

مقاله علمی - پژوهشی:

نانو ریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از آبکافت آنزیمی ضایعات میگو با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم-کیتوزان و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشار خونی محصول

سکینه یگانه^{۱*}، سهیل ریحانی پول^۲

*skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱- دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰

چکیده

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی خواص مختلف پپتیدهای زیست فعال (با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون) نانوریزپوشانی شده با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم و کیتوزان بود. به همین جهت، ضایعات مراکز فراوری و بسته بندی میگو با استفاده از آنزیم نئوتراز آبکافت و خواص ضدباکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشار خونی محصول در قالب پنج تیمار شامل P (پپتیدهای آزاد)، NP (نانولیپوزوم های حامل پپتید)، NP-CH-0.05 (نانولیپوزوم های حامل پپتید با پوشش ۰/۰۵ درصد کیتوزان)، NP-CH-0.01 (نانولیپوزوم های حامل پپتید با پوشش ۰/۰۱ درصد کیتوزان) و NP-CH-0.5 (نانولیپوزوم های حامل پپتید با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان) ارزیابی شد. نتایج نشان داد، همه تیمارهای تحقیق تا حد مشخصی خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشار خونی دارند. تیمارهای P و NP در هر سه خاصیت، مقادیر تقریباً برابری ارائه کردند و خواص آنها اختلاف معنی داری نداشت ($p>0.05$). تیمارهای دارای پوشش کیتوزان به صورت معنی داری نسبت به تیمارهای P و NP خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشار خونی بیشتری داشتند ($p<0.05$). در سه تیمار دارای پوشش کیتوزان، با افزایش میزان کیتوزان، هر سه خاصیت مذکور به صورت معنی داری افزایش یافتند ($p<0.05$). در بین تیمارهای تحقیق، بیشترین فعالیت مهار رشد باکتری های /شریشیاکلاهی، باسیلوس سرئوس و /استافیلوکوکوس اورئوس (به ترتیب $45/89 \pm 0/96$ ، $34/82 \pm 0/75$ و $49/1 \pm 67/45$ درصد)، بالاترین نرخ مهار رادیکال های آزاد ABTS، DPPH و پراکسیداسیون لینولئیک اسید (به ترتیب $63/2 \pm 52/86$ ، $73/0 \pm 91/29$ و $89/06 \pm 2/11$ درصد) و موثرترین خاصیت ضد فشار خونی ($37/91 \pm 1/29$ درصد) نیز مربوط به تیمار NP-CH-0.5 بود.

لغات کلیدی: ضایعات میگو، پپتیدهای زیست فعال، نانولیپوزوم، خواص ضد باکتریایی، فعالیت آنتی اکسیدانی

*نویسنده مسئول

مقدمه

مراکز فراوری و بسته بندی میگو (که اخیراً در برخی از شهرهای شمالی و جنوبی احداث شده اند)، در کشور روزانه مقادیر زیادی ضایعات تولید می کنند که غالب این مواد به موادی تبدیل می شوند که ارزش افزوده آنها به مراتب کمتر از فراورده های نوینی مانند پپتیدهای زیست فعال (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۷) و بیوسیلایز (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) است. نگرانندگان پژوهش حاضر، با بررسی مراکز فراوری میگو مشخص کردند که قریب به ۴۰ درصد وزن کل میگو هنگام فراوری و بسته بندی دورریز می شود. بر اساس نتایج پیش تست مشخص شد، این ضایعات ۱۸-۱۴ درصد پروتئین دارند. این پروتئین از طریق آبکافت قابل بازیابی و تبدیل به پپتیدهای زیست فعال است. پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که در ساختار پروتئین اصلی غیر فعال می باشند (Sarmadi and Ismail, 2010). این پپتیدها ۲۰-۲ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون دارند (Park et al., 2001). پپتیدهای زیست فعال علاوه بر کارائی در صنایع غذایی، به عنوان امولسیفایر، کفزا و آنتی اکسیدان (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۷)، پس از مصرف انسانی، اثرات فیزیولوژیک خاصی (تنظیم کنندگی فشار خون، تقویت کنندگی سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و اثرات ضد میکروبی) بر بدن اعمال می کنند (Sun et al., 2004; Jia et al., 2010). این پپتیدها جهت اعمال این خواص (اثرات فیزیولوژیک) باید در جریان هضم و جذب (معدده و روده) سالم و فعال باقی بمانند (Segura-Campos et al., 2011). از آنجایی که ممکن است این پپتیدها در شرایط اسیدی و آنزیمی (آنزیم های پروتئولیتیک) دستگاه گوارش دنا توره و تجزیه شوند، استفاده از روش هایی جهت حفاظت از این پپتیدها ضروری به نظر می رسد. همچنین جهت حفظ و افزایش خواص نگهدارندگی (ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی) پپتیدهای زیست فعال در مواد غذایی، لازم است تکنیک های حفاظتی مقتضی به کار گرفته شود. زیرا هر ماده غذایی شرایط تولید و نگهداری خاصی دارد و ممکن است پپتیدهای زیست فعالی که جهت افزایش ماندگاری

آن ماده غذایی در فرمول استفاده شده باشد که دچار تغییرات نامطلوبی شوند. در چنین مواردی شاید بهترین روش، درون پوشانی پپتیدهای زیست فعال باشد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۸؛ صادقیان امین و همکاران، ۱۳۹۹؛ اجاقی و همکاران، ۱۴۰۰). طی این فرایند کپسولی اطراف پپتیدها ایجاد می شود که این ترکیبات فعال را در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفاظت می کند. ضمن اینکه کپسول های تشکیل شده اطراف پپتید در این تکنیک، محتویات خود را با سرعت کنترل شده و شرایط ویژه رها می کنند. یکی از انواع این کپسول ها، لیپوزوم ها هستند. لیپوزوم ها وزیکول های کلوئیدی می باشند که از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها تشکیل شده اند و در حضور مولکول های آب ساختارهای کروی دولایه ای ایجاد می کنند (Ghorbanzadeh et al., 2017). لیپوزوم ها دارای دم آب گریز و ناحیه سر آب دوست هستند. هنگامی که دو غشاء منفرد به هم نزدیک می شوند، دم های آب گریز به یکدیگر جذب می شوند در حالی که سر آب دوست هر دو غشاء به سمت آب قرار می گیرند. این فرایند، لایه مضاعف یا دوتایی کروی از مولکول های فسفولیپید را تشکیل می دهد. این کره فسفولیپیدی می تواند محلول های آبی را درون خود نگه دارد و حمل کند. لیپوزوم ها خاصیت آمفیفیلیک (دوگانه دوستی) دارند. لذا، قادر به کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب دوست، چربی دوست و آمفی فیل هستند (حسینی و همکاران، ۱۳۹۸). این خاصیت موجب می شود تا لیپوزوم ها بتوانند هر دو اسیدهای آمینه های قطبی و غیر قطبی موجود در پپتیدهای زیست فعال را کپسوله کنند (صادقیان امین و همکاران، ۱۳۹۹). نانولیپوزوم ها همان لیپوزوم هایی با اندازه کوچکتر هستند که از نظر ساختاری و شیمیایی با لیپوزوم ها یکسان هستند. در صنایع غذایی از نانولیپوزوم ها جهت حفاظت از ترکیبات مختلف مانند نگهدارنده های ضد میکروبی و قارچی و پپتیدهای زیست فعال نیز استفاده می شود (Rasti et al., 2012).

مطابق نتایج پژوهش های Page و Cudmor (۲۰۰۱) لیپوزوم و نانولیپوزوم که در واقع، کپسول هایی بر پایه لیپید هستند، در محیط دستگاه گوارش به وسیله

Staphylococcus aureus استفاده شد که از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شدند. محیط کشت‌های آگار مغذی^۱ و آبگوشت مغذی^۲ از شرکت Biolab (هندوستان) تهیه گردیدند.

تولید پپتیدهای زیست‌فعال (پروتئین‌های آبکافتی)

به منظور تولید پپتیدهای زیست‌فعال، ابتدا در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷/۴ به ارلن اضافه گردید. در مرحله بعد ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت ضایعات غیرفعال شوند. پس از سپری‌شدن این زمان به ارلن اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در مرحله بعد آنزیم نئوتراز به میزان ۳۰ واحد آنسون به ارلن مربوطه اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (مناسب برای فعالیت آنزیم نئوتراز) منتقل و ۹۰ دقیقه در این شرایط انکوبه شد تا فرایند آبکافت پروتئین‌ها انجام شود. بعد از این زمانها، به منظور قطع واکنش آبکافت، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت و خنک‌شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد (Guerard et al., 2002; Ovisipour et al., 2010). نتیجه این فرایند تولید پروتئین‌های آبکافتی با درجه آبکافت $23/68 \pm 1/35$ درصد بود (محاسبه شده بر اساس روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴)). شایان ذکر است، تمامی شرایط واکنش آبکافت (دما، زمان، pH و میزان آنزیم) بر اساس حد بهینه در عملیات پیش‌تست انتخاب شدند.

آنزیم‌های لیپازی (و نیز در شرایط به‌شدت اسیدی معده)، تجزیه می‌شوند و نمی‌توانند نقش حفاظتی کامل و مناسبی ایفاء کنند. استفاده از یک لایه کیتوزانی اطراف لیپوزوم موجب ایجاد افزایش کارایی از نظر حفظ محتوی و افزایش جذب (تحويل محتوی) می‌شود. زیرا گروه‌های کاتیونی کیتوزان و آنیونی فسفولیپید از طریق واکنش‌های الکترواستاتیک به یکدیگر متصل می‌شوند (حسنی و همکاران، ۱۳۹۸).

هدف از تحقیق حاضر در مرحله اول، نانو ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال (حاصل آبکافت ضایعات میگو با استفاده از آنزیم میکروبی نئوتراز) در پوششی از جنس نانولیپوزوم و کیتوزان می‌باشد. در مراحل بعدی خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشارخونی محصول تولیدی، ارزیابی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

فسفولیپید مورد استفاده در تحقیق حاضر تهیه شده از لسیتین گاوی به صورت لیوفیلیزه با درجه خلوص بیش از ۹۹ درصد از شرکت سیگما خریداری گردید. همچنین آمونیوم تیوسانات، فروز کلرید، آلفاتوکوفرول، لینولئیک اسید، کاپتوپریل، تری کلرواستیک اسید، بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)، (Ethylene diamine tetra acetic) EDTA، رادیکال‌های آزاد 2,2'-azino-bis(3-) ABTS (ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) DPPH و (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) نیز از همین شرکت تهیه شدند. ضایعات میگو از یکی از کارگاه‌های فراوری و بسته‌بندی این آبرزی در استان گلستان تهیه و در مجاورت زنجیره سرد پس از گذشت حدود سه ساعت به پایلوت فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. آنزیم مورد استفاده در تحقیق حاضر، آنزیم میکروبی نئوتراز (میزان فعالیت: ۰/۸ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم) است که از نمایندگی شرکت نووزایم دانمارک خریداری و تا شروع آزمایش‌ها در دمای یخچال نگهداری شد. به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پپتیدها از باکتری‌های شاخص مواد غذایی از جمله *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* و

¹ Nutrient agar

² Nutrient broth

تهیه نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش کیتوزان

از آنجایی که بر اساس نتایج پیش‌تست، بهترین پپتیدها جهت بروز فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون بودند، پروتئین آبکافتی تولیدی جهت دستیابی به این پپتیدها از اولترافیلتراسیون مربوطه (Merck, Millipore, EMD, Darmstadt, KGaA، ساخت آلمان) عبور داده شدند. سپس این پپتیدها با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر و فسفولیپید/کلسترول در آب مقطر حل شدند. این محلول پس از اختلاط با گلیسرول تا دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. pH مخلوط با استفاده از سود ۲ مولار (در حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد و شیکر به مدت ۱ ساعت) به ۷/۳ رسانده شد. لیپوزوم‌های خام تحت فشار بالا هموزن شده و با نسبت‌های مختلفی از محلول کیتوزان (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد وزنی/حجمی) مخلوط شدند (در دمای اتاق به مدت یک ساعت و با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه). شایان ذکر است، محلول کیتوزان با حل کردن کیتوزان در اسیداستیک یک درصد وزنی/وزنی تهیه شد. در مرحله بعد، محلول لیپوزومی در دمای اتاق با سونیکاتور (با پروپ ۲۰۰ یو پی اس) تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نهایتاً محصول تولیدشده در دمای محیط در معرض گاز نیتروژن نگهداری شد (Rasti et al., 2012). تیمارهای تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: تیمارهای تحقیق

Table 1: Experimental treatments

نماد تیمار	محتوی تیمار
P	پپتید آزاد
NP	نانولیپوزوم حامل پپتید فاقد پوشش
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم حامل پپتید با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم حامل پپتید با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم حامل پپتید با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد

بررسی خواص ضد باکتری محصول

آماده‌سازی کشت‌های میکروبی: به منظور فعال‌سازی سلول‌ها، باکتری‌های باسیلوس سرئوس، اشریشیا کلائی و استافیلوکوکوس اورئوس از کشت ذخیره به پلیت‌های آگار

مغذی منتقل و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در مرحله بعد، سلول‌های باکتریایی از محیط آگار به محیط آبگوشت مغذی انتقال داده شده و مجدداً به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها وارد فاز رشد لگاریتمی شوند. سلول‌های کشت‌داده‌شده تحت این شرایط در آزمایش‌های تعیین فعالیت ضد میکروبی پپتیدها مورد استفاده قرار گرفتند (Wald et al., 2016). فعالیت ضد باکتریایی تیمارها (مهارکنندگی): فعالیت مهارکنندگی رشد سلولی (باکتریایی) تیمارها به روش ریزرتق مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور ابتدا ۶۰۰ میکرولیتر کشت باکتریایی (که در فاز رشد لگاریتمی قرار داشتند) در لوله آزمایش وارد شد. سپس ۱۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مغذی استریل و ۱۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی پپتیدهای زیست‌فعال استریل (که با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری فیلتر شده بود) به لوله آزمایش اضافه گردید. در مرحله بعد لوله آزمایش در شرایط کاملاً استریل در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت انکوبه و کدورت چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت شد. با اندازه‌گیری نسبت جذب محلول ویال‌های تیمار به ویال شاهد (۱۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل)، اثر ضد میکروبی محلول حاوی پپتیدهای زیست‌فعال با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید. در رابطه ذیل As، جذب نمونه هدف و Ac جذب شاهد می‌باشد (Wald et al., 2016):

$$100 \times [1 - (As/Ac)] = \text{فعالیت مهارکنندگی}$$

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH): به منظور بررسی این شاخص، ابتدا نمونه‌ها با غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در آب مقطر حل شدند. در مرحله بعد ۱/۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH با غلظت ۰/۱۵ میلی مولار ترکیب و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس ۲۰ دقیقه در محیط فاقد نور

(کابینت آزمایشگاه) انکوبه شد. پس از استحصال سوپرناتانت، جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بر حسب درصد از رابطه زیر محاسبه شد. به منظور ساخت شاهد، حجم یکسانی از

آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPH مخلوط شد (Wu et al., 2003). همچنین از بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

$$100 \times \frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}} = \text{فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH} (\%)$$

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-آزینو-بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS): به منظور اندازه گیری این خاصیت محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. پس از سپری شدن این مدت، محلول تا رسیدن به میزان جذب 0.07 ± 0.02 در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (با غلظت ۲

میلی گرم در میلی لیتر) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه ذیل و بر حسب درصد محاسبه شد (Alemán et al., 2011). از بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید:

$$100 \times \frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}} = \text{فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS} (\%)$$

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید: جهت بررسی این شاخص، ابتدا ۴۰۰ میلی گرم از نمونه در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مول (pH=۷)، ۱/۳ میلی لیتر لینولئیک اسید و ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۹/۵ درصد حل شد. سپس حجم این محلول با آب مقطر به ۲۵ میلی لیتر رسانده شد. این مخلوط در یک لوله آزمایش ۳۰ میلی لیتری ریخته (با درپوش پیچی) و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. شرایط اتاق تاریک با بسته بندی با فویل آلومینیوم و کاغذ ضخیم تر حفظ شد. درجه اکسیداسیون اسید لینولئیک با استفاده از روش

تیوسیانات فریک اندازه گیری گردید (Mitsuda, 1966). به ۰/۱ میلی لیتر از مخلوط واکنش، ۴/۷ میلی لیتر اتانول ۰/۷۵، ۰/۱ میلی لیتر آمونیوم تیوسیانات ۳۰ درصد و ۰/۱ میلی لیتر فروز کلرید ۲۰ میلی مول محول در HCL (۳/۵ درصد) اضافه شد. پس از سه دقیقه، جذب محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. از بافر فسفات ۵۰ میلی مول (pH=۷) به عنوان شاهد و از آلفاتوکوفرول به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد استفاده شد. از رابطه ذیل جهت محاسبه فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید استفاده گردید (Osawa and Namiki, 1985):

$$100 \times \frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه}} - 1 = \text{فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید} (\%)$$

خاصیت ضد فشار خونی محصول
فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱ (ACE): به منظور بررسی این شاخص، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از ACE (۲۵ واحد بر میلی لیتر حل شده در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl) با ۲۰۰ میکرولیتر محصول (با

غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl) مخلوط و ترکیب حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. در مرحله بعد محلول ۰/۵ مولار FAPGG (N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly) به میزان ۱ میلی لیتر به

ترکیب مذکور اضافه و پس آنکوبه‌شدن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (نیم ساعت)، جذب ترکیب در طول موج ۳۴۵ نانومتر قرائت شد. جهت تهیه کنترل از بافر Tris-HCl به جای نمونه استفاده گردید. همچنین از کاپتوپریل (۵/۰)

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. فعالیت مهار ACE بر حسب درصد از رابطه ذیل محاسبه شد (Hou et al., 2003):

$$100 \times (\text{جذب کنترل} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل})) = \text{فعالیت مهار ACE (\%)}$$

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way Anova) و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL (نسخه ۲۰۱۴) جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید.

نتایج

خواص ضد باکتریایی محصول

فعالیت مهار رشد باکتری‌های شاخص مواد غذایی: در جدول ۲ فعالیت مهار رشد باکتری‌های شاخص مواد غذایی به‌وسیله تیمارهای تحقیق ارائه شده است. مطابق

این جدول، فعالیت مهار (ضد باکتریایی) پپتیدهای آزاد (تیمار P) و نانولیپوزوم‌های حامل پپتید (تیمار NP) اختلاف معنی‌داری ندارند ($p > 0.05$). همچنین فعالیت مهار نانولیپوزوم‌های پوشش داده‌شده با کیتوزان به صورت معنی‌داری از تیمارهای P و NP بیشتر است ($p < 0.05$). در این سه تیمار با افزایش میزان کیتوزان اطراف نانولیپوزوم‌ها، فعالیت مهار رشد روند افزایشی داشته است ($p < 0.05$). بیشترین فعالیت مهار رشد باکتری‌های اشریشیاکلای، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس (به‌ترتیب ۴۵/۸۹±۰/۹۶، ۴۴/۸۲±۰/۷۵ و ۴۹/۱±۶۷/۴۵ درصد) مربوط به تیمار NP-CH-0.5 بود ($p < 0.05$).

جدول ۲: فعالیت مهار رشد باکتری‌های شاخص مواد غذایی

Table 2: Growth inhibition activity of food index bacteria

کد تیمار	تیمار / باکتری‌ها	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		فعالیت مهار رشد (%)		
P	پپتید آزاد	۲۱/۲±۵۹/۱۵ ^d	۹/۰±۳۶/۵۱ ^d	۱۷/۱±۲۲/۳۴ ^d
NP	نانولیپوزوم فاقد پوشش	۲۲/۱±۰۳/۸۶ ^d	۸/۱±۹۷/۶۳ ^d	۱۸/۲±۰۶/۰۵ ^d
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۳۰/۰±۹۸/۶۲ ^c	۱۸/۱±۵۵/۰۴ ^c	۲۴/۱±۷۲/۹۳ ^c
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	۳۵/۱±۷۳/۰۶ ^b	۲۶/۰±۱۹/۳۳ ^b	۳۱/۲±۰۸/۶۵ ^b
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	۴۹/۱±۶۷/۴۵ ^a	۳۴/۰±۸۲/۷۵ ^a	۴۵/۰±۸۹/۹۶ ^a

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

Different letters in each column indicate a significant difference between the data ($p < 0.05$)

ندارند ($p > 0.05$). همان‌طوری‌که در جدول مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌ها، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0.05$)؛ به گونه‌ای که این شاخص از ۲۹/۱۱ در تیمار NP-CH-0.05 به ۳۸/۸۵

خواص آنتی‌اکسیدانی محصول

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: در جدول ۳ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH) تیمارهای تحقیق ارائه شده است. مطابق این جدول تیمارهای P و NP از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اختلاف معنی‌داری

و ۶۳/۵۲ درصد در تیمارهای NP-CH-0.1 و NP-CH-0.5 ارتقا یافت.

جدول ۳: فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای تحقیق

Table 3: DPPH free radical scavenging activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (%)
P	پپتیدهای آزاد	۲۰/۰±۱۹/۹۶ ^e
NP	نانولیپوزوم فاقد پوشش	۲۱/۱±۰۸/۳۵ ^e
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۲۹/۰±۱۱/۹۳ ^d
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	۳۸/۰±۸۵/۱۶ ^c
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	۶۳/۲±۵۲/۸۶ ^b
BHA		۷۹/۱±۳۳/۰۹ ^a

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

Different letters indicate a significant difference between the data ($p < 0.05$)

کیتوزان به صورت معنی داری از نظر شاخص مذکور متفاوت هستند ($p < 0.05$) به طوری که با افزایش غلظت کیتوزان در تیمارها، فعالیت مهار افزایش یافته است. بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در تیمار NP-CH-0.5 (۷۳/۰±۹۱/۲۹ درصد) ثبت شد که اختلاف معنی داری با آنتی اکسیدان بوتیل هیدروکسی آنیزول نداشت ($p > 0.05$).

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS: در جدول ۴ فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارهای تحقیق ارائه شده است. همان طوری که در جدول مشاهده می شود، این شاخص در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان (NP-CH-0.05، NP-CH-0.1، NP-CH-0.5) به صورت معنی داری بیشتر از تیمارهای فاقد پوشش (P و NP) است ($p < 0.05$). تیمارهای P و NP فعالیت مهار تقریباً برابری دارند ($p > 0.05$). اما تیمارهای دارای پوشش

جدول ۴: فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارهای تحقیق

Table 4: ABTS free radical scavenging activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار رادیکال ABTS (%)
P	پپتید آزاد	۳۴/۰±۱۲/۶۳ ^d
NP	نانولیپوزوم فاقد پوشش	۳۴/۱±۹۷/۱۶ ^d
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۴۰/۰±۳۱/۵۳ ^c
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	۵۱/۰±۰۶/۰۴ ^b
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	۷۳/۰±۹۱/۲۹ ^a
BHA		۷۴/۱±۵۸/۸۲ ^a

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

Different letters indicate a significant difference between the data ($p < 0.05$)

تغییری در فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید آنها ثبت نشد ($p > 0.05$). اما با اضافه کردن کیتوزان به نانولیپوزومها، فعالیت مهار آنها به صورت معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). همچنین در نانولیپوزومهای دارای پوشش، با افزایش غلظت کیتوزان، فعالیت مهار

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید: در جدول ۵ فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید پپتیدهای آزاد و نانولیپوزومهای بارگذاری شده ارائه شده است. همان طوری که در جدول مشاهده می شود، با نانو ریزپوشانی پپتیدهای آزاد در قالب نانولیپوزوم (NP)

پراکسیداسیون لینولئیک اسید تیمارها به صورت معنی داری بیشتر شد، گرچه اختلاف بین تیمارهای NP-CH-0.05 و NP-CH-0.1 معنی دار نبود ($p > 0.05$). در بین تیمارها، بیشترین میزان شاخص مورد بررسی $89/2 \pm 0.6/11$ درصد در NP-CH-0.5 ثبت شد ($p < 0.05$).

جدول ۵: فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید تیمارهای تحقیق

Table 5: Linoleic acid peroxidation inhibition activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید (%)
P	پپتید آزاد	$55/1 \pm 31/27^d$
NP	نانولیپوزوم فاقد پوشش	$56/2 \pm 0.2/49^d$
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	$68/1 \pm 33/84^c$
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	$68/0 \pm 92/72^c$
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	$89/2 \pm 0.6/11^b$
α -Tocopherol		$98/0 \pm 23/2^a$

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده هاست ($p < 0.05$).

Different letters indicate a significant difference between the data ($p < 0.05$).

خواص ضد فشارخونی محصول

فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱:

NP-CH-0.05 و NP-CH-0.1 ($p > 0.05$) به صورت معنی داری نسبت به تیمارهای فاقد پوشش اثر ضد فشار خونی بیشتری دارند ($p < 0.05$). در بین تیمارهای تحقیق، NP-CH-0.5 از بیشترین فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱ ($37/91 \pm 1/29$) درصد برخوردار بود ($p < 0.05$).

جدول ۶ فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱ (خاصیت ضد فشار خونی) تیمارها را نشان می دهد. مطابق جدول، تیمارهای P و NP از نظر فعالیت مهار آنزیم اختلاف معنی داری ندارند ($p > 0.05$). همچنین تیمارهای

جدول ۶: فعالیت مهار آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱ (ACE)

Table 6: ACE inhibition activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار ACE (%)
P	پپتید آزاد	$11/1 \pm 64/0.3^d$
NP	نانولیپوزوم فاقد پوشش	$12/2 \pm 0.1/36^d$
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	$19/0 \pm 75/42^c$
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	$20/1 \pm 53/17^c$
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	$37/1 \pm 91/29^b$
Captopril		$61/2 \pm 42/38^a$

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده هاست ($p < 0.05$).

Different letters indicate a significant difference between the data ($p < 0.05$).

بحث

یکی از خواص پپتیدهای زیست فعال، خواص ضد میکروبی آنهاست که در تحقیقات مختلف مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفته است (Di Bernardini et al., 2011؛ یعقوب زاده و همکاران، ۱۳۹۸؛ ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۹).

پژوهش حاضر نیز این خاصیت را در پپتیدهای زیست فعال حاصل از آبکافت ضایعات میگو تأیید کرد. همه تیمارهای تحقیق تا حد مشخصی دارای خاصیت مهار باکتری های شاخص مواد غذایی مورد بررسی (شریشیا کلاسی، باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اورئوس) بودند. با

نانوکپسوله کردن پپتیدهای آزاد (تیمار NP)، هیچ تغییری در فعالیت مهار رشد محصول ثبت نشد و این بدان معناست که می‌توان با این تکنیک پپتیدها را از شرایط نامساعد محیطی (شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش، شرایط خاص تولید و نگهداری محصولات غذایی) حفظ کرد و خاصیت ضد باکتریایی آنها نیز برقرار باشد. تیمارهای دارای پوشش کیتوزان تا حد قابل توجهی نسبت به تیمارهای بدون پوشش کیتوزان (P و NP) خاصیت ضد باکتریایی بیشتری ارائه کردند که این موضوع نشان‌دهنده هم‌افزایی کیتوزان به عنوان یک ماده ضد میکروبی (Paomephan et al., 2018) و پپتیدهای زیست‌فعال جهت مقابله با رشد سلول‌های باکتریایی است. این موضوع وقتی مورد تأیید کامل قرار می‌گیرد که طبق نتایج تحقیق پیش‌رو، در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان، با افزایش میزان کیتوزان در پوشش، فعالیت مهار رشد باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری شدت گرفت.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای تحقیق در سطح ایده‌آلی قرار داشت. همانند فعالیت ضد باکتریایی تیمارها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید) تیمارهای P و NP با هم اختلاف قابل ملاحظه‌ای نداشتند. این مورد با پژوهش Ramezanzade و همکاران (۲۰۱۷) و حسنی و همکاران (۱۳۹۸) مطابقت دارد. در تحقیق Ramezanzade و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH لیپوزوم‌ها (حامل پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافت ژلاتین پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) با پوشش ۰/۲ و ۰/۴ درصد کیتوزان کمتر از ۲۰ درصد گزارش شد (در غلظت برابر با تحقیق حاضر). در ادامه میزان این شاخص در غلظت‌های ۰/۸ و ۱ درصد کیتوزان به حدود ۲۲-۲۰ درصد ارتقاء یافت. همچنین شاخص فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS همه تیمارها در تحقیق مذکور ۳۵۰-۴۰ درصد ثبت شد.

در تحقیق پیش‌رو تیمارهای دارای پوشش کیتوزان دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به تیمارهای فاقد پوشش بودند. ضمن اینکه با افزایش میزان کیتوزان به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان (Di Bernardini et al.,

2011) در پوشش، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافت. این مورد نشان می‌دهد که از ترکیب پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش نانولیپوزوم و کیتوزان می‌توان به شکل بالقوه‌ای در فراورده‌های غذایی به عنوان آنتی‌اکسیدان استفاده کرد. اینکه احاطه کردن پپتیدهای زیست‌فعال با کپسولی از جنس نانولیپوزوم (تیمار NP) تأثیری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال نداشته است، ویژگی مثبتی تلقی می‌شود. زیرا با این تکنیک پپتیدها از شرایط نامساعد احتمالی در روند تولید مواد غذایی محفوظ باقی می‌مانند و می‌توانند اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را نیز اعمال کنند. در تحقیقی که پپتیدهای حاصل از ژلاتین پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با پوشش نانولیپوزوم و کیتوزان ریزپوشانی شدند، مانند تحقیق حاضر با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش از ۰/۲ به ۱ درصد، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به صورت معنی‌داری زیاد شد، اما برخلاف نتایج تحقیق حاضر، میزان فعالیت مهار رادیکال‌های مذکور در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان بیشتر از تیمارهای فاقد پوشش نبود. این روند برای شاخص قدرت کاهندگی نیز صادق بود (Ramezanzade et al., 2017).

در پژوهش پیش‌رو، به منظور سنجش خاصیت ضد فشار خونی پپتیدهای زیست‌فعال از شاخص مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (ACE) استفاده (Goodfriend et al., 1996; Witherow et al., 2001) و مشخص شد تیمارهای تحقیق تا حد مشخصی قابلیت مهار این آنزیم و در نتیجه کاهش فشار خون را دارند. سایر مطالعات مشابه نیز بر وجود چنین خاصیتی در پپتیدهای زیست‌فعال تأکید کرده‌اند (Khanthaphant et al., 2011; Chen et al., 2012). همانند خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی، در تحقیق حاضر خاصیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ نیز در تیمارهای P و NP تقریباً یکسان ثبت شد. همچنین این خاصیت در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان بیشتر از تیمارهای فاقد پوشش کیتوزان بود. فعالیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۰-۰۳ انجام شد که بدین وسیله سپاسگزاری می شود.

منابع

اجاق، م.، حسنی، ش. و حسنی، م.، ۱۴۰۰. تأثیر فرایندهای انجماد-انجمادزدایی و خشک کردن انجمادی-رهیدراسیون بر پایداری فیزیکی نانولیپوزومهای حامل پپتیدهای زیست فعال. نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۱۳(۴): ۸۱-۶۵. DOI: 10.30495/JFST.2021.680663

حسنی، ش.، شهیدی نوقابی، م. و اجاق، م.، ۱۳۹۸. تولید و ارزیابی نانولیپوزومهای حامل پپتیدهای زیست فعال به دست آمده از ضایعات ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۸(۱): ۴۴-۳۱. DOI: 10.22101/JRIFST.2019.04.30.813

ریحانی پول، س.، جعفرپور، ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۷. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل آلا (رنگین کمان) (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیمهای پروتامکس و نتوتراز. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴(۱): ۱۶۲-۱۷۶.

DOI:10.22067/ifstrj.v1395i0.53714

ریحانی پول، س. و جعفرپور، ع.، ۱۳۹۹. اثر پوشش فعال کیتوزان حاوی پروتئین آبکافتی بر خواص شیمیایی و میکروبی فیله ماهی قزل آلا (رنگین کمان) (*Oncorhynchus mykiss*) طی دوره نگهداری در دمای یخچال. نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۶(۴): ۵۰۵-۴۹۳. DOI: 10.22067/ifstrj.v16i4.82198

صادقیان امین، ی.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، ن.، اعلمی، م. و جوشقانی، ح.، ۱۳۹۹. بررسی ویژگی فیزیکی، شیمیایی و آنتی اکسیدانی نانولیپوزومهای

آنژیوتانسین ۱ در تیمارهای تحقیق حاضر (در غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر نمونه) حدود ۱۱-۳۸ درصد متغیر بود. در تحقیقی که خاصیت ضد فشار خونی پروتئینهای آبکافتی تولیدی از ضایعات میگو با استفاده از پنج آنزیم (آلکالاز، پپسین، آلفاکیموتریپسین، نتوتراز و فلاورزایم) مورد ارزیابی قرار گرفت، غلظتی از پروتئینها که برای مهار ۵۰ درصد ACE مورد نیاز بودند، ۵/۱۸-۰/۸۵ میلی گرم در میلی لیتر متغیر گزارش شدند (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱).

تکنیک انکپسوله کردن پپتیدهای زیست فعال با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم و کیتوزان نه تنها در افزایش خاصیت ضد فشار خونی پپتیدها مؤثر بود بلکه مطابق نتایج تحقیقات مختلف (Li et al., 2015؛ حسنی و همکاران، ۱۳۹۸) از تخریب پپتیدها در شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش جلوگیری کرده و به رهاسازی تدریجی محتویات کمک می کند. به همین جهت از این روش می توان جهت افزایش اثربخشی پپتیدهای زیست فعال به عنوان یک داروی طبیعی در درمان فشار خون بالا بهره برد. زیرا مهارکننده های سنتزی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین ۱ (مانند کابتوپریل و آنالاپریل) عوارض جانبی مختلفی از جمله سرفه، تغییر حس چشایی، جوش و ادم پوستی ایجاد می کنند (Messerli, 1999) و نگرانی هایی در زمینه مصرف آنها وجود دارد.

پپتیدهای زیست فعال حاصل از آبکافت آنزیمی ضایعات مراکز فراوری و بسته بندی میگو دارای خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشارخونی هستند. نانو ریزپوشانی این پپتیدها با پوشش نانولیپوزوم، تغییر معنی داری در خواص آنها ایجاد نمی کند. اما با افزودن کیتوزان به پوشش (پوشش ترکیبی نانولیپوزوم-کیتوزان)، خواص ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی و ضد فشارخونی پپتیدها به شکل قابل توجهی افزایش می یابد. همچنین با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش ترکیبی، خواص مورد بررسی نیز شدت می گیرد. بنابراین، پوشش ترکیبی نانولیپوزوم-کیتوزان در تکنیک نانو ریزپوشانی، از قابلیت ارتقاء و بهبود خواص پپتیدهای زیست فعال برخوردار است.

- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A.M. and Hayes, M., 2011.** Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4): 1296-1307. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.07.004.
- Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S. and Hadavi, R., 2017.** Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food chemistry*, 216: 146-152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.08.022.
- Goodfriend, T.L., Elliott, M.E. and Catt, K.J., 1996.** Angiotensin receptors and their antagonists. *New England Journal of Medicine*, 334(25): 1649-1655. DOI: DOI: 10.1056/NEJM199606203342507
- Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002.** Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19: 489-498. DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00203-5.
- Hou, W.C., Chen, H.J. and Lin, Y.H., 2003.** Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6): 1706-1709. DOI: 10.1021/jf0260242.
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.O.H.N., 1994.** Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1): 76-79. DOI:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x.
- بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۵ (۲): ۷۱-۸۲
- صفری، ر.، ریحانی پول، س.، بانکه ساز، ز.، تقوی، م. و صفری، ع.، ۱۳۹۹. تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از باکتری های اتوژن و سنجش کمی و کیفی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصل. علوم آبی پروری، ۱۹(۱): ۲۰۳-۲۱۲.
- طاهری، ع.، جلالی نژاد، س. و علی انوار، ا.، ۱۳۹۱. خواص ضد فشار خون و ضد اکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). پاتوبیولوژی مقایسه ای، ۱۹(۱): ۵۹۹-۶۰۸.
- یغوب زاده، ز.، کابوسی، ح.، پیروی، ف.، صفری، ر. و فتاحی، ا.، ۱۳۹۸. بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلاي رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۲): ۱۱۷-۱۲۸. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119049
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P., 2011.** Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4): 1044-1051. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.03.010.
- Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y. and Xia, W., 2012.** Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides*, 33(1): 52-58. DOI:10.1016/j.peptides.2011.11.006.

- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. and He, R., 2010.** The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1): 336-342. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.06.036.
- Khantaphant, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2011.** Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, 46(1): 318-327. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.09.005.
- Li, Z., Paulson, A.T. and Gill, T.A., 2015.** Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19: 733-743. DOI: 10.1016/J.JFF.2015.09.058
- Messerli, F.H., 1999.** Hypertension and sudden cardiac death. *American journal of hypertension*, 12(S9): 181S-188S.
- Mitsuda, H., 1966.** Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to shokuryo*, 19: 210-221. DOI: 10.4327/jsnfs1949.19.210.
- Osawa, T. and Namiki, M., 1985.** Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(5): 777-780. DOI: 10.1021/jf00065a001.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R. and Motamedzadegan, A., 2010.** Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using alcalase and protamex. *International Aquatic Research*, 2: 87-95.
- Page, D.T. and Cudmore, S., 2001.** Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug discovery today*, 6(2): 92-101. DOI: 10.1016/s1359-6446(00)01600-7.
- Paomephan, P., Assavanig, A., Chaturongakul, S., Cady, N.C., Bergkvist, M. and Niamsiri, N., 2018.** Insight into the antibacterial property of chitosan nanoparticles against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* and their application as vegetable wash disinfectant. *Food Control*, 86: 294-301. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.09.021.
- Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F. and Kim, S.K., 2001.** Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6): 651-656. DOI: 10.1007/s11746-001-0321-0
- Ramezanzade, L., Hosseini, S.F. and Nikkhah, M., 2017.** Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food chemistry*, 234: 220-229. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.177.
- Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M.R. and Yazid, A.M., 2012.** Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food*

- chemistry*, 135(4): 2761-2770. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.016
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A., 2010.** Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10): 1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020.
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D. and Hernandez-Escalante, V.M., 2011.** Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, 27(3): 213-226. DOI: 10.1080/87559129.2011.563395.
- Sun, J., He, H. and Xie, B.J., 2004.** Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21): 6646-6652. DOI: 10.1021/jf0495136.
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B. and Beermann, C., 2016.** Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, 205: 221-228. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.002.
- Witherow, F.N., Helmy, A., Webb, D.J., Fox, K.A. and Newby, D.E., 2001.** Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation*, 104(18): 2177-2181. DOI: 10.1161/hc4301.098252.
- Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y., 2003.** Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*, 36(9): 949-957. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00104-2.

Nanoencapsulation of bioactive peptides from shrimp wastes enzymatic hydrolysis with combined coating of nanoliposome-chitosan and evaluation of antibacterial, antioxidant and antihypertensive activity of the product

Sakineh Yeganeh S.^{1*}; Reyhani Poul S.²

*skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir

- 1- Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
- 2- Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the different properties of bioactive peptides (weight less than 3 kDa) nanoencapsulated with a combined coating of nanoliposome and chitosan. Accordingly, the wastes of shrimp processing and packaging centers were hydrolyzed using Neutrase enzyme and the antibacterial, antioxidant and antihypertensive properties of the product were evaluated in the form of five treatments including P (free peptides), NP (peptide-carrying nanoliposomes), NP-CH-0.05 (peptide-carrying nanoliposomes with a coating of 0.05% chitosan), NP-CH-0.1 (peptide-carrying nanoliposomes with a coating of 0.1% chitosan) and NP-CH-0.5 (peptide-carrying nanoliposomes with a coating of 0.5% chitosan). The results showed that all research treatments have certain antibacterial, antioxidant and antihypertensive properties. P and NP treatments provided almost equal values for all three properties and their properties did not differ significantly ($p>0.05$). Chitosan-coated treatments had significantly more antibacterial, antioxidant and antihypertensive properties than P and NP treatments ($p<0.05$). In chitosan-coated treatments, with increasing the amount of chitosan in the coating, all three mentioned properties were significantly increased ($p<0.05$). Among the research treatments, the highest growth inhibition activity of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* (45.89 ± 0.96 , 34.82 ± 0.75 and $49.67\pm1.45\%$, respectively), the maximum amount of inhibition of DPPH, ABTS and linoleic acid peroxidation (63.52 ± 2.86 , 73.91 ± 0.29 and $89.06\pm2.11\%$, respectively) and also the most effective antihypertensive property ($37.91\pm1.29\%$) were related to NP-CH-0.5 treatment.

Keywords: Shrimp waste, Bioactive peptides, Nanoliposome, Antibacterial properties, Antioxidant activity

*Corresponding author