فیلم‌ها در آب

برای اندازه‌گیری میزان حلالیت فیلم‌ها قطعات مربعی شکل ۲ سانتی‌متری از فیلم‌ها تهیه شد. میزان وزن خشک نمونه‌ها با خشک کردن آن‌ها در آن ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد. سپس نمونه‌ها در محفظه ۵۰ میلی لیتری آب به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس فیلم از آب خارج شده و در آن ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت به منظور خشک شدن قرار داده شدند. در نهایت میزان وزن نهایی اندازه‌گیری شد [۲۶].

محیط سرد شد. در ادامه نمونه‌ها با دور  $\times 8000$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و با استفاده از سمپلر، مایع رویی آنها جدا و توسط دستگاه خشک کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۲].

#### ۲-۵- درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز براساس میزان  $\alpha$  آمینو اسید در میزان پروتئین نمونه محاسبه شد [۲۴].

#### ۲-۶- ترکیب اسید آمینه

به منظور ترکیب اسید آمینه پودر پروتئین هیدرولیز شده، نمونه پروتئینی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از اسید هیدروکلریک ۶ مولار کاملاً هیدرولیز شد. سپس اسیدهای آمینه موجود با افزودن فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) مشتق‌سازی شدند. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (ساخت آلمان) مجهز به ستون C18 و آشکارساز فلورسنت (RF-530) اندازه‌گیری گردید [۱۵].

#### ۲-۷- تهیه فیلم نانو کیتوزان-ژل آلوئه ورا

برگ آلوئه وراهای تهیه شده با آب مقطر استریل شست و شو شدند. نوک انتها و لبه‌ی برگ‌ها بریده و سپس با استفاده از یک چاقوی دستی قسمت میانی برگ به صورت طولی برش داده و پوست برگ‌ها از ژل وسط برگ جدا شد ژل پس از جداسازی با یک مخلوط کن به مدت ۵ دقیقه خرد و مخلوط شد. مخلوط حاصل پس از عبور از یک صافی پارچه‌ای با هدف تولید ژل خالص جمع‌آوری گردید و غلظت ۷/۵ درصد وزنی حجمی با افزودن آب مقطر استریل به ژل خالص تهیه گردید [۷]. برای تهیه‌ی ژل کامپوزیت، نانوذرات کیتوزان (۱ درصد)، ژل آلوئه ورا و غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد) به آن افزوده شد. بدین منظور مقادیر مختلف این ترکیبات در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد توسط

## ۲-۸-۴- نفوذپذیری در برابر بخار آب

به منظور سنجش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب (ASTM E 96-02) ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون سلول‌های اندازه‌گیری نفوذپذیری ریخته شد و سپس سلول‌های شیشه‌ای که سطح آنها توسط فیلم و به کمک گریس درزبندی شده بود، درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد میکند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل  $10^3 \times 2/337$  پاسکال ایجاد می‌نماید. سنجش تغییرات وزن سلول‌ها در طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتال با دقت  $0/0001$  گرم صورت گرفت. نرخ انتقال بخار آب بر حسب (گرم) - متر - ثانیه معادل با شیب خطوط حاصله تقسیم بر سطح سلول بود و از رابطه ۲ حاصل شد [۱۹]. سطح سلول‌ها  $0/00287$  متر مربع بود. از ضرب نمودن نرخ انتقال بخار آب (WVTR) در ضخامت فیلم‌ها (L) و تقسیم آن در اختلاف فشار موجود در دو سمت فیلم (AP) میزان نفوذپذیری بخار آب (WVP)  $(10^{-11} \text{ gs}^{-1}\text{m}^{-1}\text{Pa})$  بدست آمد [۲۶].

رابطه ۲

سطح سلول (متر) / شیب خط (گرم / ثانیه) = نرخ انتقال بخار آب (گرم<sup>-۱</sup> ثانیه<sup>-۲</sup> متر)

## ۲-۸-۵- کدورت

برای تعیین کدورت، فیلم‌های تهیه شده به صورت قطعاتی با ابعاد  $1 \times 4 \text{ cm}^2$  بریده شد. سپس این قطعات درون سل دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد از رابطه ۳ برای تعیین کدورت استفاده شد [۲۷].

رابطه ۳

$$100 \times \text{مقدار جذب} = \text{کدورت}$$

## ۲-۹- خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون‌های مکانیکی فیلم‌ها بر اساس روش اصلاح شده ASTM D0882-۰۲ صورت می‌گیرد. فیلم‌ها در قطعات ۷۶۱ سانتی‌متر بریده و تحت شرایط رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشروط می‌شوند.

ضخامت آنها در ۵ نقطه اندازه‌گیری و ضخامت متوسط آنها تعیین می‌شود. ویژگی‌های مکانیکی فیلم (میزان کشش پذیری (درصد)، مقاومت به کشش (مگاپاسکال) با استفاده از اینستران اندازه‌گیری می‌شود. در دستگاه اینستران فاصله بین دو فک ۵۰ میلی‌متر، سرعت حرکت فک بالایی ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه و فک پایینی ثابت می‌باشد [۲۶].

## ۲-۱۰- فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم با استفاده از روش بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد [۲۸]. به این منظور، ابتدا ۲۵ میلی‌گرم از فیلم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی مخلوط شد. سپس،  $8/2$  میلی‌لیتر از این محلول به لوله‌های آزمایش حاوی  $0/2$  میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌مولار DPPH در متانول اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. میزان جذب نوری نمونه‌ها و نمونه شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. کاهش جذب نوری در مقایسه با شاهد نشان‌دهنده توانایی ترکیبات موجود در فیلم در مهار رادیکال آزاد DPPH بود. در نهایت، درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید.

رابطه ۴:

$$100 \times (\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان}$$

$$\text{جذب کنترل}) - 1 = \text{درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد}$$

DPPH

## ۲-۱۱- تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

کشت‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1189) و *اشریشیا کلی* (PTCC 1399) از مجموعه میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. با استفاده از یک لوپ استریل، مقداری از هر باکتری از آمپول‌های استریل برداشته شد و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI Broth اضافه شد. محیط کشت تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گرمخانه

شده است که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد [۳۰].

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز در جدول ۱، نشان می‌دهد که با افزایش زمان فرآیند هیدرولیزاسیون درجه هیدرولیز که به معنی میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی است افزایش پیدا می‌کند، این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز که همان شدت جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول است، کاسته می‌شود [۳۱، ۳۲]. و اختلاف معنی‌داری ما بین زمان ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه مشاهده نشد. با افزایش زمان هیدرولیز، کاهش سوستر را رخ می‌دهد که بر مقادیر درجه هیدرولیز تاثیر می‌گذارد [۳۳]. نتایج مشابهی توسط گلپایگانی و همکاران [۳۳] در ارتباط با درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شد آنها نیز اعلام نمودند با افزایش زمان نگهداری مقادیر درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد اما پس از مدتی مقادیر درجه هیدرولیزاسیون تقریباً ثابت می‌شود.

### ۳-۲- میزان پروتئین

میزان پروتئین اولیه دانه گوجه فرنگی در مطالعه حاضر برابر با  $19/05 \pm 0/97$  درصد بوده است که مقادیر پروتئین اولیه گوجه فرنگی در مطالعات مختلف به طور میانگین  $17/71 \pm 0/40$  (مابین  $10/50$  تا  $25/03$ ) درصد گزارش شده است [۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸]. میزان پروتئین ایزوله دانه گوجه فرنگی برابر با  $37/41 \pm 0/91$  درصد بوده است. همچنین مقادیر پروتئین، پروتئین‌های هیدرولیز شده مابین  $46/95$  -  $90/66$  درصد بود (جدول ۱). این نتایج با نتایج مطالعه‌ای در ارتباط با مقادیر پروتئین ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی هم خوانی دارد آنها نیز اعلام نمودند مقادیر پروتئین پس از هیدرولیز بالاتر از ایزوله دانه گوجه فرنگی می‌باشد [۱۸]. همچنین اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین در بین نمونه‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر زمان‌های مختلف مشاهده شد. به طوریکه افزایش زمان هیدرولیز مقادیر پروتئین افزایش یافت و اختلاف معنی‌داری ما بین زمان ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه مشاهده نشد. با افزایش زمان

گذاری، باکتری‌ها با استفاده از یک لوپ استریل بر روی پلیت‌های آگار مغذی کشت داده شدند. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. ۳ تا ۵ کلنی جدا شده و همگن با استفاده از یک سواب استریل به لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی منتقل شدند. کدورت (جذب نوری) سوسپانسیون‌های باکتریایی در طول موج ۶۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون‌ها به غلظت برابر با نیم مک فارلند که معادل حدود  $10^8$  کلنی در هر میلی لیتر است، رقیق شدند. با استفاده از یک سواب استریل، سوسپانسیون‌های باکتریایی به طور یکنواخت بر روی سطح محیط‌های کشت گسترش داده شدند. دیسک‌های گرد فیلم با قطر ۶ میلی متر با استفاده از یک چاقوی گرد بریده شدند. دیسک‌های فیلم در فواصل مناسب بر روی پلیت‌های آغشته به باکتری قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، قطر هاله‌های شفاف اطراف دیسک‌های فیلم به میلی متر اندازه‌گیری و گزارش شد. این روش برای بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های خوراکی با استفاده از روش انتشار در آگار به کار گرفته شد [۲۹].

### ۲-۱۲- ارزیابی آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (One way Anova) با سطح احتمال خطای ۰.۰۵ انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به عنوان یک پارامتر ناظر بر میزان هیدرولیز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد، این فاکتور بیشتر به عنوان یک شاخص جهت مقایسه میان پروتئین‌های هیدرولیز شده-ی مختلف کاربرد دارد. از طرفی درجه هیدرولیز یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز

هیدرولیز، کاهش سوستر را رخ می دهد که احتمالاً بر مقادیر پروتئین تاثیر گذار می باشد.

**Table 1: Degree of hydrolysis and protein content of tomato seed protein hydrolysates at different hydrolysis**

| Hydrolysis time (min) | Degree of hydrolysis (%) | Protein content (%)     |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 30                    | 14.09±0.87 <sup>c</sup>  | 46.95±1.01 <sup>c</sup> |
| 60                    | 21.80±0.48 <sup>b</sup>  | 76.10±0.79 <sup>b</sup> |
| 90                    | 24.90±0.30 <sup>a</sup>  | 90.66±1.20 <sup>a</sup> |
| 120                   | 24.73±0.54 <sup>a</sup>  | 90.16±0.91 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> Values represent means ± SE (n = 3).

<sup>b</sup> Values in same columns with different lower letter are significantly different at P < 0.05.

(بیشترین اسید آمینه ضروری) و ۰.۵/۰۷٪ لوسین (بیشترین اسید آمینه ضروری) می باشد [۳۶].

عملکرد پروتئین هیدرولیز شده به پروفایل اسید آمینه آن بستگی دارد. اسیدهای آمینه آبرگیز (فنیل آلانین، پرولین، متیونین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین) و اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین هیستیدین، تریپتوفان تیروزین)، مسئول اغلب خواص کاربردی و زیستی پروتئین-های هیدرولیز شده و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد-التهابی، ضدسرطان و کاهش قند و فشار خون می باشند [۴۰، ۴۱]. در مطالعه حاضر، مجموع اسیدهای آمینه آبرگیز و اسید آمینه آروماتیک به ترتیب برابر با ۳۱/۷۸ و ۱۱/۷۴٪ بوده است که با توجه با مقادیر بالای آنها، می توان انتظار اثرات زیست فعال بودن آنان را در میزبان داشت.

مقادیر والین، ایزولوسین، لوسین، فنیل آلانین، لایزین و تیروزین در پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی بالاتر از توصیه های FAO/WHO [۴۲] در مورد پروتئین های حیوانی بود. که نشان دهنده کیفیت غذایی بالای این پروتئین می باشد.

### ۳-۳- ترکیب اسید آمینه

آمینواسید که اغلب به عنوان بلوک های سازنده پروتئین ها شناخته می شوند، ترکیباتی هستند که نقش های حیاتی زیادی از جمله حفظ ساختار سلولی، ترمیم و بازسازی عضلات و استخوان ها و ترمیم بافت های آسیب دیده را انجام می دهند [۳۹]. در مطالعه حاضر، میزان ۱۷ اسید آمینه شناسایی شد (جدول ۲). بالاترین مقادیر اسید آمینه، مربوط به اسید آمینه غیر ضروری گلوتامیک اسید ۱۶/۹۹٪ بوده است کمترین مقادیر مربوط به اسید آمینه غیر ضروری سیتئین و در ارتباط با اسیدهای آمینه ضروری بالاترین مقادیر مربوط به لوسین ۶/۹۹٪ و کمترین مقادیر مربوط به اسید آمینه ضروری متیونین می باشد. این نتایج با نتایج مطالعه ای در ارتباط با اسید آمینه گوجه فرنگی همخوانی دارد، آنها نیز بالاترین مقادیر را مربوط به اسید آمینه غیر ضروری را گلوتامیک اسید و اسید آمینه ضروری را لوسین اعلام نمودند [۳۷]. همچنین نتایج مشابهی دیگری نیز گزارش شد که آنها نیز اعلام نمودند پوست گوجه فرنگی حاوی، ۱۴/۵۶٪ گلوتامیک اسید

**Table 2: The amino acid composition tomato seed protein hydrolysates (g 100 g<sup>-1</sup>) (30 min)**

| Amino acid(g 100 g <sup>-1</sup> ) | Alcalase | FAO/ WHO, 1990 |
|------------------------------------|----------|----------------|
| Histidine <sup>a</sup>             | 2.48     |                |
| Isoleucine <sup>a</sup>            | 3.44     | 2.8            |
| Leucine <sup>a</sup>               | 6.99     | 6.6            |
| Lysine <sup>a</sup>                | 3.97     | 5.8            |

|                             |       |     |
|-----------------------------|-------|-----|
| Methionine <sup>a</sup>     | 0.74  |     |
| Phenyl alanine <sup>a</sup> | 5.97  | 6.3 |
| Tyrosine                    | 3.29  | 1.1 |
| Threonine <sup>a</sup>      | 2.59  | 3.4 |
| Arginine                    | 6.92  |     |
| Valine <sup>a</sup>         | 4.15  | 3.5 |
| Aspartic acid               | 8.59  |     |
| Glycine                     | 3.95  |     |
| Proline                     | 4.11  |     |
| Serine                      | 3.47  |     |
| Alanine                     | 3.09  |     |
| Cystein                     | 0.37  |     |
| Glutamic acid               | 16.99 |     |
| Total amino acid            | 80.02 |     |
| HAA <sup>b</sup>            | 31.78 |     |
| AAA <sup>c</sup>            | 11.74 |     |

a Essential amino acids

b Total hydrophobic amino acids (alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, proline, methionine and cysteine)

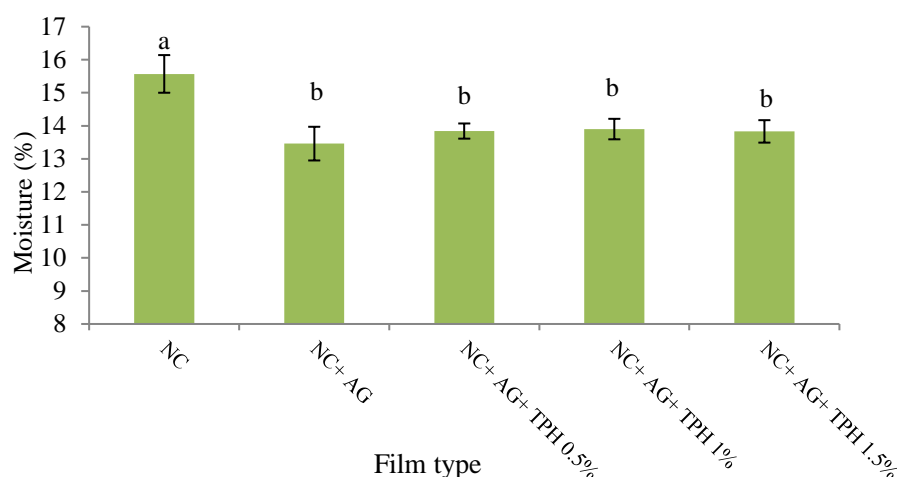
c Total amount of aromatic amino acids (phenylalanine, histidine, tryptophan and tyrosine)

در فیلم‌های ترکیبی حاصل می‌باشد. این نتایج با نتایج مطالعه‌ی دیگری در ارتباط با فیلم مرکب دانه سویا و پروتئین آفتاب‌گردان حاوی پروتئین هیدرولیز شده پلاسما هم‌خوانی دارد. آنها نیز اعلام نمودند افزودن پروتئین هیدرولیز شده تاثیر بر مقادیر رطوبت و حلالیت فیلم نداشت [۴۳]. محقق دیگری نیز اعلام نمود افزودن پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات تاثیر معنی‌داری بر مقادیر رطوبت و حلالیت فیلم ندارد. مقادیر رطوبت در مطالعه آنها مابین ۱۰/۷۵-۱۲/۲۲٪ بوده است [۴۴].

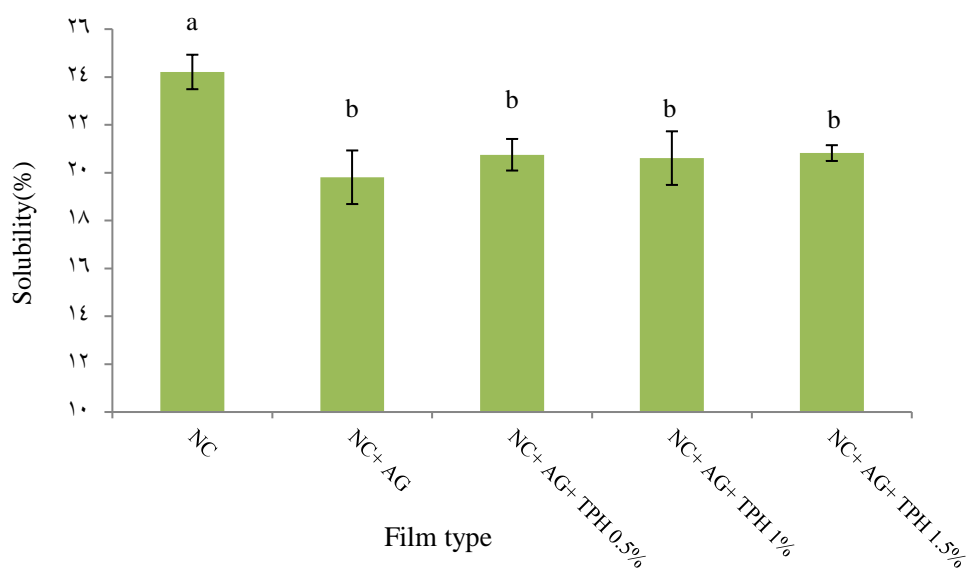
### ۳-۴- بررسی خاصیت فیزیکی فیلم‌ها

حلالیت و محتوی رطوبت دو فاکتور مهم فیلم‌های زیست تخریب پذیر می‌باشند که بر مقاومت فیلم به آب به ویژه در محیط‌های مرطوب تاثیرگذار می‌باشند. با توجه به نتایج بیشترین مقادیر رطوبت و حلالیت (نمودار ۱ و ۲) در تیمار نانوکیتوزان مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). افزودن ژل آلوه‌ورا سبب کاهش میزان رطوبت و حلالیت فیلم شد اما افزودن پروتئین هیدرولیز شده تاثیر معنی‌داری بر مقادیر این پارامترها نداشت. در واقع افزودن پروتئین هیدرولیز شده تغییری در ارتباط با میزان رطوبت و حلالیت در فیلم ایجاد نکرد. احتمالاً کاهش در حلالیت در آب مشاهده شده در نتیجه افزودن ژل آلوه‌ورا به کیتوزان افزایش خاصیت آبرگریزی





**Fig 1.** Moisture content of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

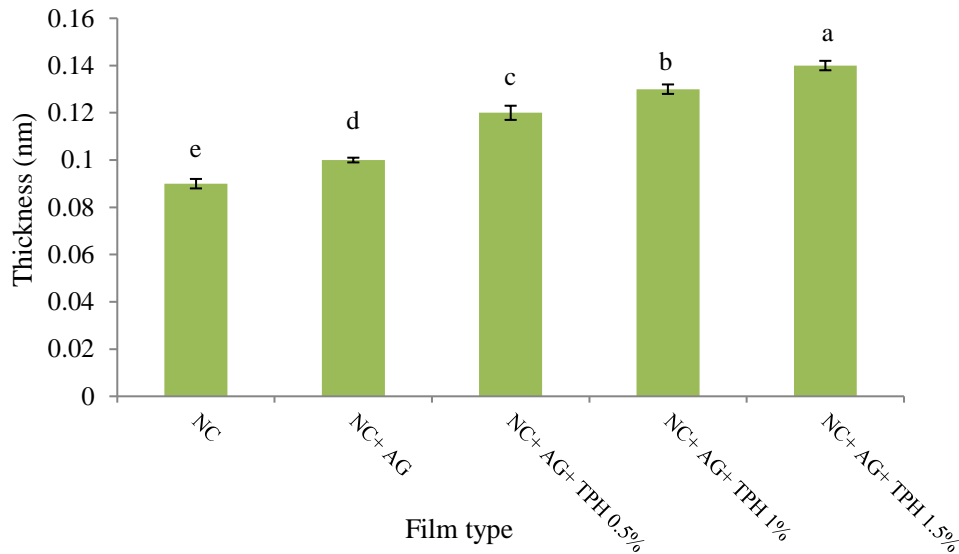


**Fig 2.** Solubility content of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

هیدرولیز شده ۱/۵٪ مشاهده شد. علت افزایش ضخامت، احتمالاً به دلیل افزایش محتوای جامد پس از افزودن ژل و پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد. به‌طور کلی، ضخامت فیلم به طبیعت و ترکیب فیلم، بستگی دارد. تاثیر طبیعت و ترکیب فیلم بر ضخامت‌های حاصل را می‌توان در نتایج حاصل از سایر محققین نیز مشاهده کرد. در مطالعاتی در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات [۴۴] و در ارتباط با فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز

ضخامت فیلم‌های خوراکی به غلظت مواد تشکیل دهنده، مقدار محلول اولیه فیلم در واحد سطح و سرعت ریختن روی سطح بستگی دارد و این خصوصیت تأثیر بسیار زیادی بر فاکتورهای مهم در ارزیابی فیلم‌ها نظیر نفوذپذیری به بخار آب و رفتارهای مکانیکی آنها دارد [۴۵]. با توجه به نتایج کمترین مقادیر ضخامت (نمودار ۳) در فیلم نانوکیتوزان بوده است. با افزودن ژل آلژینات و پروتئین هیدرولیز شده به فیلم میزان ضخامت افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان ضخامت در فیلم نانو کیتوزان+ ژل آلژینات+ پروتئین

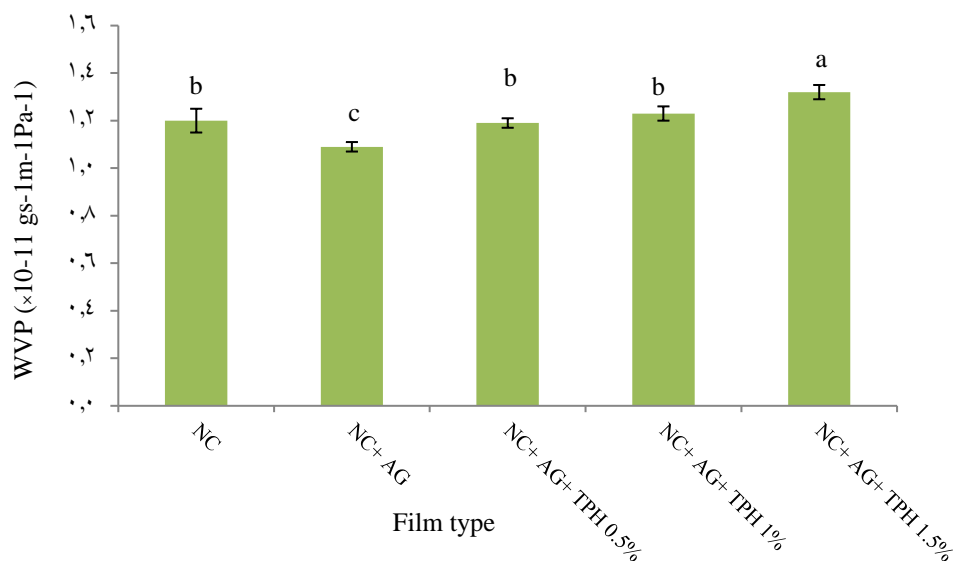
شده اسکلت کپور نقره‌ای ماهی [۴۶] نتایج مشابهی مشاهده شد.



**Fig 3.** Thickness of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

میزان نفوذپذیری افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان WVP در فیلم نانو کیتوزان + ژل آلوه‌ورا + پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵٪ مشاهده شد. علت این امر برای دارا بودن اثر پلاستی‌سایزری پروتئین هیدرولیز شده با وزن مولکولی کم می‌باشد. وجود پروتئین منجر به افزایش گروه‌های آبدوست در ساختار فیلم شده و متعاقباً وجود مولکول‌های آب بیشتر در آن منجر به افزایش WVP فیلم می‌شود، همچنین افزایش ضخامت لایه‌های پروتئین هیدرولیز شده نیز بر مقادیر WVP تاثیر گذار می‌باشد [۴۴، ۴۶]. در مطالعاتی در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات [۴۴] و در ارتباط با فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده اسکلت کپور نقره‌ای ماهی [۴۶] نتایج مشابهی مشاهده شد.

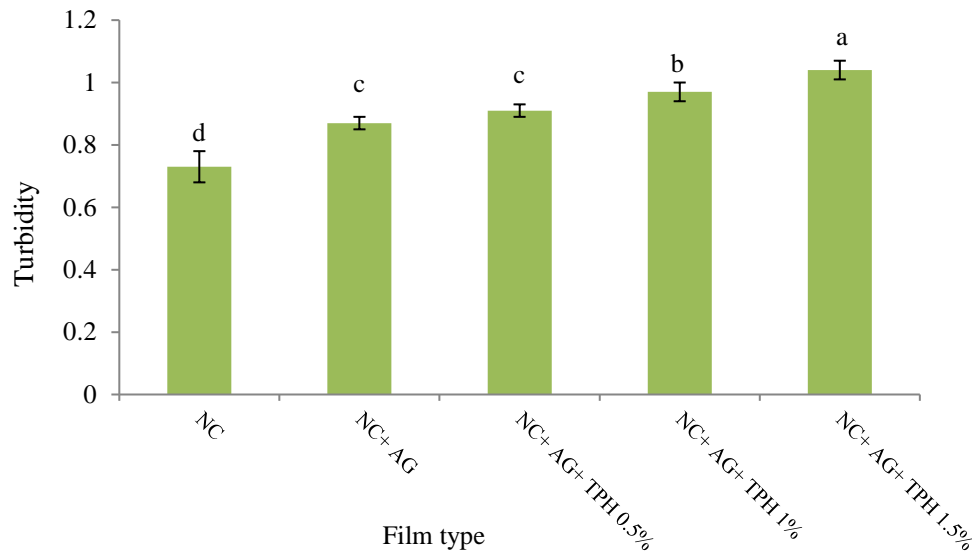
به طور کلی عوامل مختلفی مانند نوع ترکیبات و میزان برهمکنش بین آن‌ها، ضخامت، حلالیت و نفوذپذیری مولکول‌های بخار آب در ماتریس فیلم بر میزان WVP تاثیر می‌گذارد [۴۶]. با توجه به نتایج افزودن ژل آلوه‌ورا به فیلم نانو کیتوزان سبب کاهش مقادیر نفوذپذیری فیلم‌ها (نمودار ۴) شد. به طور کلی، نفوذپذیری بالای فیلم کیتوزان به بخار آب مرتبط با طبیعت هیدروفیلی آن است که ملکول‌های آب با بافت وارد واکنش شده و منجر به افزایش میزان نفوذپذیری به بخار آب می‌شود [۴۷]. لذا، کاهش مشاهده شده در این مطالعه در نتیجه افزودن ژل آلوه‌ورا مرتبط با تعاملات احتمالی میان نانو کیتوزان و ترکیبات مختلف موجود در ژل آلوه‌ورا است که نفوذپذیری به بخار آب را در فیلم‌های ترکیبی حاصل با کاهش نسبت بخش هیدروفیل به هیدروفوب کاهش می‌دهد. با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم



**Fig 4.** WVP of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

شد. افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب افزایش ضخامت فیلم می‌شود، بنابراین شفافیت را کاهش و کدورت را افزایش می‌دهد [۴۶]. نتایج مشابهی در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه به فیلم آلژینات مشاهده شد، در آن مطالعه اعلام شد، افزایش پراکندگی نور (یعنی کاهش شفافیت) در ارتباط با افزایش تجمع پروتئین در فیلم آلژینات می‌باشد [۴۴]. تغییرات در شفافیت فیلم ممکن است سبب کاهش تقاضا مصرف کننده‌ها باشد، اما سرعت انتقال نور مرئی کم یک مزیت برای بسته‌بندی مواد غذایی است زیرا وجود نور می‌تواند باعث تغییرات رنگ و طعم، از دست دادن مواد مغذی و در نهایت فساد اکسیداتیو مواد غذایی شود.

ویژگی‌های نوری فیلم‌ها، مانند رنگ، شفافیت و عبور نور، ویژگی‌های مهمی هستند که بر ظاهر، پذیرش، تجاری‌سازی، بازارپسندی و مناسب بودن آن‌ها برای کاربردهای مختلف تأثیر می‌گذارند. با توجه به نتایج کمترین مقادیر کدورت (نمودار ۵) در فیلم نانو کیتوزان بوده است. به طور کلی افزودن ژل آلورا در فیلم سبب ایجاد ظاهری تیرتری شد، که می‌تواند مرتبط با این حقیقت باشد که ژل آلورا استخراج شده در این مطالعه می‌تواند حاوی ترکیب آنتراکوئینون باشد که نسبت به هوا و نور حساس بوده و حذف آنها از ترکیب ژل نیز دشوار است که حاصل اکسیداسیون فنل است [۴۸]. با پروتئین هیدرولیز شده به فیلم نیز میزان کدورت افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان کدورت در فیلم نانو کیتوزان+ ژل آلوره‌ورا+ پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵٪ مشاهده

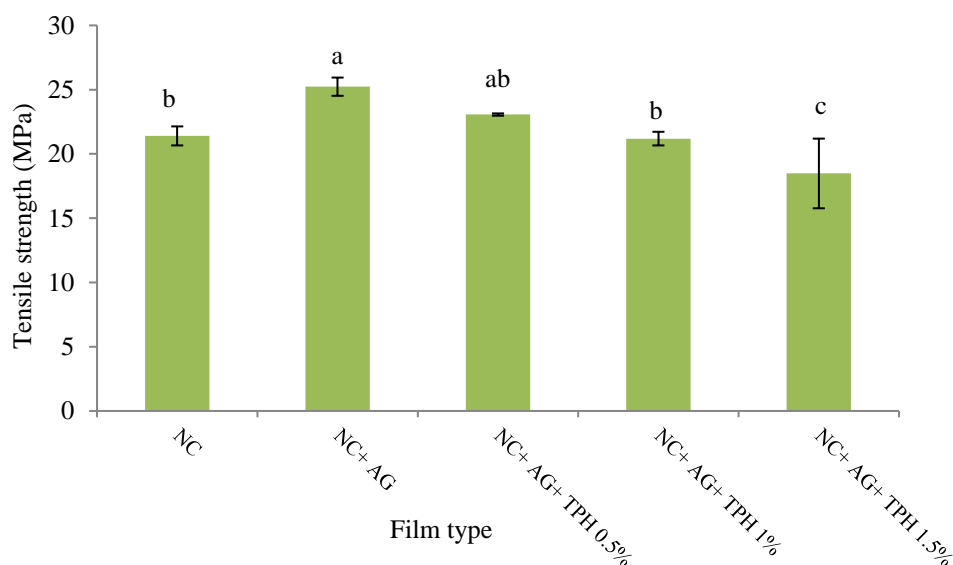


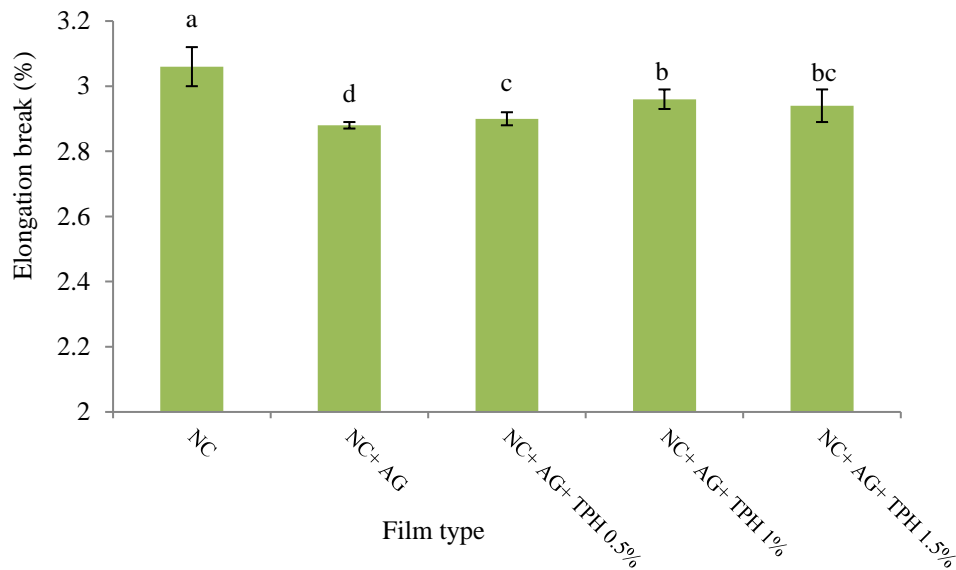
**Fig 5.** Turbidity of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

افزودن آلونئورا به فیلم کیتوزان باعث کاهش حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی فیلم کیتوزان شد. در مطالعه آنها علت این امر را کمپلکس و اتصالات عرضی مابین کیتوزان و آلونئورا اعلام گردید [۵۰]. افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب کاهش مقاومت کششی و افزایش حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی شد. خواص مکانیکی فیلم‌ها ارتباط نزدیکی با توزیع و چگالی برهم‌کنش‌های درون و بین مولکولی بین زنجیره‌های پلیمری در شبکه‌های فیلم دارد. بنابراین، افزودن پروتئین هیدرولیز شده به نانوفیلم مرکب می‌تواند با کاهش نیروهای بین مولکولی و افزایش تحرک زنجیره‌های پروتئینی، بر خواص مکانیکی لایه‌ها تأثیر بگذارد [۵۱].

### ۳-۵- بررسی خاصیت مکانیکی فیلم‌ها

خصوصیات مکانیکی پلیمرهای مرکب از جمله خصوصیتی است که به میزان برهم‌کنش‌ها در سطح مشترک ترکیبات بستگی دارد. بطور کلی، برقراری برهم‌کنش‌های مناسب میان ترکیبات، سبب بهبود معنی‌دار در ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها می‌شود [۴۹]. بر اساس نتایج با افزودن ژل آلونئورا به فیلم نانوکیتوزان مقاومت کششی افزایش (نمودار ۶) و حداکثر کشش تا قبل از نقطه پارگی (نمودار ۷) کاهش یافته است. که این امر نشان دهنده چقرمگی و انعطاف‌پذیری مناسب فیلم پس از افزودن آلونئورا بود. در مطالعه‌ای نیز اعلام شد

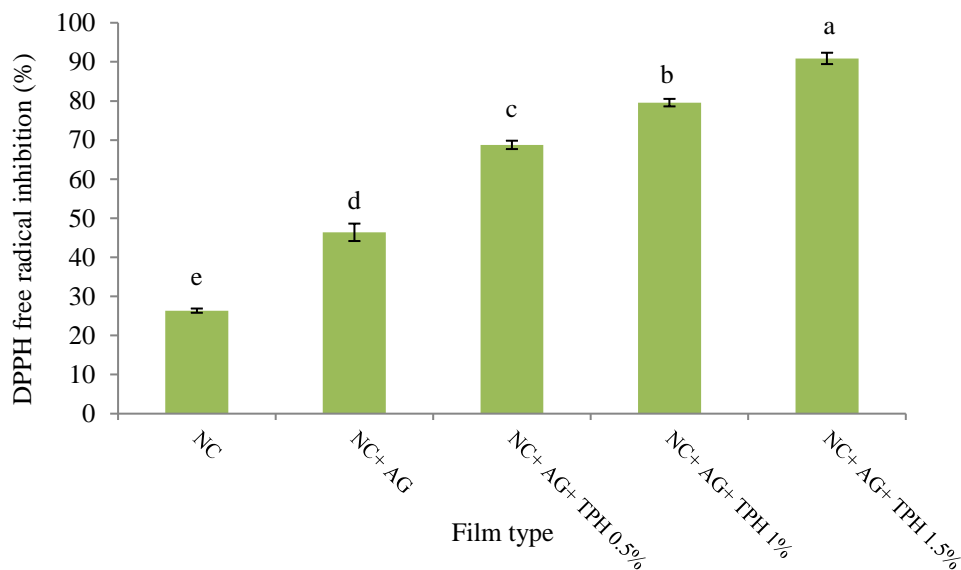


**Fig 6.** Tensile strength of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein**Fig 7.** Elongation breaks of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

نانومتر کاهش می‌یابد، از روی اندازه‌گیری کاهش شدت جذب به وسیله طیف سنجی می‌توان به خصوصیات آنتی-اکسیدانی آن پی‌برد [۵۲]. بر اساس نتایج (نمودار ۸) مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکیتوزان برابر با ۲۶/۳۵ درصد بود. دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان توسط سایر محققین نیز گزارش شده است [۵۳، ۵۴]. همچنین با افزودن ژل آلئوئه‌ورا مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. همچنین محققین اعلام نمودند که اثر آنتی‌اکسیدانی ژل آلئوئه‌ورا با حضور گلوکاتایون پراکسیداز، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و ترکیبات فنلی مرتبط است [۵۵، ۵۰].

### ۳-۶- بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

یکی از روش‌های رایج برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مهار رادیکال‌های آزاد DPPH است. DPPH یک رادیکال پایدار است که محلول متانولی آن دارای رنگ بنفش می‌باشد که بیشترین جذب نوری را در ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر نشان می‌دهد. پایه و اساس این روش این است که رادیکال DPPH به عنوان پذیرنده الکترون از یک مولکول اهدا کننده مانند آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند در این حالت رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تبدیل می‌شود. بنابراین شدت جذب در ۵۱۵

**Fig 8.** Antioxidant activity of nano-composite film along with hydrolyzed tomato seed protein

استفاده از خاصیت پلی کاتیونی خود توانایی چلاته کردن فلزات و عناصر ضروری و خارج کردن آنها از دسترس باکتری‌ها را دارد. دوم آن که کیتوزان از طریق تشکیل پیوند با آنیون‌های دیواره سلولی باکتری‌ها، سبب تخریب دیواره سلولی آن‌ها می‌شود [۵۷، ۵۸]. با افزودن ژل آلوه‌ورا به فیلم، خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها افزایش یافت. آنتراکوئینون<sup>۲</sup> و دی‌وا هیدروکسی آنتراکوئینون<sup>۳</sup> مواد مؤثر در ژل آلوه‌ورا می‌باشند که نقش ضد میکروبی دارند [۵۹]. در تحقیق دیگری نیز فعالیت ضد میکروبی ژل آلوه‌ورا در برابر تعدادی از باکتری‌های مثبت و گرم منفی توسط چندین روش مختلف نشان داده شده است [۶۰]. همچنین افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب افزایش فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها شد. به طوری که بیشترین میزان خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها علیه هر دو باکتری در فیلم نانو کیتوزان+ ژل آلوه‌ورا+ پروتئین هیدرولیز شده ۱/۵٪ مشاهده شد. پپتیدهای 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 [۴۴، ۵۷، ۶۱].

بر اساس نتایج با افزودن پروتئین هیدرولیز شده خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها افزایش یافت و افزایش غلظت پروتئین تاثیر مثبتی بر مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به تأثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آنها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل به‌عنوان شلاته کننده فلزات، خاموش کننده اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغاز کننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن می‌باشند [۵۰]. سایر محققین نیز اعلام نمودند پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال گیاهی در شرایط آزمایشگاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند [۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۳۱]. در مطالعه‌ای نیز اعلام شد فیلم نانوسلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده دانه کاج توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا می‌باشد و با افزایش غلظت پروتئین این توانایی افزایش می‌یابد [۵۶].

### ۳-۷- بررسی خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها

بر اساس نتایج فیلم نانوکیتوزان در برابر هر دو باکتری دارای فعالیت ضد میکروبی بود. دو تئوری را در زمینه مکانیسم ضد میکروبی کیتوزان وجود دارد. اول آن که کیتوزان با

**Table 3:** Influence of hydrolyzed tomato seed protein on the antimicrobial activity of nano-composite film

| Film<br>Microorganism | <i>Staphylococcus aureus</i><br>(mm) | <i>Escherichia coli</i> (mm) |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| NC                    | 10.90± 0.11 <sup>e</sup>             | 9.53± 0.40 <sup>e</sup>      |
| NC+ AG                | 15.54± 0.43 <sup>d</sup>             | 14.00± 0.03 <sup>d</sup>     |
| NC+ AG+ TPH 0.5%      | 19.32± 0.58 <sup>c</sup>             | 17.32± 0.29 <sup>c</sup>     |
| NC+ AG+ TPH 1%        | 21.43± 1.02 <sup>b</sup>             | 19.27± 0.28 <sup>b</sup>     |
| NC+ AG+ TPH 1.5%      | 23.80± 0.28 <sup>a</sup>             | 21.04± 0.98 <sup>a</sup>     |

Data are given as mean± standard deviation (n=3)

Different small letters in the same column indicate significant differences (P <0.05)

## ۴- نتیجه‌گیری

هیدرولیز شده بر خصوصیات مکانیکی فیلم‌ها از جمله کاهش مقاومت کششی و افزایش کشش تا نقطه پارگی تأثیر مثبتی داشت. در مجموع، این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی در غلظت ۱/۵ درصد، می‌تواند به عنوان یک افزودنی مناسب در فیلم‌های نانوکیتوزان/آلوئه‌ورا مورد استفاده قرار گیرد.

این تحقیق نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی به فیلم‌های نانو کیتوزان/آلوئه‌ورا می‌تواند خواص فیلم را بهبود بخشد. با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده تا ۱/۵ درصد، فیلم‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالاتری داشتند. همچنین افزودن پروتئین

## ۵- منابع

- [1] Pleșoianu, A. M., & Nour, V. (2022). Effect of some polysaccharide-based edible coatings on fresh white button mushroom (*Agaricus bisporus*) quality during cold storage. *Agriculture*, 12, 1491.
- [2] Rejane, C. G., Sinara, T. B. M., & Odilio, B. G. A. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26, 122–127.
- [3] Shahi, T., Ghorbani, M., Jafari, S. M., Sadeghi Mahoonak, A., Maghsoudlou, Y., & Beigbabaie, A. (2022). Effect of chitosan nano-coating loaded with pomegranate peel extract on physicochemical and microbial characteristics of pomegranate arils during storage. *FSCT*, 19(126), 71-85.
- [4] Salimiraad, S., Safaeian, S., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., & Mousavi Nadoushan, R. (2022). Characterization of novel probiotic nanocomposite films based on nano chitosan/ nano cellulose/ gelatin for the preservation of fresh chicken fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 162, 113429.
- [5] Shakour, N., Khoshkhoo, Z., Akhondzadeh Basti, A., Khanjari, A., & Mahasti Shotorbani, P. (2021). Investigating the properties of PLA-nanochitosan composite films containing Ziziphora Clinopodioides essential oil and their impacts on oxidative spoilage of *Oncorhynchus mykiss* fillets. *Food Science & Nutrition*, 00, 1–13.
- [6] Farajpour, P., & Sheykhloei, H. (2021). Study on edible coating effect, based on Aloe vera gel and thymol on the postharvest quality and storage life of strawberry. *FSCT*, 18(112), 81-95.
- [7] Amiri, S., Rezazad Bari, L., & Ahmadi Partovi, G. (2022). The effect of edible coating based on Aloevera gel containing copper oxide nanoparticles on freshly cut pieces of kiwi in refrigerator temperature. *Journal of Packaging Science and Technology*, 13(49), 19-34.
- [8] Mohammadi, M., & Saidi, M. (2021). Effect of Aloe vera gel and Arabic gum coating on quality characteristics of green bell peppers (*Capsicum annum* L.) during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12(2), 39-52.
- [9] Mohebbi, M., Ansarifar, E., Hasanpour, N., & Amiryousefi, M. R. (2012). Suitability of Aloe vera and gum tragacanth as edible coatings for extending the shelf life of button mushroom. *Food and Bioprocess Technology*, 5(8), 3193–3202.
- [10] 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.
- [11] Ghelich, S., Ariaii, P., & Ahmadi, M. (2022). Evaluation of functional properties of wheat germ protein hydrolysates and its effect on physicochemical properties of frozen yogurt. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28, 69.
- [12] Mirzapour, Z., Ariaii, P., Safari, R., et al. (2022). Evaluation the effect hydrolyzed canola meal protein with composite coating on physicochemical and sensory properties of chicken nugget. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28, 97.
- [13] Mighan, N. M., Ariaii, P., & Soltani, M. S. (2024). Investigating the possibility of increasing the microbial and oxidative stability of silver carp burgers using hydrolyzed protein of watermelon seeds. *Food Science and Biotechnology*, 33, 375–388.
- [14] Nemati, M., Shahosseini, S. R., & Ariaii, P. (2024). Review of fish protein hydrolysates: production methods, antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation. *Food Science and Biotechnology*, 33, 1789–1803.
- [15] 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, 72.
- [16] Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M., & 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.
- [17] Nemati, M., Javadian, S. R., & Keshavarz, M. (2019). Production of protein hydrolysates from Caspian shad (*Alosa caspia*) by-products using Alcalase enzyme. *Journal of Marine Biology*, 11(43), 87-95.
- [18] Shariat alavi, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Mohammadzadeh, J. (2019). Determination of optimum conditions for production of hydrolyzed protein with antioxidant capability and decrease of nitric oxide from tomato wastes by Alcalase. *FSCT*, 15(84), 137-151.
- [19] Sogi, D. S. (2001). Functional properties and characterization of tomato waste seed proteins (Doctoral dissertation, Guru Nanak Dev University).
- [20] Baker, P. W., Preskett, D., & Krienke, D. (2022). Pre-processing waste tomatoes into separated streams with the intention of recovering protein: Towards an integrated fruit and vegetable biorefinery approach to waste minimization. *Waste and Biomass Valorization*, 13, 3463-3473.
- [21] Kumar, M., Chandran, D., Tomar, M., Bhuyan, D. J., Grasso, S., Sá, A. G. A., ... & Mekhemar, M. (2022). Valorization Potential of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed: Nutraceutical Quality, Food Properties, Safety Aspects, and Application as a Health-Promoting Ingredient in Foods. *Horticulturae*, 8, 265.
- [22] Persia, M. E., Parsons, C. M., Schang, M., & Azcona, J. (2003). Nutritional evaluation of dried tomato seeds. *Poultry Science*, 82, 141-146.
- [23] Yemisi, A., & Kayode, O. A. (2007). Evaluation of the gelation characteristics of mucuna bean flour and protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6(8), 2243-2262.
- [24] Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., & Nemati, M. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1718-1726.
- [25] Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166.
- [26] 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.
- [27] Peng, Y., & Li, Y. (2014). Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293.
- [28] Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 770-775.
- [29] 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 Science*, 86(2), 283-288.
- [30] Dorvaj, Z., Javadian, S. R., Oveissipour, M., & Nemati, M. (2013). Use of protein hydrolysates from Caspian Sea sprat (*Clupeonella Cultiventris*) as a nitrogen source for bacteria growth media (*Vibrio Anguillarum*, *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Subtilis*). *Journal of Aquatic Animals & Fisheries*, 4(15), 11-18.
- [31] 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(1), e13729.
- [32] Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37(11), 1263-1269.
- [33] Golpaigani, M. H., Ariaii, P., & Ahmadi, M. (2023). Preservation effect of protein hydrolysate of rainbow trout roe with a composite coating on the quality of fresh meat during storage at  $4 \pm 1$  °C. *Food Measure*, 17, 2416-2428.
- [34] Ahmed, M. J., Iya, I. R., & Dogara, M. F. (2020). Proximate, mineral and vitamin content of flesh, blanched and dried tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Asian Food Science Journal*, 18, 11-18.
- [35] Ramos-Bueno, R. P., Romero-Gonzalez, R., Gonzalez-Fernandes, M. J., & Guil-Guerrero, J. L. (2017). Phytochemical composition and in vitro anti-tumour



- activities of selected tomato varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 488-496.
- [36] Elbadrawy, E., & Sello, A. (2016). Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1010-S1018.
- [37] Ali, M. Y., Sina, A. A. I., Khandker, S. S., Neesa, L., Tanvir, E. M., & Kabir, A. (2021). Nutritional composition and bioactive compounds in tomatoes and their impact on human health.
- [38] Oboulbiga, E. B., Parkouda, C., Sawadogo-Lingani, H., Compaoré, E. W. R., Sakira, A. K., & Traoré, A. S. (2017). Nutritional composition, physical characteristics and sanitary quality of the tomato variety Mongol F1 from Burkina Faso. *Food and Nutrition Sciences*, 8, 444-455.
- [39] Elango, R., & Laviano, A. (2017). Protein and amino acids: Key players in modulating health and disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20, 69-70.
- [40] Yathisha, U. G., Bhat, I., Karunasagar, I., & Mamatha, B. S. (2018). Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(15), 2363-2374.
- [41] Gao, M., Feng, L., & Jiang, T. (2014). Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food Chemistry*, 149, 107-113.
- [81] FAO/WHO. (1991). Protein quality evaluation. Rome, Italy: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- [82] 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.
- [83] de Oliveira Filho, J.M., Rodrigues, J.M., Valadares, A.C.F., de Almeida, F.D.L., & Dyszy, F.H. (2019). Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 92, 267-275.
- [84] Hosseini, A., & Moradinezhad, F. (2018). Effect of short-term high CO<sub>2</sub> treatment on quality and shelf life of button mushroom (*Agaricus bisporus*) at refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1, 37-48.
- [85] 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.
- [86] Fajardo, P., Martins, J. T., Fucinos, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349-356.
- [87] Yamaguchi, I., Mega, N., & Sanada, H. (1993). Components of the gel of aloe vera (*L. burm. F.*). *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 57, 1350-1352.
- [88] Brindle, L.P., & Krochta, J.M. (2008). Physical properties of whey protein hydroxy propylmethylcellulose blend edible films. *Journal of Food Science*, 73(9).
- [89] Yoshida, C.M.P., Pacheco, M.S., de Moraes, M.A., Lopes, P.S., Severino, P., Souto, E.B., & da Silva, C.F. (2021). Effect of Chitosan and Aloe Vera Extract Concentrations on the Physicochemical Properties of Chitosan Biofilms. *Polymers*, 13, 1187.
- [90] Hasanzati Rostami, A., Motamedzadegan, A., Hosseini, S.E., Rezaei, M., & Kamali, A. (2017). Evaluation of Plasticizing and Antioxidant Properties of Silver Carp Protein Hydrolysates in Fish Gelatin Film. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(4), 457-467.
- [91] Mandal, S., Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., & Mandal, N. (2011). Assessment of the Antioxidant and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity of Methanolic Extract of *Caesalpinia crista* Leaf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 173768.
- [92] Muñoz-Tebar, N., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., & Viuda-Martos, M. (2023). Chitosan Edible Films and Coatings with Added Bioactive Compounds: Antibacterial and Antioxidant Properties and Their Application to Food Products: A Review. *Polymers*, 15, 396.
- [93] Morachis-Valdez, A.G., Gómez-Oliván, L.M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M.D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2017). Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at -18°C. *International Journal of Food Science*, 2017, 2812483.
- [94] Langmead, L., Makins, R.J., & Rampton, D.S. (2004). Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro.

Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 19, 521-527.

[95] Pirveisi, N., Ariaii, P., Esmaili, M., Lotfi, L., Kaboosi, H., & Afshar Sedigh, R. (2023). Investigating active packaging based on cellulose nanofibers oxidized by TEMPO method containing hydrolyzed protein obtained from pine tree fruit on the quality of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the storage period. *Food Measurement*, 17, 3323-3337.

[96] Ghafari, E., Ariaii, P., & Bagheri, R. (2024). Investigating the effect of nanochitosan-Iranian tragacanth gum composite film along with *Eryngium campestre* essential oil on the shelf life of goat meat. *Food Measurement*, 18, 1543-1558.

[97] Barzegar, H., Carbasi, A., Jamalian, J., & Lari, M.A. (2008). The possibility of using chitosan as a natural preservative in mayonnaise. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 12, 43.

[98] Emamifar, A. (2015). Evaluation of Aloe vera gel effect as an edible coating on microbial, physicochemical and sensorial characteristics of fresh strawberry during storage. *New Food Technologies*, 6, 15-29.

[99] Habeeb, F., Shakir, E., Bradbury, F., Cameron, P., Taravati, M.R., Drummond, A.J., Gray, A.I., & Ferro, V.A. (2007). Screening methods used to determine the anti-microbial properties of Aloe vera inner gel. *Methods*, 42(4), 315-320.

[100] 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.



## Scientific Research

### Investigation of antimicrobial, antioxidant, physical, and mechanical properties of a nano-composite film (nano-chitosan/ aloe vera) along with hydrolyzed tomato seed protein

Mahsa Falahati<sup>1</sup>, Peiman Ariaii<sup>1\*</sup>, Zhaleh Khoshkhoo<sup>2</sup>, Gholamhassan Asadi<sup>3</sup>, Seyed Ebrahim Hosseini<sup>3</sup>

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

2 -Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3 -Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

**Article History:**

Received:2024/7/15

Accepted:2024/10/6

**Keywords:**

Plant-based protein,

Biodegradable film,

Antimicrobial activity,

Antioxidant activity,

Pathogenic bacteria

**DOI: 10.22034/FSCT.21.157.220.**

\*Corresponding Author E-  
Email:p.aryaye@yahoo.com

This research aimed to investigate the physical, mechanical, antioxidant, and antimicrobial properties of a smart nanocomposite film based on chitosan/ aloe vera containing hydrolyzed tomato seed protein. For this purpose, the hydrolyzed tomato seed protein was first prepared using the Alcalase enzyme under different time conditions (30, 60, 90, 120 minutes). Then, 5 edible films including nano-chitosan, nano-chitosan and aloe vera gel with different concentrations of hydrolyzed protein (0, 0.5, 1 and 1.5%) were prepared, and the film properties were evaluated. Based on the results of the hydrolyzed protein, the hydrolyzed protein had a high protein content and degree of hydrolysis. This protein also had a high content of hydrophobic amino acids (31.78%) and aromatic amino acids (11.74%). The mechanical test results of the films showed that increasing the protein concentration led to a decrease in tensile strength and an increase in elongation at break of the polylactic acid films. According to the physical test results, increasing the protein concentration did not have a significant effect on moisture and solubility, but increased water vapor permeability and turbidity ( $p < 0.05$ ). The hydrolyzed tomato seed protein had high DPPH radical scavenging activities and increasing the concentration had a positive effect on these parameters ( $p < 0.05$ ). These films also had high antimicrobial activity against pathogenic bacteria, with higher antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* than *Escherichia coli*. The nanocomposite film containing 1.5% hydrolyzed protein had the highest antioxidant and antimicrobial activity ( $p < 0.05$ ). This study showed that hydrolyzed protein can improve the physical and mechanical properties of chitosan/aloe vera based films. Specifically, films containing 1.5% hydrolyzed protein had better properties such as higher antioxidant activity and antimicrobial activity.