



تولید فیلم مرکب کیتوزان و فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum latifolium* به همراه پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*)

خدیدجه جعفری ملک کلائی^۱، سارا جعفریان^{۲*}، سید روح الله جوادیان^۲، سیده خدیجه مهدوی^۳، سمیه بهرام^۲

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

۲- گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

۳- گروه منابع طبیعی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۰۵

کلمات کلیدی:

کیتوزان،

فوکوئیدان،

پپتید،

فیلم خوراکی،

خواص آنتی‌اکسیدانی،

خواص ضد میکروبی.

DOI: 10.48311/fsct.2025.83944.0.

* مسئول مکاتبات:

drsjafrican@yahoo.com

هدف این مطالعه بررسی ویژگی‌های فیلم خوراکی مرکب کیتوزان و فوکوئیدان همراه با پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی کاراس می‌باشد. در این راستا، پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس به وسیله آنزیم آلکالاز تولید و فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای *Sargassum latifolium* استخراج گردید. سپس چهار نوع فیلم خوراکی شامل کیتوزان و کیتوزان-فوکوئیدان با غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۰/۵، ۱ درصد) تهیه و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده دارای میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بالایی است. همچنین، بازده استخراج فوکوئیدان ۵/۸۹ درصد، کربوهیدرات کل ۵۹/۲ درصد، پروتئین ۹/۲۱ درصد، سولفات ۲۱/۷۸ درصد و اسید اورونیک ۸/۸۵ درصد بود. نتایج آزمون‌های مکانیکی نشان داد که افزایش غلظت پروتئین منجر به کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها شد. به علاوه، آزمون‌های فیزیکی نشان داد که افزایش غلظت پروتئین باعث افزایش نفوذپذیری بخار آب و رطوبت فیلم‌ها گردید ($p < 0/05$). پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس دارای فعالیت قابل توجهی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود و افزایش غلظت آن تأثیر مثبتی بر این پارامتر داشت ($p < 0/05$). همچنین، این فیلم‌ها خاصیت ضد میکروبی بالایی در برابر باکتری‌های پاتوژن داشتند و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *شریشیاکلی* بود. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فیلم‌های خوراکی مرکب کیتوزان-فوکوئیدان با افزودن پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌توانند به عنوان یک گزینه مناسب برای بهبود کیفیت و ماندگاری محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرند. این فیلم‌ها نه تنها خواص فیزیکی و مکانیکی بهتری دارند، بلکه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن‌ها نیز می‌تواند به افزایش ایمنی و کیفیت مواد غذایی کمک کند.

۱- مقدمه

چالش تولید کننده مواد غذایی، حفظ کیفیت محصولات در طول نگهداری است. فیلم‌ها و پوشش‌های زیست‌تخریب‌پذیر، معمولاً از پلیمرهای زیستی ساخته می‌شوند و می‌توانند ماندگاری غذاها را افزایش دهند [۱]. فیلم‌های خوراکی فعال با کنترل آزادسازی ترکیبات زیست‌فعال، عمر مفید محصولات غذایی را افزایش می‌دهند [۲]. جلبک‌های دریایی، به‌ویژه نوع قهوه‌ای *Sargassum latifolium* حاوی پلی‌ساکاریدهای ارزشمندی هستند که در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند [۳، ۴]. فوکوئیدان، یکی از مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای موجود در جلبک‌های قهوه‌ای، به عنوان یک ترکیب زیست‌فعال شناخته می‌شود [۵]. خواص بیولوژیکی فوکوئیدان، از جمله قابلیت تشکیل فیلم‌های آنتی‌میکروبی و زیست‌تخریب‌پذیری، آن را به گزینه‌ای مناسب برای کاربرد در صنایع غذایی و بهداشتی تبدیل کرده است [۶، ۷]. از آنجا که ترکیب جداگانه هر ماده در فیلم ممکن است دارای نقاط ضعفی باشد، ترکیب مواد مختلف می‌تواند به بهبود ویژگی‌های فیلم‌های خوراکی کمک کند [۵، ۶]. کیتوزان در شرایط بی‌هوازی به افزایش زمان نگهداری و کیفیت مواد غذایی کمک می‌کند و خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن با افزودن موادی مانند پروتئین‌های هیدرولیز شده تقویت می‌شود [۸]. همچنین، ساختار کیتوزان با گروه‌های عاملی مثبت، آن را به گزینه‌ای زیست‌تخریب‌پذیر و بهداشتی تبدیل کرده است [۹، ۱۰]. استفاده از پوشش‌های کیتوزان می‌تواند از قهوه‌ای شدن آنزیمی جلوگیری کند، آب را حفظ کند، طعم طبیعی را نگه دارد و کیفیت بافت و ثبات رنگ مواد غذایی را بهبود بخشد [۱۰]. ترکیب فوکوئیدان و کیتوزان می‌تواند به بهبود ویژگی‌های فیلم‌های خوراکی و افزایش کیفیت محصولات غذایی کمک کند [۷، ۱۰].

ماهی کاراس (*Carassius carassius*)، از خانواده کپور ماهیان است و به دلیل اندازه کوچک و طعم نامناسب، ارزش

تجاری کمی دارد. این ماهی در برخی کشورها به عنوان منبع پروتئینی شناخته می‌شود و در استخرهای پرورش ماهی گرم آبی، به دلیل رقابت غذایی با کپورها، به عنوان ماهی مزاحم تلقی می‌گردد. با توجه به قیمت پایین و تولید بالای این ماهی، فرآوری محصولات با ارزش افزوده از آن مورد توجه قرار گرفته است [۱۱]. تحقیقات گسترده‌ای در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین‌های هیدرولیز شده مانند سویا، گندم و شیر انجام شده است [۱۲، ۱۳]. هیدرولیز آنزیمی می‌تواند به بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال با وزن مولکولی پایین کمک کند که به راحتی جذب بدن می‌شوند و نقش‌های مهمی در سطوح سلولی ایفا می‌کنند [۱۴، ۱۵]. این پپتیدها به علت خواص آنتی‌اکسیدانی و توانایی زدودن رادیکال‌های آزاد اهمیت دارند [۱۲، ۱۳، ۱۶].

تا کنون تحقیقی درباره اثر پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس بر فیلم‌های مرکب کیتوزان- فوکوئیدان انجام نشده است. بنابراین، هدف این پژوهش بررسی ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی فیلم کامپوزیت حاوی کیتوزان و فوکوئیدان همراه با پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس است.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد اولیه

جلبک *Sargassum latifolium*، بومی مناطق دریایی از منطقه ریشر واقع در استان بوشهر تهیه شد. ماکرو جلبک‌ها تمیز و سپس چند مرحله با آب شیرین شستشو و در آون (ممرت مدل ۵۰۰ UFB، آلمان) در دمای ۳۸ درجه- سانتی‌گراد خشک شدند. سپس با آسیاب (بوش مدل TSM6A011W، آلمان) پودر و در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ماهی کاراس با وزن متوسط ۱۰۰ گرم بازار ماهی ساری، مازندران، ایران تهیه گردید. آنزیم آلکالاز (با فعالیت مشخص ۴/۲ واحد آنسون بر گرم و دانسیته ۱۸/۱ گرم بر میلی لیتر) یک اندوپروتئیناز گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* می‌باشد.

۲-۳- درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز براساس میزان α آمینو اسید در میزان پروتئین نمونه محاسبه شد [۱۵].

۲-۴- ترکیب اسید آمینه

به منظور ترکیب اسید آمینه پودر پروتئین هیدرولیز شده، نمونه پروتئینی ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد و با استفاده از اسید هیدروکلریک ۶ مولار کاملاً هیدرولیز شد. سپس اسیدهای آمینه موجود با افزودن فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) مشتق سازی شدند. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (ساخت آلمان) مجهز به ستون C18 و آشکارساز فلورسنت (RF-530) اندازه گیری گردید [۱۲].

۲-۵- استخراج فوکوئیدان و بررسی ویژگی های آن

۲۰ گرم پودر جلبک خشک شده دوبار در ۴۰۰ میلی لیتر اتانول خالص به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق جهت حذف ترکیبات ناخواسته تحت هم زدن ثابت قرار گرفت. سپس زیست توده جلبک با آب مقطر شست و شو داده شد و در آون تحت خلا با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد برای رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. به منظور استخراج فوکوئیدان به روش معمول استخراج، زیست توده جلبک دریایی با نسبت حلال، جلبک ۲۰ میلی لیتر/ گرم به مدت ۱۶۰ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد (هیتر استیر) تیمار شد. مخلوط حاصل در ظرف یخ سرد شده و توسط تیتراسیون با سدیم هیدروکسید ۲ مولار، pH آن تا ۷ افزایش یافت و خنثی گردید. سپس فاز رسوب، بوسیله فیلتر خلا جداسازی شد. سوپرناتانت با دو حجم اتانول خالص در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب جهت رسوب فوکوئیدان تیمار شد. رسوب حاصل توسط سانتریفیوژ (۷۰۰۰g) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جداسازی و جهت خالص سازی جمع آوری شد. فوکوئیدان جداسازی شده با اتانول ۷۰ درصد دوبار شست و شو داده شد و در

آنزیم از نمایندگی شرکت نووزایم دانمارک تهیه شد و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید اتانول بافر، تریس، هیدروکلریک اسید از شرکت مرک و معرف DPPH از شرکت سیگما بوده و تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس:

ماهی کاراس پس از پوست گیری، سر و دم زنی و جدا نمودن امعاء و احشاء با آب شسته شده، سه بار توسط چرخ گوشت (الکتروکار استیل مدل EC16، ایران) چرخ گردید (قطر منفذ ۵ میلی متر) و سپس در بسته های پلاستیکی زیپدار تا زمان آزمایش در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. گوشت چرخ شده منجمد ماهی کاراس به منظور انجمادزدایی در طول شب در یخچال گذاشته شد، سپس درون فلاسک ها توزین و به منظور غیرفعال سازی آنزیم های با منشاء داخلی درون حمام آب (ممرت مدل WNE45، آلمان) در ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. نمونه های حرارت دیده با بافر تریس-اسیدکلریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲ به حالت سوسپانسیون یکنواخت و با pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز (pH=۸/۵) در آمد. واکنش هیدرولیز در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد با غلظت آنزیم ۱ درصد انجام شد. تمامی واکنش ها در فلاسک های ۱۰۰ میلی لیتری در حمام آب شیکردار و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای مورد نظر انجام و در انتهای (۹۰ دقیقه) به منظور حصول اطمینان از غیر فعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسون در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ سرد گردید و در ادامه در سانتریفیوژ یخچالدار (مدل HB800، ایران) با دور ۸۰۰۰g در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع آوری سوپرناتانت قرار گرفت، پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری و در ادامه با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (Alfa-Christ، آلمان) بصورت پودر در آمد [۱۵].

نهایت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون تحت خلا خشک گردید [۱۷].

بازده استخراج توسط فرمول زیر محاسبه شد [۱۸].

$$100 \times \text{وزن خشک جلبک (گرم)} / \text{وزن خشک فوکوئیدان (گرم)} = \text{بازده (درصد)}$$

میزان سولفات فوکوئیدان پس از هیدرولیز آن در هیدروکلریک اسید ۰/۵ مولار در ۱۰۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت (۵ ساعت) بر اساس روش ذکر شده توسط Lee و همکاران (۲۰۱۲) و با استفاده از کلرید باریم (BaCl) و سولفات پتاسیم (K₂SO₄) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد [۱۹].

سنجش میزان پروتئین بر اساس روش لوری و با استفاده از کیت سنجش پروتئین انجام شد [۲۰].

اندازه‌گیری کربوهیدرات کل بر اساس روش ذکر شده توسط Gorji و همکاران (۲۰۲۲) و با روش آنتروژن و اندازه‌گیری میزان جذب در ۶۳۰ نانومتر صورت پذیرفت [۲۰].

میزان اورونیک اسید بر اساس روش ذکر شده توسط Filisetti-Cozzi و Carpita (۱۹۹۱) و با استفاده از گلوکورونیک اسید به عنوان استاندارد انجام خواهد شد [۲۱].

۲-۶- تهیه فیلم کیتوزان-فوکوئیدان

برای تهیه فیلم مرکب، کیتوزان (با غلظت ۲ درصد) و فوکوئیدان (با غلظت ۱ درصد) به همراه غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده (۰/۵ و ۱ درصد) به مخلوط اضافه شد. این ترکیبات در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۷۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۴۵ دقیقه با همزن به‌طور کامل حل شدند. از روش کستینگ^۱ برای به دست آوردن فیلم‌ها با ریختن ۵۰ میلی‌لیتر از هر محلول تعیین شده در ظرف ۱۲ سانتی‌متری 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 [۸].

۲-۷- اندازه‌گیری خواص فیزیکی فیلم‌ها

۲-۷-۱- اندازه‌گیری ضخامت فیلم‌ها

برای اندازه‌گیری ضخامت از میکرومتر با دقت ۰/۰۱ میلی‌متر استفاده شد. میزان ضخامت در ۵ نقطه از فیلم اندازه‌گیری و میزان میانگین آن گزارش شد [۲۲].

۲-۷-۲- 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 آون خشک گردید. نمونه همراه با پلیت پس از این مدت خارج شد و پس از سرد شدن در دسیکاتور مجدداً توزین گردید (W2). محتوای رطوبت فیلم‌ها بر پایه وزن مرطوب از رابطه ۱ محاسبه گردید [۲۳].

رابطه ۱

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

۲-۷-۳- نفوذپذیری در برابر بخار آب

به‌منظور سنجش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها نسبت به بخار آب (ASTM E 96-02) ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون سلول-های اندازه‌گیری نفوذپذیری ریخته شد و سپس سلول‌های شیشه‌ای که سطح آنها توسط فیلم و به کمک گریس درزبندی شده، درون دسیکاتور حاوی سیلیکاژل قرار گرفتند. آب در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد رطوبت ۱۰۰ درصد ایجاد میکند. اختلاف رطوبت در دو سمت فیلم در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد اختلاف فشار بخاری معادل $10.3 \times 337/2$ پاسکال ایجاد می‌نماید. سنجش تغییرات وزن سلول‌ها در طی زمان با استفاده از یک ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ 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 [۲۳].

رابطه ۲

سطح سلول (متر) / شیب خط (گرم/ثانیه) = نرخ انتقال بخار آب (گرم^{-۱} ثانیه^{-۲} متر)

۸-۲- خواص مکانیکی فیلم‌ها

آزمون‌های مکانیکی فیلم‌ها بر اساس روش اصلاح شده ASTM D0882-02 صورت می‌گیرد. فیلم‌ها در قطعات ۷۶۱ سانتی‌متر بریده و تحت شرایط رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد مشروط شدند. ضخامت آنها در ۵ نقطه اندازه‌گیری و ضخامت متوسط آنها تعیین گردید. ویژگی‌های مکانیکی فیلم (مقاومت به کشش (مگاپاسکال) با استفاده از دستگاه اینستران اندازه‌گیری می‌شود. در دستگاه اینستران فاصله بین دو فک ۵۰ میلی‌متر، سرعت حرکت فک بالایی ۵۰ میلی‌متر بر دقیقه و فک پایینی ثابت بود [۲۳].

۹-۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیلم با استفاده از روش بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری شد [۲۴]. به این منظور، ابتدا ۲۵ میلی‌گرم از فیلم در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به آرامی مخلوط شد. سپس، ۸/۲ میلی‌لیتر از این محلول به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۲ 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 مدل T80 ساخت کشور انگلستان 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 رابطه ۳ محاسبه گردید.

رابطه ۳:

$100 \times [(\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان جذب کنترل}) - 1]$ = درصد پاک‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH

۱۰-۲- تعیین فعالیت ضد میکروبی فیلم‌ها

کشت‌های باکتریایی / استافیلوکوکوس / اورئوس (PTCC 1189) و / شریشیا 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 گرمخانه‌گذاری، 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 گرمخانه‌گذاری شدند. ۳ تا ۵ کلنی جدا شده و همگن با استفاده از یک سواب استریل به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر 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 نیم‌هک فارلند که معادل حدود 10^8 کلنی در هر میلی‌لیتر 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 میلی‌متر 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 میلی‌متر اندازه‌گیری و گزارش شد. این روش برای بررسی فعالیت ضد میکروبی فیلم‌های

خوراکی با استفاده از روش انتشار در آگار به کار گرفته شد [۲۵].

۲-۱۱- 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 ۵ درصد انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه هیدرولیز

کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز در فرآیند هیدرولیز اهمیت زیادی دارد، زیرا خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله اسیدهای آمینه آزاد، انحلال‌پذیری و خواص ضداکسیدانی، به درجه هیدرولیز وابسته است. نتایج نشان داد (جدول ۱) که زمان هیدرولیز تأثیر معناداری بر درجه هیدرولیز دارد، به طوری که بیشترین درجه هیدرولیز در ۹۰ دقیقه و کمترین آن در ۳۰ دقیقه ثبت شده است. همچنین، میزان هیدرولیز تا زمان ۶۰ دقیقه شدت افزایشی بالاتری داشت ($P < 0.05$). در مراحل اولیه هیدرولیز، پیوندهای شیمیایی پروتئین‌ها در دسترس‌تر هستند و آب به راحتی می‌تواند این پیوندها را بشکند. علاوه بر این، افزایش غلظت اسیدهای آمینه و کاهش وزن مولکولی پپتیدها در مراحل اولیه، انحلال‌پذیری را بهبود می‌بخشد و فعالیت آنزیم‌ها نیز در این مرحله به اوج خود می‌رسد. این عوامل موجب می‌شوند که شدت هیدرولیز در اوایل فرآیند بیشتر باشد. نتایج مشابهی درباره درجه هیدرولیز

پروتئین هیدرولیز شده ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری گزارش شده است. بر اساس مطالعات، با افزایش زمان، درجه هیدرولیز نیز افزایش می‌یابد و نرخ افزایش در مراحل اولیه فرآیند هیدرولیز بیشتر است [۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۵، ۱۶، ۲۶].

۳-۲- میزان پروتئین

مقادیر پروتئین در ماهی کاراس و پودر پروتئین هیدرولیز شده آن به ترتیب 17.01 ± 0.95 درصد و در محدوده $52/55 - 83/23$ درصد بوده است (جدول ۱). نتایج نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس نسبت به ماهی اولیه، مقدار قابل توجهی بیشتری از پروتئین را شامل می‌شود. این موضوع در تحقیقات قبلی نیز تأیید شده است [۱۵، ۱۶، ۲۶]. این افزایش در میزان پروتئین به دلیل حذف رطوبت از نمونه‌ها و نیز جدا شدن ترکیبات غیرپروتئینی در فرآیند هیدرولیز و سانتریفیوژ است. در واقع، فرآیند هیدرولیز باعث می‌شود که پروتئین‌ها به فرم‌های قابل جذب‌تری تبدیل شوند که غنی‌تر از پروتئین‌های خام هستند و این ویژگی‌ها می‌تواند کاربردهای گسترده‌تری در صنایع غذایی و تغذیه‌ای داشته باشد. Mehregan Nikoo و همکاران (۲۰۱۴) مقادیر پروتئین اولیه ماهی کاراس را $16/43$ درصد و پس از فرآیند هیدرولیز $79/13$ درصد گزارش کرده‌اند که این نتایج تقریباً با مطالعه حاضر همخوانی دارد [۱۱]. این شباهت نشان‌دهنده پایداری روند هیدرولیز در افزایش میزان پروتئین قابل استفاده در ماهی کاراس است و تأکیدی بر کارآمدی این فرآیند در ارتقاء ارزش تغذیه‌ای این منبع پروتئینی می‌باشد.

Table 1: Degree of hydrolysis and protein content of crucian carp protein hydrolysates at different hydrolysis

Hydrolysis time (min)	Degree of hydrolysis (%)	Protein content (%)
30	13.99 ± 0.78^c	52.55 ± 0.99^c
60	19.95 ± 0.88^b	71.39 ± 1.16^b
90	28.32 ± 1.11^a	83.23 ± 2.29^a

^a Values represent means $\pm$ SE (n = 3).

^b Values in same columns with different lower letter are significantly different at $P < 0.05$.

۳-۳- ترکیب اسید آمینه

هیدرولیزات پروتئین ماهی به عنوان منابع ارزشمندی از پپتیدهای قابل جذب و اسیدهای آمینه به طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته‌اند، زیرا این محصولات دارای خواص متعددی از جمله اثرات ضد اکسیدانی خواص ضد التهابی، اثرات ضد سرطانی، و خواص ضد باکتریایی هستند [۱۶، ۲۷]. بر اساس مطالعات، اسیدهای آمینه ضروری برای رشد و توسعه بدن انسان از اهمیت بالایی برخوردارند. در این تحقیق (جدول ۲)، تمامی اسیدهای آمینه ضروری که توسط WHO/FAO (۱۹۹۰) برای مصرف روزانه بزرگسالان توصیه شده، در حد مجاز موجود بودند. گلوتامیک اسید، که به عنوان یکی از اسیدهای آمینه کلیدی در ماهی شناخته می‌شود، نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی در بدن ایفا می‌کند [۲۸]. در این مطالعه، بالاترین میزان اسید آمینه غیرضروری مربوط به گلوتامیک اسید با درصد ۹/۷۸ درصد بود. همچنین، لیزین به عنوان یک اسید آمینه ضروری مهم با مقدار ۱۳/۰۵ درصد در این ماهی شناسایی شد و بیشترین میزان اسید آمینه

ضروری را به خود اختصاص داد، که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ماهی به عنوان منبع پروتئین با کیفیت می‌باشد [۲۷]. مجموع اسیدهای آمینه آبریز در پروتئین‌های هیدرولیز شده به ۱۱/۲۵ درصد رسید. وجود این اسیدهای آمینه در سطوح مطلوب، نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای بالای آن‌ها است. اسیدهای آمینه آبریز، مانند لوسین، ایزولوسین، فنیل آلانین و والین، به دلیل توانایی‌شان در حفظ ساختار پروتئینی و ایجاد خواص فیزیکی و شیمیایی مناسب، نقش حیاتی در عملکرد پروتئین‌ها دارند. این اسیدهای آمینه همچنین به عنوان پیش‌سازهایی برای سنتز ترکیبات زیست‌فعال عمل می‌کنند و می‌توانند در بهبود فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، خواص ضد التهابی و تنظیم قند و فشار خون مؤثر باشند [۲۹]. طبق تحقیق Luo و همکاران (۲۰۲۲)، پروتئین ماهی کاراس به دلیل ترکیب مناسب اسیدهای آمینه، پتانسیل بالایی برای استفاده در صنعت غذا و بهبود سلامت تغذیه‌ای دارد [۲۷]. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که ماهی کاراس به عنوان یک گزینه مناسب برای تأمین نیازهای پروتئینی محسوب شود و می‌تواند در برنامه‌های تغذیه‌ای مختلف مورد استفاده قرار گیرد.

Table 2: The amino acid composition crucian carp protein hydrolysates (g 100 g⁻¹) (30 min)

Amino acid(g 100 g ⁻¹)	Alcalase	FAO/ WHO, 1990
Histidine ^a	4.77	
Isoleucine ^a	5.88	2.8
Leucine ^a	11.21	6.6
Lysine ^a	13.05	5.8
Methionine ^a	3.24	-
Phenyl alanine ^a	6.44	6.3
Tyrosine	4.24	1.1
Threonine ^a	5.28	3.4
Arginine	8.58	-

Valine ^a	4.55	3.5
Aspartic acid	7.98	-
Glycine	3.87	-
Proline	3.48	-
Serine	3.58	-
Alanine	4.21	-
Glutamic acid	9.78	-
Total amino acid	98.14	-
HAA ^b	41.25	-

a Essential amino acids

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

۳-۵- بررسی خاصیت فیزیکی فیلم‌ها

با توجه به نتایج بیشترین (نمودار ۱) مقادیر رطوبت در فیلم کیتوزان مشاهده شد. افزودن فوکوئیدان سبب کاهش میزان رطوبت فیلم شد ($P < 0.05$). کاهش رطوبت فیلم کیتوزان پس از افزودن فوکوئیدان عمده‌تاً به ایجاد ساختار شبکه‌ای محکم‌تر و خاصیت هیدروفوبیک فوکوئیدان مربوط می‌شود. این ویژگی‌ها جذب آب را کاهش داده و تماس آب با سطح فیلم را محدود می‌کنند. نتایج مشابهی توسط Gomaa و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شد، آنها نیز اعلام نمودند افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان- آلژینات پس از کاهش مقادیر رطوبت فیلم می‌شود [۳۱]. همچنین Pouralkhas و همکاران (۲۰۲۳) نیز اعلام نمودند افزودن فوکوئیدان به فیلم آلژینات باعث کاهش رطوبت فیلم آلژینات می‌شود [۷]. اما افزودن پروتئین هیدرولیز شده سبب افزایش معنی داری بر مقادیر رطوبت شد. پروتئین‌های هیدرولیز شده به دلیل خواص آبدوست خود تأثیر قابل‌توجهی بر رطوبت محصولات غذایی دارند. این پروتئین‌ها قابلیت جذب و نگهداری آب بیشتری نسبت به پروتئین‌های غیر هیدرولیز شده دارند و می‌توانند نوسانات رطوبتی را تعدیل کنند. افزودن این ترکیبات به محصولات غذایی بهبود بافت، افزایش طعم و حفظ کیفیت و ماندگاری را به همراه دارد [۱۶].

۳-۴- بررسی آزمون‌های فوکوئیدان

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های فوکوئیدان استخراجی از جلبک قهوه‌ای *Sargassum latifolium* در این مطالعه به شرح زیر است: بازده استخراج برابر با $5/89 \pm 0/35$ درصد، کربوهیدرات کل برابر با $59/23 \pm 31/18$ درصد، پروتئین برابر با $9/21 \pm 0/58$ درصد، سولفات برابر با $21/78 \pm 2/18$ درصد و اورونیک اسید $8/85 \pm 0/18$ درصد، در مطالعه Gorgij و همکاران (۲۰۲۲)، بازده استخراج فوکوئیدان از جلبک قهوه‌ای برابر با $7/23$ درصد، کربوهیدرات کل برابر با $36/51$ درصد، پروتئین برابر با $5/64$ درصد، سولفات برابر با $11/57$ درصد و اورونیک اسید $9/22$ درصد، گزارش شده است [۲۰]. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر، Lee و همکاران (۲۰۱۲) بازده استخراج و مقادیر کربوهیدرات کل، سولفات، اسید اورونیک و پروتئین فوکوئیدان استخراج‌شده از جلبک قهوه‌ای *Ecklonia Cava* را به ترتیب $1/8$ ، $51/8$ ، $20/1$ ، $11/3$ و $8/7$ درصد اعلام کردند [۱۹]. به‌طور کلی، فوکوئیدان‌های جداسازی‌شده از جلبک‌ها معمولاً ترکیبات پیچیده‌ای هستند و درصد اجزای آن‌ها بسته به گونه، روش استخراج و شرایط آزمایش متفاوت است [۲۰، ۳۰].

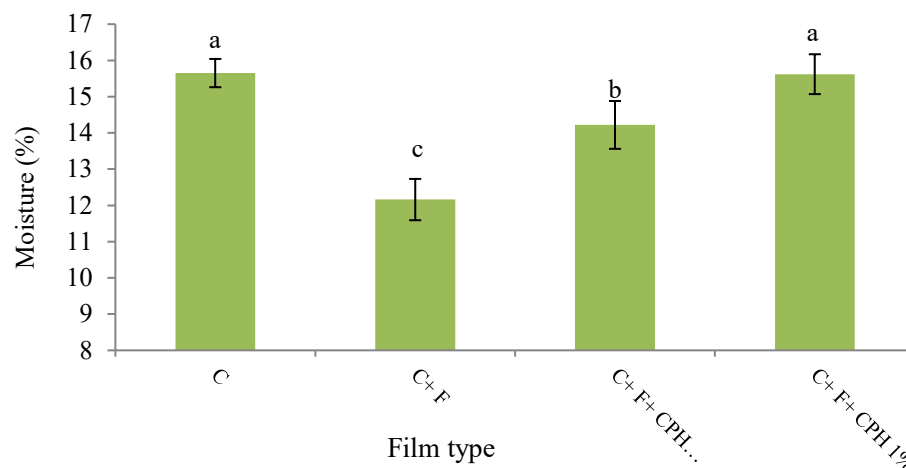


Fig 1. Moisture content of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد ($P < 0.05$). نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است؛ به عنوان مثال، Abugoch و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که با افزایش نسبت پروتئین کینوا به کیتوزان، ضخامت فیلم کیتوزان نیز افزایش می‌یابد [۳۱]. همچنین، de Oliveira و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی‌های خود بر روی پروتئین هیدرولیز شده پنبه‌دانه در فیلم آلزینات نتایج مشابهی را مشاهده کردند [۳۲]. به طور کلی، مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تفاوت در ضخامت فیلم‌ها به روش تهیه و مقدار افزودنی بستگی دارد.

نتایج نشان می‌دهد (نمودار ۲) که کمترین مقادیر ضخامت در فیلم‌های کیتوزان و فوکوئیدان مشاهده شده است ($P < 0.05$). به واقع، افزودن فوکوئیدان تأثیر معنی‌داری بر مقادیر ضخامت فیلم نداشت ($P > 0.05$)، که نشان‌دهنده سازگاری مناسب بین اجزای فیلم است. این نتایج با یافته‌های Samani و همکاران (۲۰۲۳) همخوانی دارد که اعلام کردند افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان-آگار تأثیر معنی‌داری بر ضخامت فیلم نداشته است [۱۰]. از طرف دیگر، با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم، ضخامت افزایش یافت و بیشترین ضخامت در فیلم‌های کیتوزان + فوکوئیدان +

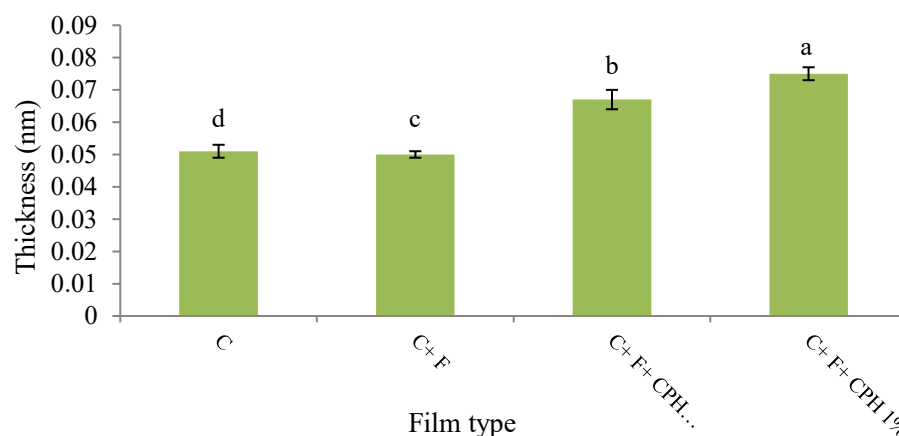


Fig 2. Thickness of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

پیوندی است که به افزایش تعاملات بین پلیمرهای کیتوزان و فوکوئیدان و ایجاد یک مانع در برابر بخار آب کمک می‌کند. به طور کلی، افزودن فوکوئیدان و عامل پیوندی به

با توجه به نتایج (نمودار ۳)، افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان منجر به کاهش مقادیر نفوذپذیری فیلم‌ها شد ($P < 0.05$). این کاهش نفوذپذیری ناشی از افزودن عامل

قرار می‌گیرد و این امر به افزایش نفوذپذیری بخار آب (WVP) فیلم منجر می‌شود. همچنین، افزایش ضخامت لایه‌های پروتئین هیدرولیز شده نیز تأثیر قابل‌توجهی بر مقادیر WVP دارد [۳۲، ۳۳]. نتایج مشابهی توسط de Oliveira و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی‌های خود بر روی پروتئین هیدرولیز شده پنبه‌دانه در فیلم آلزینات و Ghasemi و همکاران (۲۰۲۱) در فیلم کربوکسی متیل سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده اسکلت کپور نقره‌ای مشاهده شده است [۱۰]. این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت پروتئین‌های هیدرولیز شده در بهبود ویژگی‌های فیلم‌های خوراکی و تأثیر آن‌ها بر عملکرد بسته‌بندی است.

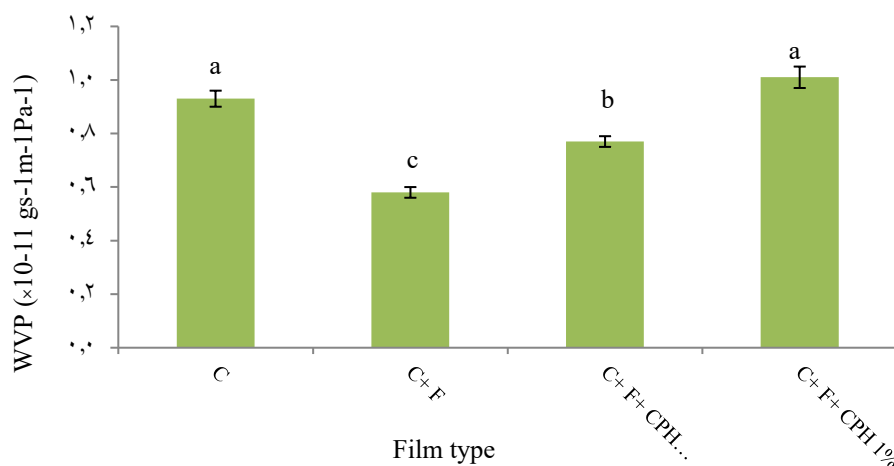


Fig 3. WVP of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

اتصالات داخلی بین زنجیره‌های پلیمری منجر گردد [۳۵]. این تغییرات باعث افزایش استحکام و الاستیسیته فیلم‌ها می‌شود و آن‌ها را برای کاربردهای مختلف، از جمله بسته‌بندی مواد غذایی و مناسب‌تر می‌سازد. نتایج مشابهی توسط Samani و همکاران (۲۰۲۳) و Sezer و همکاران (۲۰۰۷) در ارتباط با افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان مشاهده شده است [۱۰، ۳۶]. افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم‌ها منجر به کاهش استحکام کششی فیلم شد ($P < 0.05$). این کاهش در استحکام کششی برای فیلم‌های کیتوزان- فوکوئیدان حاوی پروتئین هیدرولیز شده نشان‌دهنده‌ی شکنندگی این فیلم‌ها است. به عبارت دیگر، این فیلم‌ها نسبت به فیلم‌های بدون پروتئین از نظر مکانیکی

ایجاد پیوندهای هیدروژنی مرتبط است که احتمالاً نفوذپذیری بخار آب در فیلم‌ها را کاهش می‌دهد [۱۰]. این نتایج با یافته‌های Samani و همکاران (۲۰۲۳) همخوانی دارد که اعلام کردند افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان-آگار سبب کاهش WVP فیلم شد [۱۰]. با افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم میزان نفوذپذیری افزایش یافت به طوری که بیشترین میزان WVP در فیلم‌های کیتوزان+ فوکوئیدان+ پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده شد ($P < 0.05$). علت این امر به اثر پلاستی‌سایزری پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی کم مربوط می‌شود. وجود این پروتئین‌ها منجر به افزایش گروه‌های آبدوست در ساختار فیلم می‌شود که در نتیجه، تعداد بیشتری مولکول آب در فیلم

۶-۳- بررسی خاصیت مکانیکی فیلم‌ها

مقاومت کششی یکی از پارامترهای کلیدی است که در حین تهیه فیلم‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد و نشان‌دهنده‌ی توانایی آن‌ها در مقاومت در برابر پارگی هنگام قرارگیری در معرض نیروهای خارجی است. بر اساس نتایج (نمودار ۴)، افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان خواص مکانیکی آن را بهبود بخشید، این امر به دلیل ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین فوکوئیدان و کیتوزان است [۳۴]، که منجر به تغییر در ساختار فیلم و افزایش مقاومت کششی آن نسبت به فیلم‌های تنها از کیتوزان می‌شود. به طور کلی، استفاده از عامل پیوندی می‌تواند خواص مکانیکی مانند میزان ورم و مقاومت کششی را بهبود بخشد و به ایجاد پیوندهای شیمیایی جدید و افزایش

منجر به کاهش چگالی تعامل‌های بین‌مولکولی و افزایش فضای آزاد بین زنجیره‌های فیلم گردد. در نتیجه، مقاومت کششی فیلم‌های کیتوزان- فوکوئیدان حاوی پروتئین کاهش می‌یابد [۳۶].

ضعیف‌تر و کمتر قابل تغییر شکل هستند. احتمالاً این پتیدها به راحتی در ساختار پروتئینی گنجانده شده و پیوندهای هیدروژنی با زنجیره‌های فیلم مرکب برقرار می‌کنند. این تعاملات ممکن است برای پیوند بین زنجیره‌ها مضر باشد و

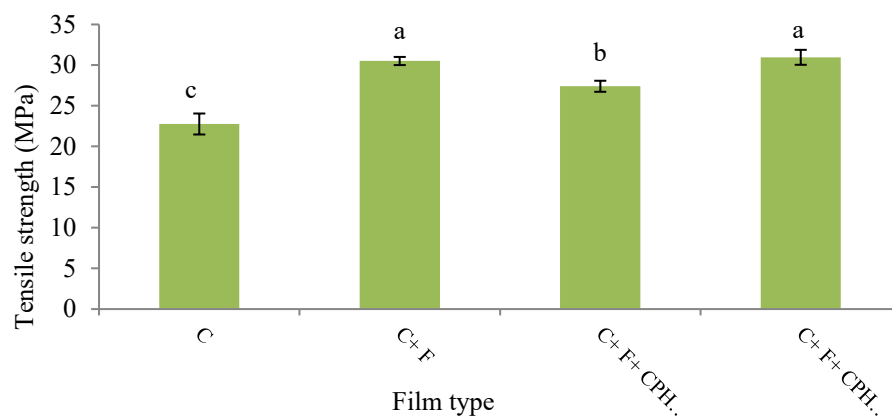


Fig 4. Tensile strength of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

افزایش غلظت این پروتئین‌ها تأثیر مثبتی بر مهار رادیکال‌های آزاد DPPH دارد (نمودار ۵). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده به دلایل متعددی نظیر توانایی آن‌ها در حذف رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات، اکسیژن‌زدایی و اهدای هیدروژن، و همچنین جلوگیری از نفوذ آغازگرهای اکسیداسیون چربی از طریق تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن بستگی دارد. بر اساس مطالعه Pirveisi و همکاران (۲۰۲۳)، فیلم نانو سلولز حاوی پروتئین هیدرولیز شده دانه کاج، توانایی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را دارد که با افزایش غلظت پروتئین، این توانایی نیز افزایش می‌یابد [۳۷].

۷-۳- بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم‌ها

بر اساس نتایج، افزودن فوکوئیدان به فیلم کیتوزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی فیلم را افزایش داد (نمودار ۵). این افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به توانایی فوکوئیدان در اهدای اتم هیدروژن نسبت داده می‌شود که ناشی از وجود گروه‌های سولفات و هیدروکسیل در ساختار آن است. این گروه‌ها می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند و همچنین با ایجاد پیوندهای هیدروژنی و شبکه‌های سه‌بعدی، پایداری آنتی‌اکسیدانی فیلم را تقویت کنند [۳۷]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم‌ها، خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را بهبود بخشید ($P < 0.05$).

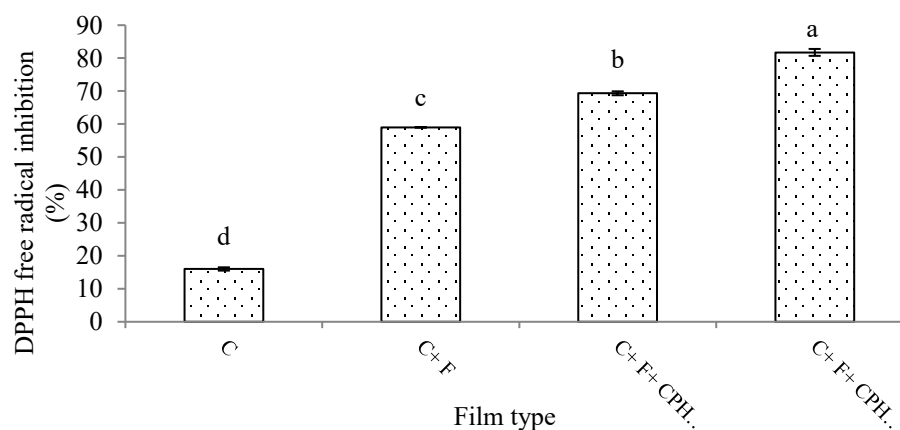


Fig 5. Antioxidant activity of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

۳-۸- بررسی خاصیت ضد میکروبی فیلم‌ها

بر اساس نتایج (جدول ۳)، فیلم کیتوزان دارای فعالیت ضد میکروبی مؤثری در برابر هر دو باکتری مورد آزمون بود. دو تئوری اصلی برای توضیح مکانیزم اثر ضد میکروبی کیتوزان وجود دارد. اول، کیتوزان به واسطه خاصیت پلی کاتیونی خود می‌تواند فلزات و عناصر ضروری را چلاته کرده و آن‌ها را از دسترس باکتری‌ها خارج کند. این عمل باعث کاهش توانایی باکتری‌ها در استفاده از این عناصر حیاتی می‌شود. دوم، کیتوزان از طریق تشکیل پیوند با آنیون‌های دیواره سلولی باکتری‌ها، به تخریب دیواره سلولی آن‌ها کمک می‌کند. این دو مکانیزم به کیتوزان این قابلیت را می‌دهند که به عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد. [۳۹]. با افزودن فوکوئیدان خاصیت ضد میکروبی کیتوزان افزایش یافت ($P < 0.05$). فعالیت ضد میکروبی فوکوئیدان به ترکیبات مختلفی از جمله آمینواسیدها، ترپنوئیدها، فلوروئتانها و ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود. با توجه به ساختار زنجیره‌ای خود،

فوکوئیدان می‌تواند به دیواره باکتری‌ها نفوذ کند یا بر روی غشاء آن‌ها ژل تشکیل دهد، که این ویژگی‌ها به جلوگیری از تبادلات غذایی و ایجاد اثرات بازدارنده بر روی پاتوژن‌های باکتریایی کمک می‌کند. با توجه به افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های معمول، جستجو برای ترکیبات جدید ضد میکروبی اهمیت زیادی دارد و فوکوئیدان به عنوان یکی از منابع بالقوه داروهای ضد میکروبی مورد توجه قرار گرفته است [۴۰، ۴۱، ۴۳]. افزودن پروتئین هیدرولیز شده به فیلم‌ها منجر به افزایش فعالیت ضد میکروبی آن‌ها شد ($P < 0.05$). به‌ویژه، بالاترین میزان خاصیت ضد میکروبی علیه هر دو باکتری در فیلم ترکیبی کیتوزان، فوکوئیدان و پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد مشاهده گردید. پپتیدهای ضد میکروبی با عملکرد نفوذپذیری غشاء قادرند به داخل غشاء باکتری‌ها نفوذ کرده و در نتیجه آن را مختل کنند. این تغییرات باعث عدم تعادل در محتویات سلولی می‌شود و فرآیندهای همانندسازی، رونویسی و ترجمه توالی DNA را با اتصال به اهداف خاص درون سلولی مختل می‌کند [۳۲، ۳۹، ۴۲].

Table 3: Antimicrobial activity of composite film along with crucian carp protein hydrolysates

Film Microorganism	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)
C	6.65± 0.25 ^d	5.22± 0.33 ^d
C+ F	15.58± 0.45 ^c	13.58± 0.75 ^c
C+ F+ CPH 0.5%	18.35± 0.69 ^b	16.28± 0.95 ^b
C+ F+ CPH 1%	21.44± 1.20 ^a	18.18± 0.75 ^a

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

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

افزایش غلظت پروتئین باعث کاهش مقاومت کششی فیلم‌ها می‌شود. همچنین، نتایج آزمون‌های فیزیکی نشان داد که پروتئین باعث افزایش رطوبت، نفوذپذیری بخار آب و کدورت فیلم‌ها شد. پروتئین هیدرولیز شده همچنین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی بود در مجموع،

۴- نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس به فیلم مرکب کیتوزان-فوکوئیدان می‌تواند خواص فیلم را بهبود بخشد. نتایج آزمون‌های مکانیکی نشان داد که

این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده ادرصد ماهی کاراس، می‌تواند به عنوان یک افزودنی مناسب در فیلم مرکب کیتوزان-فوکوئیدان مورد استفاده قرار گیرد.

۵-منابع

- [1] Esmaeili, M., Ariaii, P., Nasiraie, L.R., et al. (2021). Comparison of coating and nano-coating of chitosan-Lepidium sativum seed gum composites on quality and shelf life of beef. *Food Measure*, 15, 341–352.
- [2] Khanjani, M., Ariaii, P., Najafian, L., et al. (2023). Investigating the effect of polylactic acid-nanocellulose composite film along with *Lactobacillus casei* on the quality and shelf life of beluga sturgeon (*Huso huso*) fillet. *Food Measure*, 17, 4161–4174.
- [3] Chen, S., Sathuvan, M., Zhang, X., et al. (2021). Characterization of polysaccharides from different species of brown seaweed using saccharide mapping and chromatographic analysis. *BMC Chemistry*, 15, 1.
- [4] Meillisa, V., Woo, H.C., & Chun, B.C. (2015). Production of monosaccharides and bio-active compounds derived from marine polysaccharides using subcritical water hydrolysis. *Food Chemistry*, 171, 70–77.
- [5] Fawzy, M. A., Gomaa, M., Hifney, A. F., & Abdel-Gawad, K. M. (2017). Optimization of alginate alkaline extraction technology from *Sargassum latifolium* and its potential antioxidant and emulsifying properties. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1903–1912.
- [6] Xu, B., & Wu, S. H. (2021). Preservation of mango fruit quality using fucoidan coatings. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 143, 111150.
- [7] Pouralkhas, M., Kordjazi, M., Ojagh, S. M., & Farsani, O. A. (2023). Physicochemical and functional characterization of gelatin edible film incorporated with fucoidan isolated from *Sargassum tenerrimum*. *Food Science & Nutrition*, 11, 4124–4135.
- [8] 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.
- [9] Valipour, F., Ariaii, P., Khademi, D., & N. M. (2017). Effect of chitosan edible coating enriched with eucalyptus essential oil and α -tocopherol on silver carp fillets quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, 37(1), e12295.
- [10] Samani, M. A., Babaei, S., Naseri, M., Majdinasab, M., & Nafchi, A. M. (2023). Development and characterization of a novel biodegradable and antioxidant film based on marine seaweed sulfated polysaccharide. *Food Science & Nutrition*, 11, 3767–3779.
- [11] Mehregan Nikoo, A., Sadeghimahoonak, A., Ghorbani, M., Taheri, A., Aalami, M., & Kamali, F. (2014). Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius*). *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2(4), 351-364.
- [12] 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.
- [13] Shahosseini, S. R., Javadian, S. R., & Safari, R. (2023). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 15(1), 143-155.
- [14] Bahram, S., Khezri, M., & Javadian, S. R. (2020). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of hydrolyzed protein of *Saurida tumbil*. *Experimental Animal Biology*, 9(2), 23-35.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Torabi, P., Hamdami, N., & Keramat, J. (2021). Microwave-assisted extraction of fucoidan from brown seaweeds of *Nizimuddinina zanardini* and assessment of the chemical and antioxidant properties of the extracted compound. *Iranian Journal of Nutritional Sciences and Food Technology*, 16(1), 61-74.
- [18] Bahramzadeh, S., Tabarsa, M., You, S., Li, C., & Bitá, S. (2019). Purification, structural analysis and mechanism of murine macrophage cell activation by sulfated polysaccharides from

- Cystoseira indica*. Carbohydrate Polymers, 205, 261-270.
- [19] Lee, S. H., Ko, C. I., Ahn, G., You, S., Kim, J. S., Heu, M. S., Kim, J., Jee, Y., & Jeon, Y. J. (2012). Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. Carbohydrate Polymers, 89, 599–606.
- [20] Gorgij, S., Sharifian, S., & Loghamin, M. (2022). Antioxidant properties of fucoidan extracted from brown alga *Sargassum* (*Sargassum tenerrimum*) and its ability to inhibit vannamei shrimp polyphenol oxidase enzyme. Aquatic Physiology and Biotechnology, 10(2), 103-119.
- [21] Filisetti-Cozzi T.M., & Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. Analytical Biochemistry, 197: 157–162.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. (2012). A study on the properties of *Alosa caspia* by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. World Applied Sciences Journal 18 (7): 950-956.
- [27] Luo, Q., Zha, G., Lin, L., Huang, Y., & Zou, X. (2022). Comparison of physicochemical properties of different tissues from China climbing perch *Anabas testudineus* and crucian carp *Carassius auratus*. Food Science & Nutrition, 10, 936-944.
- [28] FAO/WHO. (1990). Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.
- [29] Gopal, T. K. S. (2020). Foods from the ocean for nutrition, health, and wellness. In Nutritional and Health Aspects of Food in South Asian Countries (pp. 113–122).
- [30] Yang, C., Chung, D., Shin, I. S., Lee, H. Y., Kim, J. C., & Lee, Y. J. (2008). Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. International Journal of Biological Macromolecules, 43, 433–437.
- [31] Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2010). Characterization of quinoa protein chitosan blend edible films. Food Hydrocolloids, 12, 1-18.
- [32] de Oliveira Filho, Rodrigues, J. M., Valadares, A. C. F., de Almeida, ... Dyszy. (2019). Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. Food Hydrocolloids, 92, 267–275.
- [33] Ghasemi, Zh., 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.
- [34] Sinaga, M. Z. E., Gea, S., Sihombing, Y. A., Zaidar, E., Bulan, R., Panindia, N., & Azhari, H. (2020). The preparation of agar-chitosan film from *Gracilaria*. In Proceedings of the International Conference of Science, Technology, Engineering, Environmental and Ramification Researches 1, 1047–1051.
- [35] Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2021). Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking on the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. Polymer Bulletin, 78(2), 981–1000.
- [36] Sezer, A. D., Hatipoğlu, F., Cevher, E., Oğurtan, Z., Baş, A. L., & Akbuğa, J. (2007). Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. AAPS PharmSciTech, 8(2), Article 39.
- [37] Kchaou, H., Jridi, M., Benbettaieb, N., Debeaufort, F., & Nasri, M. (2020). Bioactive films based on cuttlefish (*Sepia officinalis*) skin gelatin incorporated with cuttlefish protein hydrolysates: physicochemical characterization and antioxidant properties. Food Packaging and Shelf Life, 24, 100477.
- [38] Sahragard, K., & Tabarsa, M. (2021). Isolation, purification, anti-diabetic and antioxidant properties of fucoidan from brown seaweed *Sargassum ilicifolium*. Journal of Fisheries, 74(2), 223-234.
- [39] Pirveisi, N., Ariaei, P., Esmaceli, M., et al. (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 Measure, 17, 3323–3337.
- [40] Ghafari, E., Ariaei, P., Bagheri, R., et al. (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 Measure*, 18, 1543–1558.
- [41] Gharekhan Taghar Tapeh, R., Kordjazi, M., Ahmad Nasrollahi, S., Shabanpour, B., & Adeli, A. (2020). Investigation of antioxidant properties and antibacterial activity of alginate and fucoidan extracted from *Sargassum boveanum* algae collected from the Persian Gulf coast. *Aquaculture Sciences*, 7(2), 64-76.
- [42] 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.
- [43] Shah Hosseini, S.R. (2023). Evaluation of Physical, Mechanical and Antimicrobial Properties of Pullulan Films Enriched with Free and Encapsulated *Tragopogon graminifolius* DC. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 15 (3), 57-76.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Production of Chitosan and Fucoidan Extracted from Brown Seaweed *Sargassum latifolium* Composite Films with Hydrolyzed Fish Protein from Carassius (*Carassius carassius*)

Khadijeh Jafari Malekkolaei¹, Sara Jafarian^{1*}, Seyed Rohollah Javadian², Seyedeh Khadijeh Mahdavi³, Somayeh Bahram²

1-Department of Food Science and Technology, No.C., Islamic Azad University, Noor, Iran.

2-Department of Fisheries, Qas.C., Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

3-Department of Natural Resource, No.C., Islamic Azad University, Noor, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/12/11

Accepted:2025/08/27

Keywords:

Chitosan,

Fucoidan,

Peptides,

Edible Film,

Antioxidant Properties,

Antimicrobial Properties.

DOI: 10.48311/fsct.2025.83944.0.

*Corresponding Author E-

drsJafarian@yahoo.com

The aim of this study was to investigate the properties of edible composite films made from chitosan and fucoidan combined with hydrolyzed fish proteins from *Carassius*. In this context, hydrolyzed fish protein was produced using the enzyme Alcalase, and fucoidan was extracted from the brown seaweed *Sargassum latifolium*. Subsequently, five types of edible films were prepared, including nano chitosan and chitosan-fucoidan with varying concentrations of hydrolyzed protein (0.0, 0.5, and 1.0 percent), and their properties were examined. The results indicated that the hydrolyzed protein had a high protein content and degree of hydrolysis. Additionally, the yield of fucoidan extraction was 5.89%, with total carbohydrates at 59.2%, protein at 21.9%, sulfate at 21.78%, and uronic acid at 8.85%. Mechanical tests showed that increasing protein concentration resulted in a decrease in the tensile strength of the films. Furthermore, physical tests revealed that higher protein concentrations led to increased water vapor permeability and moisture content of the films ($p < 0.05$). The hydrolyzed fish protein exhibited significant activity in scavenging DPPH free radicals, with an increase in concentration positively impacting this parameter ($p < 0.05$). Moreover, these films demonstrated high antimicrobial properties against pathogenic bacteria, with superior antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* compared to *Escherichia coli*. Overall, the findings of this study suggest that chitosan-fucoidan composite edible films incorporating hydrolyzed proteins can serve as a suitable option for enhancing the quality and shelf life of food products. These films not only possess improved physical and mechanical properties but also exhibit antioxidant and antimicrobial activities that can contribute to increased food safety and quality.