

Adding carrier nanocapsules and free form of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of lanternfish (*Benthosema pterotum*) to doogh formulation and evaluating the microbial, chemical and sensory properties of the product

Yeganeh S.^{1*}; Reyhani Poul S.²; Tork Pahnabi F.^{1,3}; Shakerian F.¹

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

1-Department of Fisheries, 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

3-Caspian Sea Ecology Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran

Received: September 2025

Accepted: November 2025

Published: May 2026



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

The chemical types of antioxidants and antimicrobial compounds used in food industries as preservatives causes some diseases in consumers due to their harmful effects (Reyhani *et al.*, 2024). For this reason, over the last two decades, various researches have been conducted to produce and extract preservative compounds of natural origin, and have yielded acceptable results. Hydrolyzed proteins or bioactive peptides that one of the sources of their production are aquatic animals (with low marketability) and the wastes from their processing, are antioxidant (Ng and Wong, 2024) and antimicrobial (Rivera-Pérez *et al.*, 2023) compounds of natural origin. The use of bioactive peptides in food formulations as preservatives always requires the use of a suitable protection system in harsh environmental conditions. Because the structure of peptides may be destroyed in thermal processes during food production. One of the appropriate protection systems for active compounds is encapsulation, which is usually done by spray drying and freeze drying methods (Sarabandi *et al.*, 2020). During this process, a microcapsule or nanocapsule is created around the bioactive peptides, which protects these compounds from possible changes in adverse conditions. Meanwhile, the capsules formed around the peptide in this technique release their contents at a controlled rate and under special conditions (Rao *et al.*, 2016). Doogh is one of the favorite drinks of Iranians, which is produced from the lactic fermentation of milk. Due to its low pH and rich in nutrients, this product suffers from bacterial contamination, especially at ambient temperature, which ultimately causes spoilage and changes in its aroma during storage (Karimi *et al.*, 2022). This is an

important challenge in the milk industry. On the other hand, due to the disadvantages of chemical preservatives, it is very important to use natural preservatives that can solve this problem. The aim of the present research in the first stage is the nanoencapsulation of bioactive peptides obtained from lanternfish (*Benthosema pterotum*) by freeze drying method and maltodextrin-gum Arabic combined coating. In the next step, carrier nanocapsules and free peptides are used in doogh formulation and the microbial, chemical and sensory properties of the product are evaluated during 60 days of storage at refrigerator temperature.

Methodology

Lanternfish (*B. pterotum*) were hydrolyzed using Protamex enzyme under optimal conditions (50°C, Amount of enzyme: 30 Anson units, 90 min) and then by ultrafiltration, peptides with a molecular weight of less than 3 kilodaltons were isolated. Then these peptides were encapsulated using the freeze drying method and combined maltodextrin-gum Arabic coating. In the next step, carrier nanocapsules (200 and 400 µg/ml) and free peptides (400 and 500 µg/ml) were added to the doogh formulation. Finally, Microbial (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* count), antioxidant (ABTS radical scavenging activity), chemical (pH and acidity) and sensory (color, aroma and taste) properties of the product were evaluated during 60 days of storage at refrigerator temperature (4±1°C). The data were analyzed by one-way analysis of variance (One-Way ANOVA in SPSS₂₂ software) and the difference between the means was evaluated by Duncan's test at 95% confidence level ($p<0.05$).

Result

The results showed that the treatments containing nanocapsules carrying bioactive peptides (200 and 400 µg/ml) were more successful in inhibiting the growth and proliferation of *S. aureus* and *E. coli* bacteria as well as removing the ABTS free radical during the storage period compared to the control and the treatments containing free peptides (400 and 500 µg/ml) ($p<0.05$). The number of *S. aureus* bacteria in treatments containing 400 and 500 µg/ml of bioactive peptides as well as treatments containing 200 and 400 µg/ml of carrier nanocapsules on the first day of storage was 3.26 ± 0.08 , 2.25 ± 0.12 , 2.24 ± 0.09 and 1.11 ± 0.06 Log CFU/mL, respectively. These numbers for *Escherichia coli* were recorded as 4.42 ± 0.09 , 3.21 ± 0.17 , 3.23 ± 0.11 , and 1.94 ± 0.08 Log CFU/mL, respectively. The ABTS free radical scavenging rate in these treatments was measured on the same day as 29.73 ± 1.11 , 35.52 ± 1.72 , 39.65 ± 2.12 , and 47.14 ± 1.18 Unit/ml, respectively. By increasing the concentration of free peptides (from 400 to 500 µg/ml) and carrier nanocapsules (from 200 to 400 µg/ml), as well as the storage time (1, 20, 40 and 60 days), the number of bacteria under study in the treatments decreased significantly ($p<0.05$). pH, acidity and ABTS radical scavenging power of treatments containing 200 and 400 µg/ml carrier nanocapsules did not change significantly during the storage period ($p>0.05$) and had a constant trend. While in treatments containing free peptides and control, antioxidant activity and pH decreased ($p<0.05$), but acidity increased by increasing storage time ($p<0.05$). The pH values for the control, treatments containing 400 and 500 µg/mL of bioactive peptides, as well as 200 and 400 µg/mL of carrier nanocapsules on day 60 of storage were measured as 3.03 ± 0.02 , 3.55 ± 0.01 , 3.56 ± 0.05 , 4.74 ± 0.04 , and 4.75 ± 0.09 , respectively. These values for acidity were recorded as 0.85 ± 0.03 , 0.67 ± 0.02 , 0.68 ± 0.01 , 0.36 ± 0.07 , and 0.37 ± 0.03 , respectively. By increasing the concentration of free peptides (from 400 to 500 µg/ml) and carrier nanocapsules (from 200

to 400 µg/ml) in doogh, the antioxidant activity (ABTS free radical scavenging power) of the treatments increased significantly ($p<0.05$), but the pH and acidity values of them did not change ($p>0.05$). The evaluation of sensory indicators (color, smell and taste) of doogh samples showed that only the treatment containing 400 µg/ml of carrier nanocapsules on the first and 60 day earned equal points ($p>0.05$), but in other treatments, the sensory indicators during the storage period were significantly have decreased ($p<0.05$). Of course, the treatment containing 200µg/ml also had equal points in two color and smell indices on the first day and 60, but the score of the taste index in this treatment decreased on the 60th day compared to the first day. The result of examining the sensory indicators of different treatments compared to the control on the first day showed that adding bioactive peptides and carrier nanocapsules to the doogh formulation had no significant effect (positive or negative) on the color, smell and taste of the product.

Discussion and conclusion

The reduction in the number of *S. aureus* and *E. coli* bacteria in treatments with the addition of bioactive peptides and carrier nanocapsules indicates the ability of the aforementioned compounds to combat the growth and proliferation of the studied bacteria. That in this regard and also ABTS free radical scavenging, nanocapsules carrying bioactive peptides were more successful and stronger. This finding has been recorded due to the higher active surface area of the nanocapsules, as well as the capsule's (maltodextrin-gum Arabic) ability to protect the core (peptides) structure in adverse environmental conditions and its gradual release. Two mechanisms of peptides antibacterial activity are: A- Peptides are attached to the membrane of bacterial cells and create irreversible pores on the surface of the membrane, as a result of which the cytoplasm flows out of the cell and the cell is completely destroyed. Bioactive Peptides pass through the cell membrane and bind to intracellular organelles such as ribosomes and genomes and disrupt the normal growth process of the cell (Amissah, 2012). In the present research prove that the sensitivity of *S. aureus*, which is a Gram-positive bacteria, to free peptides and carrier nanocapsules is higher than *E. coli*. This higher sensitivity is related to the absence of the lipopolysaccharide layer in the cell wall of gram-positive bacteria (Reyhani Poul and Yeganeh, 2023). The results of the evaluation of pH, acidity and sensory properties of treatments during 60 days of storage showed that only in two treatments containing carrier nanocapsules, this indexes remained constant. But in the control and two treatments containing free peptides, mentioned indexes changed in a negative direction (decrease in the quality of dough). This finding indicates that in regard of controlling chemical and microbial reactions that cause food spoilage, bioactive peptides carrier nanocapsules are more powerful than free peptides. According to the obtained results, bioactive peptides from lanternfish with a molecular weight of less than 3 kilodaltons can be used as a natural preservative in the formulation of doogh. Also, if these peptides are nanoencapsulated using a combined maltodextrin-gum Arabic coating and freeze-drying technique, the resulting nanocapsules more actively combat oxidative and bacterial spoilage in doogh during storage at refrigerated temperatures.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

The Authors would like to thank the Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), for financial support of this research under contract number, 03-1404-03.

مقاله علمی - پژوهشی:

افزودن نانوکپسول‌های حامل و فرم آزاد پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی فانوس ماهی (*Benthosema pterotum*) به فرمولاسیون دوغ و ارزیابی خصوصیات میکروبی، شیمیایی و حسی محصول

سکینه یگانه^{۱*}، سهیل ریحانی پول^۲، فائزه ترک پهنابی^{۳،۱}، فرزانه شاکریان^۱

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

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

تاریخ چاپ: اردیبهشت ۱۴۰۵

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۴

چکیده

عوارض خطرناک نگهدارنده‌های شیمیایی برای سلامت مصرف‌کنندگان، حدود دو دهه است که توجه محققین را به سمت استخراج و تولید ترکیبات طبیعی قابل جایگزین با نگهدارنده‌های شیمیایی معطوف کرده است. از مهم‌ترین ترکیبات با منشأ طبیعی که فعالیت ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آنها در تحقیقات مختلف تأیید شده است، می‌توان به پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای زیست‌فعال اشاره کرد. در تحقیق حاضر، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون از فانوس ماهی (*Benthosema pterotum*) به روش آنزیمی جداسازی و سپس با کمک تکنیک خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی (با نسبت برابر) نانوریزپوشانی شدند. سپس نانوکپسول‌های حامل (۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و پپتیدهای آزاد (۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به فرمولاسیون دوغ اضافه و خصوصیات کیفی محصول طی ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی نانوکپسول‌های حامل نسبت به شاهد و تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد، در زمینه مهار رشد *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و حذف رادیکال آزاد ABTS موفق‌تر عمل کردند ($p < 0.05$). ضمن این که pH، اسیدیته و فعالیت حذف رادیکال این تیمارها برخلاف شاهد و تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد، طی دوره نگهداری فاقد تغییر معنی‌داری بودند ($p > 0.05$). با افزایش غلظت پپتیدهای آزاد و نانوکپسول‌های حامل، شمارش باکتری‌ها و قدرت مهار رادیکال ABTS در تیمارها به ترتیب کاهش و افزایش یافتند ($p < 0.05$). اما pH و اسیدیته تحت تأثیر قرار نگرفتند. ارزیابی رنگ، بو و مزه تیمارها نشان داد که فقط امتیازات تیمار حاوی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل در روز اول و ۶۰ برابر بود ($p > 0.05$) اما در سایر تیمارها، امتیازات شاخص‌های حسی در طول دوره نگهداری به صورت معنی‌داری کاهش یافتند ($p < 0.05$). یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوکپسول‌های زیست‌فعال با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی، تکنیک موثری به منظور ارتقاء و پایداری خواص نگهدارندگی آنها برای استفاده در صنعت لبنیات (به‌ویژه دوغ) است.

لغات کلیدی: پپتیدهای زیست‌فعال، صمغ عربی، دوغ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی

*نویسنده مسئول



Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

مقدمه

استفاده از آنتی اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی در فرمولاسیون مواد غذایی به واسطه مضراتی که برای سلامتی مصرف‌کنندگان دارند، همواره با نگرانی‌هایی همراه بوده و هست. به همین دلیل تحقیقات پیرامون ترکیبات طبیعی با خاصیت نگهدارندگی طی دو دهه اخیر توسعه یافته و نتایج قابل قبولی ارائه شده است. موجودات دریایی به منظور تولید و استخراج چنین ترکیباتی پتانسیل بالایی دارند. فوکوئیدان (Ayrapetyan *et al.*, 2021; Husni *et al.*, 2022)، آلژینات (Gharekhan *et al.*, 2020)، کیتین و کیتوزان (Santos *et al.*, 2020)، رنگدانه‌های مختلف نظیر آستاگرانترین (Reyhani Poul *et al.*, 2024) و فیکوسیانین (Yan *et al.*, 2014) از جمله ترکیبات طبیعی با منشأ دریایی هستند که خاصیت نگهدارندگی (فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی)، قابل قبولی دارند و می‌توانند در صنعت غذا و دارو مورد استفاده قرار گیرند.

پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای زیست‌فعال که یکی از منابع تولید آنها آبزیان (دارای بازارپسندی بسیار کم) و ضایعات حاصل از فرآوری آنها هستند، از دیگر ترکیبات آنتی اکسیدان (Ng *et al.*, 2024) و ضد میکروب (Abd Rashid *et al.*, 2022; Baco *et al.*, 2022; Rivera-Pérez *et al.*, 2023) با منشأ طبیعی هستند که می‌توانند در فرمولاسیون مواد غذایی نقش نگهدارندگی ایفاء کنند. ضمن این‌که این پپتیدها بر حسب توالی و ترکیب اسیدهای آمینه و وزن مولکولی، پس از مصرف انسان می‌توانند اثرات فیزیولوژیک خاصی از جمله، تنظیم‌کنندگی فشار خون (He *et al.*, 2021)، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، کاهش کلاسترول (Du *et al.*, 2024)، ضد سرطانی (Librizzi *et al.*, 2023)، ضد دیابتی (Lin *et al.*, 2023)، ضد میکروبی (Wang *et al.*, 2020) و آنتی اکسیدانی (Valero *et al.*, 2022) بر بدن اعمال کنند که به همین دلیل به عنوان ترکیبات عملگرا (فرا سودمند) در نظر گرفته می‌شوند (Sánchez and Vazquez, 2017).

استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای زیست‌فعال در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان نگهدارنده (با اهداف جلوگیری و تأخیر در اکسایش و مهار رشد قارچ‌ها

و باکتری‌ها) یا غنی‌کننده (ویژگی‌های سلامت‌بخشی)، همواره مستلزم استفاده از یک سیستم حفاظتی مناسب در شرایط سخت محیطی است. در صورت استفاده از این پپتیدها در فرمولاسیون یک ماده غذایی که طی تولید آن از دمای بالا استفاده می‌شود، ممکن است در اثر این عامل نامناسب محیطی ساختار آنها دچار آسیب شود. همچنین اگر یک ماده غذایی با پپتیدهای زیست‌فعال غنی شود یا کپسول‌هایی با اهداف دارویی از این پپتیدها تولید گردند، طی فرایند هضم (معده و روده) در محیط اسیدی و آنزیمی ساختار آنها تخریب می‌شود که نتیجه آن کاهش یا مختل شدن عملکرد (پپتیدها) است، زیرا شرط تاثیرگذاری خواص سلامت‌بخشی پپتیدهای زیست‌فعال بر بدن این است که با ساختار سالم وارد جریان خون شوند (Segura-Campos *et al.*, 2011). یکی از تکنیک‌های حفاظتی مقتضی برای پپتیدهای زیست‌فعال (ترکیبات فعال)، ریزپوشانی است که معمولاً به روش‌های خشک کردن پاششی (Berraquero-García *et al.*, 2023) و خشک کردن انجمادی (Sarabandi *et al.*, 2020) انجام می‌شود. طی این فرایند، میکروکپسول یا نانوکپسولی اطراف پپتیدهای زیست‌فعال ایجاد می‌شود که از تخریب ساختاری آنها در شرایط نامساعد ممانعت می‌کند. ضمن این‌که کپسول‌های تشکیل شده اطراف پپتیدها در این تکنیک، محتویات خود را با سرعت کنترل شده و شرایط ویژه رها می‌کنند (Rao *et al.*, 2016; Sarabandi *et al.*, 2019). در فرایند ریزپوشانی از ترکیبات مختلف کربوهیدراتی (مالتودکسترین و صمغ عربی)، سلولزی (کربوکسی متیل سلولز، متیل سلولز و اتیل سلولز)، پروتئینی (کازئین، پروتئین آب پنیر و ژلاتین) و لیپیدی (لیپوزوم، واکس، پارافین، بیزواکس، دی گلیسریدها و مونوگلیسریدها) برای پوشش (دیواره) ترکیبات فعال (هسته) استفاده می‌شود.

خانواده فانوس ماهیان (Myctophidae) با زی‌توده ۶۵۰-۵۵۰ میلیون تن، حدود ۷۰ درصد از ماهیان مزوپلاژیک آبهای آزاد را تشکیل می‌دهند (Shaviklo and Moradi, 2019). بین گونه‌های مختلف فانوس ماهیان، *Benthosema pterotum* گونه غالب است که با نام فانوس ماهی شناخته می‌شود و بزرگترین ذخیره خانواده Myctophidae در

دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنزیم مورد استفاده در این پژوهش، آنزیم میکروبی پروتامکس با فعالیت ۱/۵ واحد آنسون به ازاء یک میلی‌لیتر آنزیم بود که از نمایندگی شرکت Novozyme (دانمارک) تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. باکتری‌های *Escherichia coli* (PTCC 1330) و *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112) نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

تولید پروتئین هیدرولیز شده

به منظور آماده‌سازی سوپسترا، وزن مشخصی از فانوس ماهی از فریزر خارج شد و با قرارگیری در دمای یخچال (4 ± 1 درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۴ ساعت انجمادزایی صورت گرفت. سپس نمونه با آب سرد شستشو و نهایتاً به طور کامل چرخ شد. به منظور آغاز واکنش هیدرولیز، ابتدا در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم سوپسترا قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با $pH=7/4$ 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 غیر فعال شوند. پس از سیری شدن این زمان به ارلن اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در مرحله بعد آنزیم پروتامکس به میزان ۳۰ واحد آنسون (به ازاء ۱ کیلوگرم سوپسترای پروتئینی) به ارلن اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و ۹۰ دقیقه در این شرایط ماند تا فرایند هیدرولیز پروتئین‌ها انجام شود. سپس به منظور قطع واکنش، 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 ۸۰۰۰g سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شد (Ovissipour et al., 2009).

درجه هیدرولیز و بازیابی پروتئین فرایند

بعد از پایان فرایند هیدرولیز، محلول TCA^۱ (مرک، آلمان) ۲۰ درصد با نسبت برابر به سوپرناتانت افزوده شد و محلول

دریای عمان و چین شرقی مربوط به همین گونه است. خانواده فانوس‌ماهیان، به رغم غنی‌بودن از نظر پروتئین با کیفیت و مواد معدنی فراوان (Kazemi et al., 2024)، به دلیل مقادیر بالای استرواکس در چربی و اندازه بسیار کوچک (۵-۱ سانتی‌متر) غالباً به عنوان غذای انسان قابل مصرف نیستند. ارزش غذایی بالا، عدم مصرف انسانی به صورت مستقیم و فراوانی زیاد، همگی موجب شده‌اند که این خانواده به عنوان منبع مناسبی به منظور تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده مطرح باشند (Shaviklo, 2020; Kazemi et al., 2024).

دوغ یکی از نوشیدنی‌های مورد علاقه ایرانی‌هاست که از تخمیر لاکتیکی شیر تولید می‌شود. این محصول به دلیل pH کم و غنی‌بودن از عناصر غذایی به‌ویژه در دمای محیط دچار آلودگی‌های باکتریایی می‌شود که این عامل نهایتاً موجب فساد و تغییر عطر و بوی آن در طول زمان نگهداری می‌گردد (Karimi et al., 2022). این مورد به عنوان یک چالش مهم در صنعت شیر مطرح است. همچنین به دلیل مضرات نگهدارنده‌های شیمیایی، استفاده از نگهدارنده‌هایی با منشاء طبیعی که بتوانند این مشکل را حل کنند، از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف تحقیق حاضر در مرحله اول نانوکپسولاسیون پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی فانوس ماهی با روش خشک‌کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی است. در مرحله بعد ضمن بررسی خاصیت ضد باکتری پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آنها، از این ترکیبات در فرمولاسیون دوغ استفاده و خصوصیات میکروبی، شیمیایی و حسی محصول طی ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال ارزیابی می‌گردد.

مواد و روش کار

تهیه ماهی و آنزیم

فانوس ماهی از صیادان محلی بندرعباس پس از پهلویی‌گیری کشتی صید ترال خریداری گردید. سپس ماهی در جعبه ۵ کیلوگرمی محتوی یخ در کوتاه‌ترین زمان ممکن با هواپیما به تهران و سپس به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل و تا شروع آزمایش‌ها در فریزر با

^۱ Trichloroacetic acid (TCA)

نانوریز پوشانی کردن پتیدهای زیست‌فعال

به این منظور از پوشش ترکیبی مالتودکسترین و صمغ عربی (سیگما، آلمان) با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از هر دو پوشش در آب مقطر به صورت جداگانه (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه گردید. این دو سوسپانسیون با قراردادن بر همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ دقیقه، همگن و پس از کاهش دما به ۲۵ درجه سانتی‌گراد با یکدیگر ترکیب شدند. سپس ۲ گرم از پتیدهای زیست‌فعال (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر چرخه ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین چرخه‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان، از دستگاه هموژنایزر (اولتراتوراکس، Ika، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرایند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک شد (Safari et al., 2022).

ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

میانگین اندازه ذرات و شاخص توزیع اندازه ذره‌ای پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی^۱ به روش تفرق نور پویا^۲ با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها، از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) استفاده گردید. در این روش

حاصل با دور ۶۷۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید به روش بیورت سنجیده شد. نهایتاً درجه هیدرولیز از نسبت نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد TCA به نیتروژن کل نمونه به صورت درصد محاسبه و گزارش شد. بازیابی پروتئین با استفاده از نسبت [گرم پروتئین هیدرولیزشده×میزان نیتروژن پروتئین هیدرولیزشده] بر [گرم سوبسترا×میزان نیتروژن سوبسترا] به صورت درصد بدست آمد (Hoyle and Merritt, 1994).

تجزیه و تحلیل تقریبی سوبسترا و پودرهای هیدرولیزشده

به منظور تعیین میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر فانوس ماهی (سوبسترا) و پودرهای هیدرولیزشده از روش‌های استاندارد AOAC استفاده شد (AOAC, 2005).

جداسازی پتیدها

به منظور جداسازی پتیدها از اولترافیلتراسیون با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (MWCO)، ۳ و ۳۰ کیلودالتون استفاده شد. در ادامه سه فرکشن با اوزان مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون، ۳۰-۳ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند. ابتدا پروتئین هیدرولیزشده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتون در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ (Sigma، kl، ۱۶-۲، اسپانیا) شد. سپس پروتئین هیدرولیزشده کمتر از ۳۰ کیلودالتون مجدداً با استفاده از فیلتر آمیکون ۳ کیلودالتون در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ g سانتریفیوژ گردید. بدین ترتیب پتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون، بین ۳ و ۳۰ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند (Yaghoubzadeh et al., 2019). از آنجایی‌که بر اساس نتایج پیش‌تست (و مرور منابع)، پتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون عملکردی مطلوب‌تری نسبت به دو وزن دیگر از خود نشان دادند، این وزن برای انجام عملیات‌های بعدی انتخاب شد.

¹ PBS

² Dynamic Light Scattering

منظور انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Sarada *et al.*, 1999). به منظور تعیین MIC و MBC پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آنها برای باکتری‌ها، از روش رقیق‌سازی در لوله‌های آزمایش استفاده شد. رقت‌های مورد استفاده پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که به همراه یک میلی‌لیتر از محیط آگوشت اینفیوژن قلب و مغز گاو به لوله آزمایش اضافه شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های شاخص به لوله‌ها اضافه شده و در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. جهت بررسی تغییرات حاصله، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. غلظتی از سوسپانسیون میکروبی که کمترین جذب نوری را نشان داد به عنوان MIC و غلظتی از سوسپانسیون که بعد کشت ۲۴ ساعته، فاقد رشد کلنی در محیط کشت بود نیز به عنوان MBC تعیین شد (Sitohy *et al.*, 2008). با توجه به اینکه MIC و MBC برای *E. coli* بیشتر از *S. aureus* اندازه‌گیری گردید، پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل بر اساس مقادیر MIC و MBC *E. coli* به فرمولاسیون دوغ اضافه شدند (جدول ۱).

آماده‌سازی دوغ فرموله‌شده با پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل آنها

ابتدا شیر با چربی ۱/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد پاستوریزه گردید. سپس به شیر اجازه داده شد تا دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد سرد شده و در این دما استارترهای ماست (*Streptococcus thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*) به شیر پاستوریزه اضافه گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به اسیدیته ۱۲۰ درجه دورنیک صورت گرفت و سپس به ماست تولیدشده مقدار ۵۰ درصد آب و ۰/۷ درصد نمک اضافه شد. در مرحله بعد، محصول تا دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد و سپس سردکردن تا دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در مرحله بعد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* به میزان 10^6 کلونی بر میلی‌لیتر، پپتیدهای زیست‌فعال در دو غلظت

نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات ($\text{pH}=7/4$) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم-تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت (Hasani *et al.*, 2019). بازده فرایند نانو ریزپوشانی نیز با استفاده از روش Yan و همکاران (۲۰۱۴) تعیین گردید.

تعیین غلظت‌های مورد استفاده پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل به منظور استفاده در فرمولاسیون دوغ

از آنجایی‌که باکتری‌های وارده به فرمولاسیون دوغ، *S. aureus* و *E. coli* هستند و طبق پیش‌بینی‌ها، این باکتری‌ها طی دوره نگهداری شمارش می‌شوند، غلظت‌های مورد استفاده پپتیدها و نانوکپسول‌ها بر اساس حداقل غلظت مهارکننده (MIC^1) و حداقل غلظت کشنده (MBC^2) آنها برای باکتری‌های مذکور تعیین شدند.

بررسی MIC و MBC پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل برای *S. aureus* و *E. coli*

محیط کشت مورد استفاده به منظور آماده‌سازی باکتری‌ها، آگوشت اینفیوژن مغز و قلب گاو^۳ (شرکت بیولب هندوستان) بود. پس از کشت اولیه باکتری‌ها، نمونه‌ها در دو دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای *S. aureus* و *E. coli* به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. در مرحله بعد، جهت دستیابی به رسوب باکتریایی، محیط‌های کشت حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها در دور ۵۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از خارج کردن مایع رویی و افزودن بافر فسفات به رسوب باقیمانده، فرایند سانتریفوژ دو بار دیگر تکرار گردید. در هر مرحله نیز از بافر فسفات جهت خارج کردن اثرات محیط آگوشت اولیه استفاده شد. سپس به رسوب باقیمانده مقداری بافر فسفات اضافه و با لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (معادل $10^8 \times 1/5$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) مقایسه گردید. نهایتاً با رقیق‌سازی نمونه‌ها، رقت $10^6 \times 1$ به

¹ Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

² Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

³ Brain Heart Infusion Broth

میکروبی، شیمیایی و حسی در روزهای ۱، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روی تیمارها انجام گرفت (Karimi et al., 2022).

۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین نانوکپسول‌های حامل با دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به فرمولاسیون دوغ اضافه شدند. آزمون‌های

جدول ۱: مقادیر MIC و MBC پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل برای *E. coli* و *S. aureus*

Table 1: MIC and MBC values of bioactive peptides and its carrier nanocapsules against *S. aureus* and *E. coli* (μg/ml)

Strain	Form of peptides	MIC (μg/ml)	MBC (μg/ml)
<i>S. aureus</i>	Free	200	400
	Nanoencapsulated	100	200
<i>E. coli</i>	Free	400	500
	Nanoencapsulated	200	400

I: درصد بازدارندگی، A_{b15}: جذب شاهد بعد از ۱۵ دقیقه، A_{s15}: جذب نمونه بعد از ۱۵ دقیقه

اندازه‌گیری pH و اسیدیته تیمارها

به منظور اندازه‌گیری pH و اسیدیته از روش استاندارد ملی به شماره ۲۸۵۲ و pH متر آدوا (ad11، ایران) استفاده شد.

ارزیابی ویژگی‌های حسی تیمارها

به منظور بررسی شاخص‌های رنگ، بو و مزه تیمارها از روش استاندارد ملی به شماره ۲۴۵۳ و تعداد ۸ کارشناس (۵ مرد و ۳ زن) با بازه سنی ۲۵-۴۰ سال (شاغل در کارخانه) استفاده شد. ارزیابی حسی به وسیله آزمون هدونیک ۹ نقطه‌ای (۹: بسیار مناسب، ۸: تا حدود زیادی مناسب، ۷: مناسب، ۶: نسبتاً مناسب، ۵: نه مناسب و نه نامناسب، ۴: نسبتاً نامناسب، ۳: نامناسب، ۲: تا حدود زیادی نامناسب، ۱: بسیار نامناسب) در روزهای اول و ۶۰ نگهداری تیمارها انجام گرفت (Reyhani Poul et al., 2024).

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن (سطح اطمینان ۰/۰۹۵) استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و EXCEL (نسخه ۲۰۱۶) برای رسم اشکال استفاده گردید. شایان ذکر است که کلیه آزمایش‌های تحقیق در سه تکرار

شمارش *E. coli* و *S. aureus* تیمارها

شمارش باکتری *S. aureus* طبق استاندارد ایران به شماره ۶۸۰۶-۳ در محیط برد پارکر آگار^۱ با روش کشت سطحی و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. به منظور شمارش باکتری *E. coli* از محیط کشت ویولت رد بایل آگار و روش پورپلیت و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (Ahmadi et al., 2018).

فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS تیمارها

ابتدا یک محلول ۷ مولار ABTS در آب مقطر تهیه شد. این محلول توسط پرسولفات پتاسیم اکسید شده و به مدت ۱۴ ساعت در تاریکی قرار گرفت. پس از گذشت این زمان، محلول رادیکال کاتیون به‌دست آمده به وسیله اتانول خالص، ۵۰ بار رقیق و نهایتاً از آن استفاده شد. بدین ترتیب، در هر یک از لوله‌های آزمایش آماده‌شده، ۱ میلی‌لیتر از این محلول ریخته شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از تیمارها به آن‌ها اضافه و جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر (Uv/Vis 2100، Uniko، آمریکا) قرائت گردید. همچنین به یکی از لوله‌های آزمایش به جای نمونه، اتانول اضافه (کنترل مثبت) و جذب آن در لحظه اول و ۱۵ دقیقه بعد قرائت شد. نهایتاً فعالیت مهار تیمارها از طریق رابطه ذیل محاسبه و به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل آسکوربیک‌اسید گزارش گردید (Miliauskas et al., 2004):

$$I = [(A_{b15} - A_{s15}) / A_{b15}] \times 100$$

¹ Violet Red Bile Agar (VRBA)

انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند.

نتایج

خصوصیات فرایند هیدرولیز و ترکیب شیمیایی سوبسترا و پودر هیدرولیز شده

در جدول ۲ اطلاعات فرایند هیدرولیز و ترکیب شیمیایی سوبسترا و پروتئین‌های هیدرولیز شده ارائه شده است. مطابق این جدول، پودر هیدرولیز شده دارای حدود ۹۳ درصد پروتئین و کمتر از ۰/۳ درصد چربی بود. همچنین درجه هیدرولیز فرایند (Degree of hydrolysis) $21/53 \pm 1/86$ و بازیابی پروتئین (Protein recovery) $92/67 \pm 1/24$ درصد ثبت شد.

جدول ۲: تجزیه و تحلیل فرایند هیدرولیز، سوبسترا و پروتئین‌های هیدرولیز شده

Table 2: Analysis of the hydrolysis process, substrate, and fish protein hydrolysate (%)

	Protein	Fat	Moisture	Ash	DH	PR
Substrate	21.04 $\pm$ 0.71	2.96 $\pm$ 0.57	66.32 $\pm$ 1.43	7.89 $\pm$ 0.68	-	-
Fish protein hydrolysate	93.21 $\pm$ 1.46	0.23 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.09	21.53 $\pm$ 1.86	92.67 $\pm$ 1.24

نتایج شمارش باکتری *S. aureus* و *E. coli* در فرمولاسیون دوغ طی دوره نگهداری به ترتیب در جداول ۴ و ۵ ارائه شده است. با توجه جداول، در روز اول، بیشترین میزان *S. aureus* ($5/0 \pm 79/15$) لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر) و *E. coli* ($5/0 \pm 94/18$) لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر) در شاهد شمارش شد ($p < 0/05$). کمترین شمارش باکتری‌های مذکور در همین روز (به ترتیب $1/0 \pm 11/06$ و $1/94 \pm 0/08$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر) مربوط به تیمار حاوی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل بود ($p < 0/05$). مطابق جداول ۴ و ۵، در تیمارهای حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل در روز بیستم و بعد آن *S. aureus* و *E. coli* وجود نداشت.

خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

در جدول ۳، خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی ارائه شده است. مطابق این جدول، میانگین سایز نانوکپسول‌ها، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای آنها به ترتیب حدود $293/6$ نانومتر، $0/398$ و $41/26$ میلی‌ولت است. همچنین کارایی فرایند نانوریزپوشانی نیز $89/12 \pm 3/05$ درصد اندازه‌گیری شد.

جدول ۳: خصوصیات فیزیکی نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش مالتودکسترین-صمغ عربی

Table 3: Physical properties of nanocapsules carrying bioactive peptides coated by maltodextrin- gum arabic

Physical properties	Level
Average particle size (nm)	293.6 $\pm$ 2.83
particle dispersity index	0.398 $\pm$ 0.06
Zeta potential (mv)	+41.26 $\pm$ 1.53
Encapsulation efficiency (%)	89.12 $\pm$ 3.05

ارزیابی خصوصیات میکروبی، شیمیایی و حسی دوغ فرموله شده با پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل شمارش باکتری *S. aureus* و *E. coli*

جدول ۴: شمارش *S. aureus* تیمارها طی مدت نگهداری (Log CFU/mL)Table 4: *S. aureus* count in treatments during storage time (Log CFU/mL)

Treatments	During storage (day)			
	1	20	40	60
Control	5.79±0.15 ^{Aa}	4.35±0.21 ^{Ba}	3.29±0.07 ^{Ca}	2.18±0.03 ^{Da}
Doogh containing 400 µg/ml peptides	3.26±0.08 ^{Ab}	1.83±0.02 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Cb}	0.00±0.00 ^{Cb}
Doogh containing 500 µg/ml peptides	2.25±0.12 ^{Ac}	1.14±0.05 ^{Bc}	0.00±0.00 ^{Cb}	0.00±0.00 ^{Cb}
Doogh containing 200 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	2.24±0.09 ^{Ac}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Bb}
Doogh containing 400 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	1.11±0.06 ^{Ad}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Bb}

حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در هر سطر و ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

Different uppercase and lowercase letters respectively in each row and column, indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

جدول ۵: شمارش *E. coli* تیمارها طی مدت نگهداری (Log CFU/mL)Table 5: *E. coli* count in treatments during storage time (Log CFU/mL)

Treatments	During storage (day)			
	1	20	40	60
Control	5.94±0.18 ^{Aa}	5.11±0.21 ^{Ba}	4.32±0.07 ^{Ca}	3.67±0.03 ^{Da}
Doogh containing 400 µg/ml peptides	4.42±0.09 ^{Ab}	2.78±0.12 ^{Bb}	1.81±0.19 ^{Cb}	0.00±0.00 ^{Db}
Doogh containing 500 µg/ml peptides	3.21±0.17 ^{Ac}	1.91±0.08 ^{Bc}	1.12±0.01 ^{Cc}	0.00±0.00 ^{Db}
Doogh containing 200 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	3.23±0.11 ^{Ac}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bb}
Doogh containing 400 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	1.94±0.08 ^{Ad}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bd}	0.00±0.00 ^{Bb}

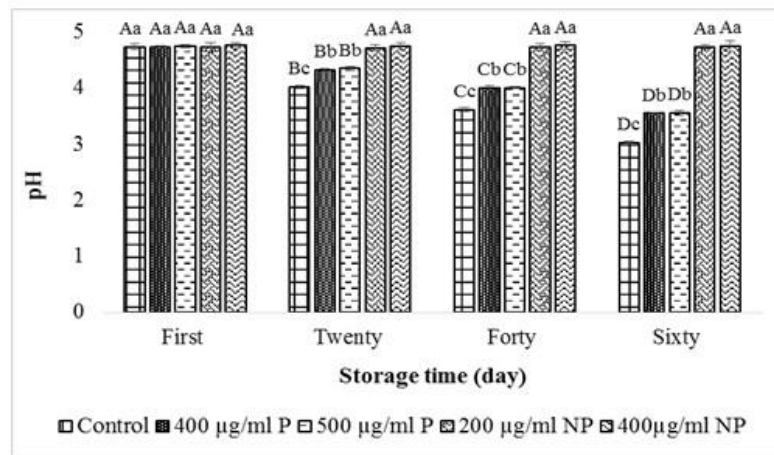
حروف بزرگ و کوچک متفاوت به ترتیب در هر سطر و ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p < 0.05$).

Different uppercase and lowercase letters respectively in each row and column, indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

ارزیابی pH تیمارها

در شکل ۱ روند تغییرات pH تیمارها طی دوره نگهداری نشان داده شده است. در روز اول نگهداری، بین شاهد و تیمارهای تحقیق از نظر pH اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نگهداری، دو تیمار ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال (P) و همچنین تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل (NP) فاقد اختلاف معنی‌دار ($p > 0.05$) بودند و pH بالاتری نسبت به شاهد داشتند ($p < 0.05$). طی روزهای نگهداری، فقط در دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل، میزان pH ثابت ماند، اما در سایر تیمارها این شاخص روند کاهشی داشت ($p < 0.05$).

در ادامه مشخص شد، تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال در روز ۴۰ دارای *E. coli*، اما فاقد *S. aureus* بودند. با گذشت زمان نگهداری، شمارش *S. aureus* و *E. coli* در همه تیمارها به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$) به‌طوری‌که در روز ۶۰، باکتری‌های مذکور فقط در شاهد شمارش شدند. در روز اول نگهداری، تیمارهای حاوی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل از نظر شمارش *S. aureus* و *E. coli* فاقد اختلاف معنی‌داری بودند ($p > 0.05$). از مقایسه جداول ۴ و ۵ مشخص می‌شود که تعداد باکتری *E. coli* در نمونه‌های دوغ فرموله‌شده بیشتر از *S. aureus* بود. همچنین با افزایش غلظت هر دو فرم پپتیدها در تیمارها، تعداد باکتری‌های مورد مطالعه کاهش یافتند ($p < 0.05$).



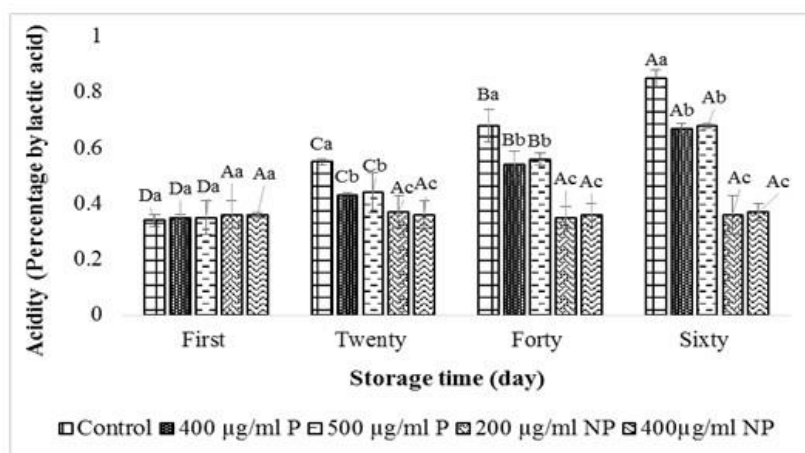
شکل ۱: pH تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین pH یک تیمار در روزهای مختلف و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین pH تیمارهای مختلف در یک روز است ($p < 0.05$).

Figure 1: pH values of the experimental treatments during the storage period. Different capital letters indicate a significant difference between the pHs of the same treatment on different days, and different lowercase letters indicate a significant difference between the pHs of different treatments on the same day ($p < 0.05$).

میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل (NP) فاقد اختلاف معنی‌دار ($p > 0.05$) بودند و اسیدیته کمتری نسبت به شاهد داشتند ($p < 0.05$). طی روزهای نگهداری، فقط در دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل، میزان اسیدیته ثابت ماند، اما در سایر تیمارها این شاخص روند افزایشی نشان داد ($p < 0.05$).

ارزیابی اسیدیته تیمارها

در شکل ۲ روند تغییرات اسیدیته تیمارها طی دوره نگهداری نشان داده شده است. در روز اول نگهداری، بین شاهد و تیمارهای تحقیق از نظر اسیدیته اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). در روزهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ نگهداری، تیمارهای ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال (P) و تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰



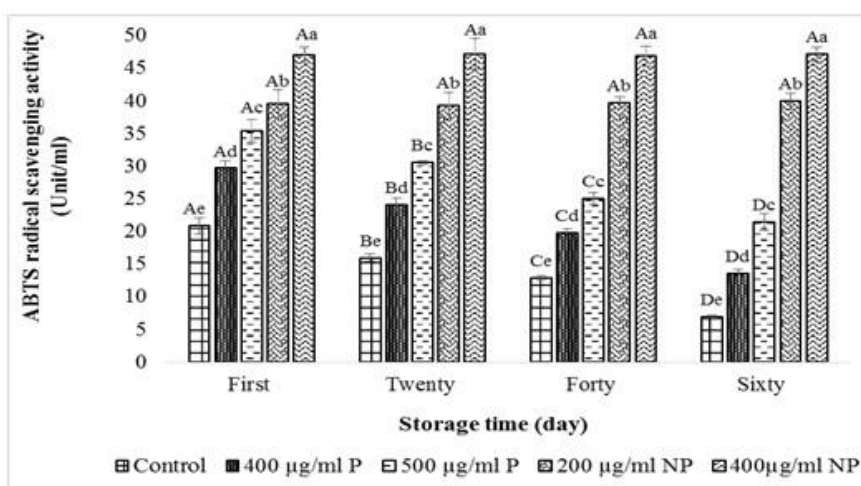
شکل ۲: اسیدیته تیمارهای تحقیق طی دوره نگهداری. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین اسیدیته‌های یک تیمار در روزهای مختلف و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین اسیدیته‌های تیمارهای مختلف در یک روز است ($p < 0.05$).

Figure 2: Acidity values of the experimental treatments during the storage period. Different capital letters indicate a significant difference between the acidities of the same treatment on different days, and different lowercase letters indicate a significant difference between the acidities of different treatments on the same day ($p < 0.05$).

۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل (NP) به ترتیب $39/65 \pm 2/12$ و $47/14 \pm 1/18$ واحد بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آنها، فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). با گذشت روزهای نگهداری، فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارهای حاوی نانوکپسول‌های حامل ثابت ماند و تغییری نکرد ($p > 0/05$) اما این شاخص در سایر تیمارها به صورت معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0/05$).

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارها

در شکل ۳ فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS نمونه‌های دوج نشان داده شده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای حاوی نانوکپسول‌های حامل به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد است ($p < 0/05$). فعالیت مهار رادیکال ABTS نمونه‌های دوج در تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد (P) در روز اول به ترتیب $29/73 \pm 1/11$ و $35/52 \pm 1/72$ واحد بر میلی‌لیتر بود، اما این مقادیر در تیمارهای حاوی ۲۰۰ و



شکل ۳: فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارها طی دوره نگهداری. حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی یک تیمار در روزهای مختلف و حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین فعالیت آنتی-اکسیدانی تیمارهای مختلف در یک روز است ($p < 0/05$).

Figure 3: ABTS free radical scavenging activity of the experimental treatments during the storage period (Unit/ml). Different capital letters indicate a significant difference between the antioxidant activity of the same treatment on different days, and different lowercase letters indicate a significant difference between the antioxidant activity of different treatments on the same day ($p < 0.05$).

۶۰ فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($p > 0/05$). امتیاز مزه تیمار حاوی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل در روز ۶۰ نسبت به روز اول کمتر شد ($p < 0/05$) که این مورد بر پذیرش کلی هم مؤثر بود ($p < 0/05$). تیمار حاوی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل تنها تیماری بود که در روز اول و ۶۰ نگهداری، امتیازات برابری از نظر شاخص‌های مورد بررسی کسب کرد ($p > 0/05$).

ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق

در جدول ۶ امتیازهای تیم ارزیاب در خصوص شاخص‌های حسی تیمارهای تحقیق ارائه شده است. تمامی تیمارهای تحقیق و شاهد از نظر رنگ، بو و مزه در روز اول نگهداری امتیازهای یکسان ($p > 0/05$) و مناسبی دریافت کردند. با گذشت زمان (۶۰ روز)، امتیازات حسی شاهد و دو تیمار حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال به صورت معنی‌داری کاهش یافتند ($p < 0/05$). ضمن این‌که امتیازات و پذیرش کلی دو تیمار مذکور در روز

جدول ۶: امتیازات حسی رنگ، بو و مزه تیمارهای تحقیق در روز اول و ۶۰ نگهداری

Table 6: Sensory scores for color, odor, and taste of the experimental treatments at day 1 and day 60 of storage

Treatments	Time (day)	Color	Aroma	Taste	General acceptance
Control	1	7.49±0.53 ^a	7.11±0.25 ^a	7.36±0.21 ^a	7.27±0.38 ^a
	60	3.67±0.71 ^c	4.26±0.74 ^c	2.15±0.65 ^d	3.34±0.54 ^d
Doogh containing 400 µg/ml peptides	1	7.66±0.35 ^a	7.16±0.18 ^a	7.41±0.23 ^a	7.39±0.29 ^a
	60	5.98±0.43 ^b	6.15±0.23 ^b	5.39±0.42 ^c	5.85±0.35 ^c
Doogh containing 500 µg/ml peptides	1	7.58±0.47 ^a	7.21±0.22 ^a	7.36±0.16 ^a	7.36±0.61 ^a
	60	5.87±0.29 ^b	6.18±0.15 ^b	5.37±0.38 ^c	5.82±0.22 ^c
Doogh containing 200 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	1	7.63±0.2 ^a	7.12±0.38 ^a	7.38±0.25 ^a	7.31±0.23 ^a
	60	7.61±0.22 ^a	7.15±0.36 ^a	6.17±0.11 ^b	6.84±0.07 ^b
Doogh containing 400 µg/ml nanocapsules carrying Peptides	1	7.62±0.24 ^a	7.17±0.64 ^a	7.37±0.19 ^a	7.39±0.35 ^a
	60	7.65±0.28 ^a	7.13±0.15 ^a	7.39±0.17 ^a	7.4±0.16 ^a

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

Different letters in each column, indicate significant differences between the data ($p < 0.05$).

بحث

میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال رسید. این میزان در تیمارهای حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل به‌ترتیب $3/23 \pm 0/11$ و $1/0 \pm 94/08$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر ثبت گردید.

روند کاهشی تعداد باکتری‌های مورد مطالعه در تیمارها نسبت به شاهد در روز اول نشان‌دهنده قابلیت پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آنها به منظور مقابله با رشد و تکثیر باکتری‌هاست. در پژوهشی که اثر افزودن پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های میکروبی دوغ ارزیابی شد، پپتیدهای زیست‌فعال (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) در غلظت‌های ۱۲/۲، ۲۴/۴ و ۴۸/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانستند تا حد قابل قبولی از رشد و تکثیر باکتری‌های *E. coli* و *S. aureus* طی ۶۰ روز نگهداری محصول جلوگیری کنند. در واقع، شمارش باکتری‌های مذکور در تیمارهای حاوی پپتیدهای زیست‌فعال نسبت به شاهد کمتر بود (Karimi et al., 2022) که این یافته با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. در بسیاری از تحقیقات دیگر هم خاصیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آبزیان و ضایعات آنها تأیید شد. نتایج پژوهش Sila و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که پپتیدهای

بر اساس نتایج، به صورت خلاصه می‌توان ادعا کرد که پپتیدهای آزاد تولیدی در تحقیق حاضر به‌خصوص نانوکپسول‌های حامل آنها توانایی بالایی به منظور حفظ شاخص‌های کیفی دوغ طی دوره نگهداری در دمای یخچال ارائه کردند. یافته‌های شمارش *S. aureus* در فرمولاسیون تیمارهای دوغ نشان داد که میزان این باکتری در روز اول در شاهد $5/79 \pm 0/15$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر بود که با اضافه‌کردن پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل از تعداد باکتری‌های مذکور به صورت معنی‌داری کاسته شد و به‌ترتیب به $3/26 \pm 0/08$ و $2/25 \pm 0/12$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر در تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال رسید. این میزان در تیمارهای حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل به‌ترتیب $2/24 \pm 0/09$ و $1/11 \pm 0/06$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر ثبت شد. میزان *E. coli* در روز اول در شاهد $5/94 \pm 0/18$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر بود که مانند *S. aureus* با افزودن پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل از تعداد آن به صورت معنی‌داری کاسته شد و به‌ترتیب به $4/42 \pm 0/09$ و $3/21 \pm 0/17$ لگاریتم کلونی بر میلی‌لیتر در تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰

مورد مطالعه ارائه کردند. ۳) نتیجه‌ای که پتانسیل بیشتر نانوکپسول‌های حامل نسبت به پپتیدهای آزاد را برای مهار رشد باکتری‌ها ثابت می‌کند که تیمارهای حاوی ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل بر خلاف تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد، در روز ۲۰ و بعد از آن فاقد باکتری‌های *S. aureus* و *E. coli* بودند. دلیل این مورد به رهش تدریجی هسته از پوشش‌ها در سیستم‌های ریزپوشانی شده برمی‌گردد که اصل و توجیه مهمی در استفاده از تکنیک ریزپوشانی است (Zabot et al., 2022). این یافته به پایداری و حفظ خصوصیات نانوکپسول‌ها طی زمان نگهداری نیز اشاره دارد. افزایش فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال با انجام عمل نانوکپسولاسیون می‌تواند مربوط به افزایش سطح تماس پپتیدهای ضد میکروبی و باکتری‌ها باشد. همچنین پایداری فعالیت ضد باکتریایی نانوکپسول‌ها احتمالاً بدین صورت قابل توجیه است که پوشش ترکیبی مورد استفاده (مالتودکسترین-صمغ عربی) توانسته از ساختار هسته (پپتیدهای زیست‌فعال) در برابر شرایط محیطی از جمله دمای یخچال، رطوبت و ... محافظت و خواص آن را حفظ و به رهش تدریجی آن کمک کند. در تحقیقی ثابت شد که نانوکپسولاسیون رنگدانه فیکوسیانین استخراج‌شده از میکروجلبک *Spirulina plantensis* با استفاده از پوشش‌های مالتودکسترین و کازئینات سدیم می‌تواند فعالیت ضد باکتریایی رنگدانه را تقویت و به پایداری این خاصیت (در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال) کمک کند (Safari et al., 2022). در مقابل، در تحقیق Yeganeh و Reyhani Poul (۲۰۲۲) که پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو در قالب نانولیپوزوم ریزپوشانی شدند، مشخص شد که فعالیت مهار رشد باکتری‌های *S. aureus*، *B. cereus* و *E. coli* در پپتیدهای زیست‌فعال آزاد و نانولیپوزوم‌های حامل اختلاف معنی‌داری ندارند.

در پژوهش حاضر، تعداد *E. coli* در نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری بیشتر از *S. aureus* بود تا جایی که در تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد در روز ۴۰ هم *E. coli* (به‌ترتیب

هیدرولیزشده حاصل از عضله ماهی *Barbus callensis* دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *Bacillus*، *Listeria monocytogenes*، *S. aureus*، *Enterococcus faecalis*، *subtilis* و *Micrococcus luteus* و گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa*، *E. coli*، *Salmonella enterica* و *Klebsiella pneumonia* بودند. در تحقیق Reyhani Poul و Yeganeh (۲۰۲۲) پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو و نانولیپوزوم‌های حامل آنها توانایی مهار رشد باکتری‌های *S. aureus*، *Bacillus cereus* و *E. coli* را بروز دادند. خصوصیت مشترک غالب پپتیدهای ضد باکتریایی داشتن ساختمان دوم آلفاهلیکس است که این ساختمان احتمالاً به دلیل قرارگیری در کانال یونی غشاء باکتری و تغییر نفوذپذیری این ساختار می‌تواند سلول را نابود کند (Yaghoubzadeh et al., 2019). به طور کلی و خلاصه، احتمالاتی که در زمینه مکانیسم ضد باکتریایی پروتئین‌های هیدرولیزشده (پپتیدهای زیست‌فعال) مطرح است: الف) پپتیدها به غشاء سلول‌های باکتری متصل می‌شوند و منافذ غیر قابل برگشتی در سطح غشاء ایجاد می‌کنند که در نتیجه سیتوپلاسم به خارج از سلول جریان می‌یابد و سلول کاملاً تخریب می‌شود. ب) پپتیدها از غشاء سلولی عبور می‌کنند و با اندامک‌های درون سلولی مانند ریبوزوم و ژنوم باند می‌شوند و در روند رشد طبیعی سلول اختلال ایجاد می‌کنند (Amissah, 2012).

مطابق یافته‌های پژوهش حاضر، نانوکپسول‌های حامل نسبت به پپتیدهای آزاد در فرمولاسیون دوغ توانایی بیشتری برای مقابله با باکتری‌های مورد مطالعه ارائه کردند. چندین یافته در تحقیق حاضر این نتیجه را تأیید می‌کنند: ۱) همواره تعداد *S. aureus* و *E. coli* طی دوره نگهداری در تیمارهای حاوی نانوکپسول‌های حامل کمتر از تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد بودند. ۲) برابری شمارش *S. aureus* و *E. coli* در دو تیمار حاوی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل بود. بدین معنا که نانوکپسول‌های حامل در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کارایی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد را در زمینه مهار رشد باکتری‌های

۳/۰±۵۶/۰۵، ۴/۰±۷۴/۰۴ و ۴/۷۵±۰/۰۹ ثبت شد. این مقادیر برای اسیدیته به ترتیب ۰/۶۷±۰/۰۲، ۰/۶۸±۰/۰۱ و ۰/۳۶±۰/۰۷ و ۰/۳۷±۰/۰۳ درصد بر حسب اسیدلاکتیک اندازه گیری گردید.

در پژوهش حاضر، نمونه های حاوی پپتیدهای آزاد و نانوکپسول های حامل آنها، دارای قابلیت مهار رادیکال آزاد ABTS و فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. در تحقیقی که از پپتیدهای زیست فعال (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست (با سه غلظت ۱۲/۲، ۲۴/۴ و ۴۸/۸ میلی گرم بر میلی گرم) در فرمولاسیون دوغ استفاده و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارها بررسی گردید، فعالیت آنتی اکسیدانی مطلوب نمونه های دوغ گزارش شد (Karimi et al., 2022). در تحقیقات مختلفی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال (Reyhani Poul et al., 2018; Poul, 2022) و نانوکپسول های حامل آنها (Yaghoubzadeh et al., 2019; Hasani et al., 2019; Yeganeh and Reyhani, 2022) تأیید شده است.

در تحقیق حاضر، تیمارهای حاوی نانوکپسول های حامل نسبت به تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد قابلیت بیشتری برای مهار رادیکال آزاد ABTS ارائه کردند، ضمن این که این قابلیت در تیمارهای مذکور طی دوره نگهداری ثابت ماند، اما در تیمارهای حاوی پپتیدهای آزاد به صورت قابل توجهی کمتر شد. این یافته نشان می دهد که انجام فرایند نانوکپسولاسیون پپتیدهای زیست فعال با روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی، علاوه بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال، به پایداری این فعالیت در طول ۶۰ روز نگهداری محصول در دمای یخچال نیز منجر شد. در پژوهش Reyhani Poul و Yeganeh (۲۰۲۳) که رنگدانه آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک *Haematococcus pluvialis* با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازینات سدیم نانوریزپوشانی گردید، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و پایداری این فعالیت (در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال) در رنگدانه گزارش گردید. طی پژوهشی که کازئین با استفاده از آنزیم های آلكالاز و پانکراتین هیدرولیز

۱/۰±۸۱/۱۹ و ۱/۱۲±۰/۰۱ لگاریتم کلونی بر میلی لیتر) مشاهده شد. این یافته در کنار مقادیر MIC و MBC پپتیدهای آزاد و نانوکپسول های حامل برای دو باکتری مذکور ثابت می کند که حساسیت *S. aureus* که یک باکتری گرم مثبت است. در مقابل پپتیدهای آزاد و نانوکپسول های حامل آنها بیشتر از *E. coli* است. این مورد در تحقیقات Mahdaviyekta و همکاران (۲۰۱۹)، Safari و همکاران (۲۰۲۲) و Reyhani Poul و Yeganeh (۲۰۲۳) نیز ثابت شد. این حساسیت بالاتر مربوط به فقدان لایه لیپوپلی ساکاریدی در دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت است. لایه لیپوپلی ساکاریدی در دیواره باکتری های گرم منفی تا حد قابل توجهی می تواند از ورود پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسول های حامل آنها به سلول جلوگیری و اثرات تخریب کننده آنها را خنثی کند (Yaghoubzadeh et al., 2019).

نتایج ارزیابی شاخص های pH و اسیدیته تیمارها طی ۶۰ روز نگهداری تیمارهای دوغ در دمای یخچال نشان داد که فقط در دو تیمار حاوی نانوکپسول های حامل، این شاخص ها ثابت ماندند و در سایر تیمارها روند کاهشی (pH) و افزایشی (اسیدیته) داشتند. در سایر تحقیقات مشابه که پیرامون افزودن پپتیدهای زیست فعال به دوغ (Karimi et al., 2022) و ماست (Raftani Amiri et al., 2015) انجام شدند، نتایج مشابهی ثبت گردید. یافته های این بخش حاکی از قدرت بیشتر نانوکپسول های حامل نسبت به پپتیدهای آزاد به منظور ثابت نگهداشتن pH و اسیدیته محصول طی دوره نگهداری است (حفظ خصوصیات کیفی). به عبارت دیگر، انجام فرایند نانوکپسولاسیون با روش خشک کردن انجمادی و پوشش های مالتودکسترین-صمغ عربی به افزایش پتانسیل پپتیدهای زیست فعال به منظور نگهداری مواد غذایی کمک قابل توجهی می کند. یافته بعدی در این بخش مربوط به عدم تغییر مقادیر pH و اسیدیته نمونه های دوغ با افزایش غلظت پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسول های حامل آنها در طول دوره نگهداری بود. برای مثال، pH در تیمارهای حاوی ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پپتیدهای زیست فعال و ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نانوکپسول های حامل در روز ۶۰، به ترتیب ۳/۵۵±۰/۰۱

فلاورزایم) با درصدهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ به فرمولاسیون ماست کم چرب موجب ارتقاء شاخص‌های بو، مزه و بافت محصول شد اما تأثیر منفی بر رنگ داشت (Rezaei *et al.*, 2020). از این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که پپتیدهای زیست‌فعال تولیدی از فانوس‌ماهی به روش آنزیمی (protamax) با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون، پتانسیل قابل‌توجهی به منظور حفظ خصوصیات کیفی (ویژگی‌های میکروبی، شیمیایی و حسی) دوغ طی دوره نگهداری در دمای یخچال دارند که این پتانسیل با نانوکپسولاسیون پپتیدها به صورت قابل‌توجهی ارتقاء می‌یابد. همچنین قابلیت و نقش مؤثر روش خشک‌کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی برای انجام فرایند نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال در این ارتقاء تأیید شد. بنابراین، می‌توان از پپتیدهای مذکور و نانوکپسول‌های حامل آنها در صنعت لبنیات (به‌ویژه دوغ) به عنوان یک نگهدارنده با کارایی مطلوب استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۴-۰۳ انجام شد که بدین‌وسیله صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abd Rashid, N.Y., Manan, M.A., Pa'ee, K.F., Saari, N. and Wong, F.W.F., 2022. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fish protein hydrolysate produced from Malaysian fish sausage (Keropok Lekor) by-products by indigenous *Lactobacillus casei* fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 347:131-147. DOI:10.1016/j.jclepro.2022.131303.

پودرهای حاصل با پوشش ترکیبی مالتودکسترین و صمغ عربی ریزپوشانی شدند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوکپسول‌ها در مقایسه با هیدرولیزشده‌ها نه‌تنها بیشتر نشد بلکه کاهش یافت که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضر مغایرت دارد (Akbarbaglu *et al.*, 2021).

شاخص‌های حسی از جمله رنگ، بافت، بو و مزه یک محصول تحت تأثیر فعالیت‌های میکروبی و شیمیایی طی دوره نگهداری تغییر می‌کنند. نتایج ارزیابی حسی تیمارهای تحقیق نشان داد که فقط تیمار حاوی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل در طول دوره نگهداری (روز اول و ۶۰) امتیازات و پذیرش کلی برابری کسب کرد. البته تیمار حاوی ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوکپسول‌های حامل نیز در دو شاخص رنگ و بو در روز اول و ۶۰ حائز امتیازات برابری شد، اما امتیاز شاخص مزه در این تیمار در روز ۶۰ نسبت به روز اول کاهش یافت. این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت فرایند نانوکپسولاسیون پپتیدهای زیست‌فعال در حفظ شاخص‌های حسی نمونه‌های دوغ در طول دوره نگهداری می‌باشد. بدین معنا که نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال در محصول نسبت به پپتیدهای آزاد، قابلیت بیشتری برای کنترل واکنش‌ها و فعالیت‌های میکروبی و شیمیایی دارند که نتیجه این کنترل، حفظ خصوصیات حسی و کیفی است. نتیجه بررسی شاخص‌های حسی تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد در روز اول نشان داد که اضافه‌کردن پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آنها به فرمولاسیون دوغ، تأثیر معنی‌داری (مثبت و منفی) بر رنگ، بو و مزه محصول نداشت. در پژوهشی که پروتئین هیدرولیزشده بافت ماهی مرکب خلیج فارس با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پروتامکس با درصدهای ۰/۵، ۱ و ۱/۵ به فرمولاسیون ماست کم‌چرب اضافه شد، نتایج ارزیابی حسی محصول نشان داد که تیمارهای مربوط به پروتئین هیدرولیزشده با آلکالاز به‌خصوص در غلظت‌های بالاتر، خواص حسی از جمله بو و مزه ماست کم‌چرب را بهبود بخشید، ولی این تغییرات در بافت و رنگ ماست چندان مشهود نبود (Raftani Amiri *et al.*, 2015). در تحقیق دیگری، افزودن پروتئین هیدرولیزشده گاو ماهی دریای خزر (*Neogobius caspius*) (تولیدی با آنزیم

- Ahmadi, S.M., Moslehi Shad, M. and Rahimi, A., 2018.** Investigation of antimicrobial activity of oleoresin essential oil on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces marxianus* and *Penicillium notatum* and its effect on Iranian doogh shelf life. *Journal of Food Science and Technology*, 15(85):114-124.
- Akbarbaglu, Z., Kamali, S. A., Sarabandi, K. and Sadeghi, M.A., 2021.** Effect of maltodextrin and gum Arabic carriers on the physicochemical properties and antioxidant activity of spraydried casein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 107(17):131-145. DOI: 11.17.10. Fscst/10.29252
- Amissah, J., 2012.** Bioactive Properties of Salmon Skin Protein Hydrolysates (Doctoral dissertation, McGill University Libraries).
- AOAC, 2005.** Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Ayrapetyan, O.N., Obluchinskaya, E.D., Zhurishkina, E.V., Skorik, Y.A., Lebedev, D.V., Kulminskaya, A.A. and Lapina, I.M., 2021.** Antibacterial properties of fucoidans from the brown algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology*, 10(1):67-82. DOI:10.3390/biology10010067
- Baco, N., Oslan, S.N.H., Shapawi, R., Mohhtar, R.A.M., Noordin, W.N.M. and Huda, N., 2022.** Antibacterial activity of functional bioactive peptides derived from fish protein hydrolysate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 967(1):012019.
- Berraquero-García, C., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., Guadix, E.M. and García-Moreno, P.J., 2023.** Encapsulation of bioactive peptides by spray-drying and electrospraying. *Foods*, 12(10):20-35. DOI:10.3390/foods12102005
- Du, J., Xiao, M., Sudo, N. and Liu, Q., 2024.** Bioactive peptides of marine organisms: Roles in the reduction and control of cardiovascular diseases. *Food Science and Nutrition*. 12(8):5271-5284. DOI:10.1002/fsn3.4183
- Gharekhan Taghar Tapeh, R., Kordjazi, M., Ahmad Nasrollahi, S., Shabanpour, B. and 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.
- Hasani, S., Shahidi, M. and Ojagh, S.M., 2019.** The production and evaluation of nanoliposomes containing bioactive peptides derived from fish wastes using the alkalase enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(1):31-44. DOI:10.22101/jrifst.2019.04.30.813
- He, Z., Liu, G., Qiao, Z., Cao, Y. and Song, M., 2021.** Novel Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides isolated from rice wine lees: Purification, characterization, and structure-activity relationship. *Frontiers in Nutrition*, 8(1):61-74. DOI:10.3389/fnut.2021.746113

- Hoyle, N.T. and Merritt, J. H., 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
- Husni, A., Izmi, N., Ayunani, F.Z., Kartini, A., Husnayain, N. and Isnansetyo, A., 2022. Characteristics and antioxidant activity of fucoidan from *Sargassum hystrix*: Effect of extraction method. *International Journal of Food Science*, 2022(1):45-60. DOI:10.1155/2022/3689724
- Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S. and Eyvazzadeh, O., 2022. Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, 18(2):249-263. DOI:10.22067/IFSTRJ.2021.70916.1059
- Kazemi, M., Ojagh, S.M., Abdollahi, M. and Alishahi, A., 2024. Extraction optimization of gel-forming proteins and collagen hydrolysate from whole lanternfish (*Benthoosema pterotum*) with a biorefinery approach. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 13(2):157-175. DOI:10.22069/japu.2024.22197.1854
- Librizzi, M., Martino, C., Mauro, M., Abruscato, G., Arizza, V., Vazzana, M. and Luparello, C., 2023. Natural anticancer peptides from marine animal species: evidence from in vitro cell model systems. *Cancers*, 16(1):36-49. DOI:10.3390/cancers16010036
- Lin, Q., Guo, Y., Li, J., He, S., Chen, Y. and Jin, H., 2023. Antidiabetic effect of collagen peptides from *Harpadon nehereus* bones in streptozotocin-induced diabetes mice by regulating oxidative stress and glucose metabolism. *Marine Drugs*, 21(10):51-67. DOI:10.3390/md21100518
- Mahdavi, Y.M., Nouri, L. and Azizi, M.H., 2019. Antimicrobial activity of active peptide extracted from quinoa on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Science and Technology*, 91(16):315-322.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2):231-237. DOI:10.1016/j.foodchem.2003.05.007
- Ng, W.J., Wong, F.C., Abd Manan, F., Chow, Y.L., Ooi, A.L., Ong, M.K. and Chai, T.T., 2024. Antioxidant peptides and protein hydrolysates from tilapia: cellular and in vivo evidences for human health benefits. *Foods*, 13(18):2945. DOI:10.3390/foods13182945
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1):238-242. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.12.013
- Raftani Amiri, Z., Safari, R. and Bakhshandeh, T., 2015. Effect of squid

- protein hydrolysate (*Sepia pharaonis*) on quality properties of low-fat set style yoghurt. *Journal of Food Science and Technology*, 13(56):11-22.
- Rao, P.S., Bajaj, R.K., Mann, B., Arora, S. and Tomar, S.K., 2016.** Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum Arabic blend. *Journal of Food Science and Technology*, 53:3834-3843.
DOI:10.1007/s13197-016-2376-8
- Reyhani Poul, S., Jafapour, S.A. and Safari, R., 2018.** Evaluation of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application of protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(1) 162-176. DOI:10.22067/ifstrj.v1395i0.53714
- Reyhani Poul, S. and Yeganeh, S., 2023.** Nanoencapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using maltodextrin-sodium caseinate coating and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the carrier nanocapsules. *Journal of Food Science and Technology*, 20(140):52-65.
DOI:10.22034/FSCT.20.140.52
- Reyhani Poul, S., Yeganeh, S. and Raftani Amiri, Z., 2024.** Effect of using astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* as free form and as a carrier nanocapsules in formulation of tomato paste and evaluating microbial and qualitative characteristics of the product during storage at refrigerator. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 20(1):101-117.
DOI:10.22067/ifstrj.2022.79065.1210
- Rezaei, R., Yeganeh, S., Raftani Amiri, Z. and Safari, R., 2020.** A survey on functional properties of protein hydrolysate from Hyrcanian goby (*Neogobius caspius*) by application of flavourzyme enzyme and its effect on quality of low-fat yogurt. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 12(3):21-36. DOI:10.30495/jfst.2020.674131
- Rivera-Pérez, C., Ponce González, X.P. and Hernández-Savedra, N.Y., 2023.** Antimicrobial and anticarcinogenic activity of bioactive peptides derived from abalone viscera (*Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata*). *Scientific Reports*, 13(1):15185.
DOI:10.1038/s41598-023-41491-w
- Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S. and Esmaeilzadeh Kenari, R., 2022.** Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial properties of phycocyanin extracted from spirulina algae (*Spirulina platensis*) in both pure and nanoencapsulated forms with maltodextrin-sodium caseinate combination coating. *Journal of Food Science and Technology*, 19(127):345-358.
DOI:10.1001.1.20088787.1401.19.127.13.6
- Sánchez, A. and Vázquez, A., 2017.** Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1):29-46.
DOI:10.1093/fqsafe/fyx006
- Santos, V.P., Marques, N.S., Maia, P.C., Lima, M.A. B.D., Franco, L.D.O. and Campos-Takaki, G.M.D., 2020.** Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their

- applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12):42-56.
DOI:10.3390/ijms21124290
- Sarabandi, K., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S. and Mohammadi, A., 2019.** Application of gum arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140:59-68.
DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.133
- Sarabandi, K., Gharehbeiglou, P. and Jafari, S.M., 2020.** Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. *Drying Technology*, 38(5-6):577-595.
DOI:10.1080/07373937.2019.1689399
- Sarada, R., Pillai, M.G. and Ravishankar, G.A., 1999.** Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8):795-801.
DOI:10.1016/S0032-9592(98)00153-8
- 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
- Shaviklo, A. and Moradi, Y., 2019.** Supplying nutritional needs of livestock and humans from lanternfishes. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28 (4):89-102.
- Shaviklo, A. 2020.** A comprehensive review on animal feed, human food and industrial application of lanternfishes; from prototypes to products. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(11):827-843.
DOI:10.4194/1303-2712-v20_11_06
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M. and Bougatef, A., 2014.** Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1):183-188.
DOI:10.1016/j.lwt.2013.07.021
- Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A.G.A. and Salama, A., 2008.** Original Research Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 8: 27-36.
- Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B. and Guardiola, F.A., 2020.** Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Reviews in Aquaculture*, 12(1):224-253.
DOI:10.1111/raq.12314
- Wang, J., Wang, Y.M., Li, L.Y., Chi, C.F. and Wang, B., 2022.** Twelve antioxidant peptides from protein hydrolysate of Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) roe prepared by flavourzyme: Purification, sequence identification, and activity evaluation. *Frontiers in Nutrition*, 8(6):81-94. DOI:10.3389/fnut.2021.813780
- Yaghoubzadeh, Z., Kaboosi, H., Peyravii Ghadikolaii, F., Safari, R. and Fattahi, E.,**

2019. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28(2):117-128.

DOI:10.22092/isfj.2019.119049

Yan, M., Liu, B., Jiao, X. and Qin, S., 2014. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1):89-97.

DOI:10.1016/j.fbp.2013.07.008

Yeganeh, S. and Reyahni Poul, S., 2022. 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. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 30(6):83-95.

DOI:10.22092/isfj.2022.126070

Zabot, G.L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H. and Olivera-Montenegro, L., 2022. Encapsulation of bioactive compounds for food and agricultural applications. *Polymers*, 14(19):41-55.

DOI:10.3390/polym14194194