مقاله علمی – پژوهشی:

نانو ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافت آنزیمی ضایعات میگو با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم–کیتوزان و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشار خونی محصول

سکینه یگانه*[۱]، سهیل ریحانی‌پول[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 دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی خواص مختلف پپتیدهای زیست‌فعال (با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون) نانوریزپوشانی‌شده با پوشش ترکیبی نانولیپوزوم و کیتوزان بود. به همین جهت، ضایعات مراکز فراوری و بسته‌بندی میگو با استفاده از آنزیم نئوتراز آبکافت و خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشار خونی محصول در قالب پنج تیمار شامل P (پپتیدهای آزاد)، NP (نانولیپوزوم‌های حامل پپتید)، NP-CH-0.05 (نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با پوشش ۰/۰۵ درصد کیتوزان)، NP-CH-0.01 (نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با پوشش ۰/۱ درصد کیتوزان) و NP-CH-0.5 (نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان) ارزیابی شد. نتایج نشان داد، همه تیمارهای تحقیق تا حد مشخصی خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشار خونی دارند. تیمارهای P و NP در هر سه خاصیت، مقادیر تقریباً برابری ارائه کردند و خواص آنها اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). تیمارهای دارای پوشش کیتوزان به صورت معنی‌داری نسبت به تیمارهای P و NP خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی 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 معنی‌داری افزایش یافتند ($p<0/05$). در بین تیمارهای تحقیق، بیشترین فعالیت مهار رشد باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (به‌ترتیب ۴۵/۸۹±۰/۹۶، ۳۴/۸۲±۰/۷۵ و ۴۹/۱±۶۷/۴۵ درصد)، بالاترین نرخ مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید (به‌ترتیب ۶۳/۲±۵۲/۸۶، ۷۳/۰±۹۱/۲۹ و ۸۹/۰۶±۲/۱۱ درصد) و موثرترین خاصیت ضد فشار خونی (۳۷/۹۱±۱/۲۹ درصد) نیز مربوط به تیمار NP-CH-0.5 بود.

لغات کلیدی: ضایعات میگو، پپتیدهای زیست‌فعال، نانولیپوزوم، خواص ضد باکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

*نویسنده مسئول

مقدمه

مراکز فراوری و بسته‌بندی میگو (که اخیراً در برخی از شهرهای شمالی و جنوبی احداث شده‌اند)، در کشور روزانه مقادیر زیادی ضایعات تولید می‌کنند که غالب این مواد به موادی تبدیل می‌شوند که ارزش افزوده آنها به‌مراتب کمتر از فراورده‌های نوینی مانند پپتیدهای زیست‌فعال (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۷) و بیوسیلاژ (صفری و همکاران، ۱۳۹۹) است. نگارندگان پژوهش حاضر، با بررسی مراکز فراوری میگو مشخص کردند که قریب به ۴۰ درصد وزن کل میگو هنگام فراوری و بسته‌بندی دورریز می‌شود. بر اساس نتایج پیش‌تست مشخص شد، این ضایعات ۱۸-۱۴ درصد پروتئین دارند. این پروتئین از طریق آبکافت قابل بازیابی و تبدیل به پپتیدهای زیست‌فعال است. پپتیدهای زیست‌فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که در ساختار پروتئین اصلی غیر فعال می‌باشند (Sarmadi and Ismail, 2010). این پپتیدها ۲۰-۲ اسیدآمینه و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون دارند (Park *et al.*, 2001). پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر کارائی در صنایع غذایی، به عنوان امولسیفایر، کف‌زا و آنتی‌اکسیدان (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۷)، پس از مصرف انسانی، اثرات فیزیولوژیک خاصی (تنظیم‌کنندگی فشار خون، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، کاهندگی کلسترول و اثرات ضد میکروبی) بر بدن اعمال می‌کنند (Sun *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2010). این پپتیدها جهت اعمال این خواص (اثرات فیزیولوژیک) باید در جریان هضم و جذب (معده و روده) سالم و فعال باقی بمانند (Segura-Campos *et al.*, 2011). ازآنجایی‌که ممکن است این پپتیدها در شرایط اسیدی و آنزیمی (آنزیم‌های پروتئولیتیک) دستگاه گوارش دناتوره و تجزیه شوند، استفاده از روش‌هایی جهت حفاظت از این پپتیدها ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین جهت حفظ و افزایش خواص نگهدارندگی (ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی) پپتیدهای زیست‌فعال در مواد غذایی، لازم است تکنیک‌های حفاظتی مقتضی به‌کار گرفته شود. زیرا هر ماده غذایی شرایط تولید و نگهداری خاصی دارد و ممکن است پپتیدهای زیست‌فعالی که جهت افزایش ماندگاری آن ماده غذایی در فرمول استفاده شده باشد که دچار تغییرات نامطلوبی شوند. در چنین مواردی شاید بهترین روش، درون‌پوشانی پپتیدهای زیست‌فعال باشد (حسنی و همکاران، ۱۳۹۸؛ صادقیان امین و همکاران، ۱۳۹۹؛ اجاق و همکاران، ۱۴۰۰). طی این فرایند کپسولی اطراف پپتیدها ایجاد می‌شود که این ترکیبات فعال را در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفاظت می‌کند. ضمن اینکه کپسول‌های تشکیل‌شده اطراف پپتید در این تکنیک، محتویات خود را با سرعت کنترل‌شده و شرایط ویژه رها می‌کنند. یکی از انواع این کپسول‌ها، لیپوزوم‌ها هستند. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلوئیدی می‌باشند که از لیپیدهای قطبی به‌ویژه فسفولیپیدها تشکیل شده‌اند و در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای ایجاد می‌کنند (Ghorbanzadeh *et al.*, 2017). لیپوزوم‌ها دارای دم آب‌گریز و ناحیه سر آب‌دوست هستند. هنگامی که دو غشاء منفرد به‌هم نزدیک می‌شوند، دم‌های آب‌گریز به یکدیگر جذب می‌شوند درحالی‌که سر آب‌دوست هر دو غشاء به سمت آب قرار می‌گیرند. این فرایند، لایه مضاعف یا دوتایی کروی از مولکول‌های فسفولیپید را تشکیل می‌دهد. این کره فسفولیپیدی می‌تواند محلول‌های آبی را درون خود نگه‌دارد و حمل کند. لیپوزوم‌ها خاصیت آمفیفیلیک (دوگانه‌دوستی) دارند. لذا، قادر به کپسوله‌کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل هستند (حسنی و همکاران، ۱۳۹۸). این خاصیت موجب می‌شود تا لیپوزوم‌ها بتوانند هر دو اسیدهای آمینه‌های قطبی و غیرقطبی موجود در پپتیدهای زیست‌فعال را کپسوله کنند (صادقیان امین و همکاران، ۱۳۹۹). نانولیپوزوم‌ها همان لیپوزوم‌هایی با اندازه کوچکتر هستند که از نظر ساختاری و شیمیایی با لیپوزوم‌ها یکسان هستند. در صنایع غذایی از نانولیپوزوم‌ها جهت حفاظت از ترکیبات مختلف مانند نگهدارنده‌های ضد میکروبی و قارچی و پپتیدهای زیست‌فعال نیز استفاده می‌شود (Rasti *et al.*, 2012).

مطابق نتایج پژوهش‌های Page و Cudmor (۲۰۰۱) لیپوزوم و نانولیپوزوم که در واقع، کپسول‌هایی بر پایه لیپید هستند، در محیط دستگاه گوارش به‌وسیله

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 (تحویل 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 آمونیوم‌تیوسانات، فروزکلرید، آلفاتوکوفرول، لینولئیک‌اسید، کاپتوپریل، تری‌کلرواستیک‌اسید، بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA)، EDTA (Ethylene diamine tetra acetic)، رادیکال‌های آزاد ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) و DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) نیز از همین شرکت تهیه شدند. ضایعات میگو از یکی از کارگاه‌های فراوری و بسته‌بندی این آبزی 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 *Staphylococcus aureus* استفاده شد که از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شدند. محیط کشت‌های آگار مغذی[1] و آبگوشت مغذی[2] 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 زمآنها، 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 g ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد (Guerard *et al*., 2002; Ovissipour *et al*., 2010). نتیجه این فرایند تولید پروتئین‌های آبکافتی با درجه آبکافت ۱/۳۵±۲۳/۶۸ 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.

[1] Nutrient agar
[2] Nutrient broth

تهیه نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش کیتوزان

ازآنجایی‌که 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 (Millipore ،EMD ،Merck KGaA ،Darmstadt، ساخت آلمان) عبور داده شدند. سپس این پپتیدها با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و فسفولیپید/کلسترول در آب مقطر حل شدند. این محلول پس از اختلاط با گلیسرول تا دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حرارات 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 هموژن 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 حل‌کردن 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	نانولیپوزم حامل پپتید فاقد پوشش
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم حامل پپتید با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد
NP-CH-01	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*، *اشریشیاکلای* 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 ریزرقت 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):

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

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفینیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH): به منظور بررسی این شاخص، ابتدا نمونه‌ها با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر حل شدند. در مرحله بعد ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر 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 بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH(٪) = [جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد)] × ۱۰۰

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲- آزینو- بیس- ۳- اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک‌اسید (ABTS): به منظور اندازه‌گیری این خاصیت محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم‌پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. پس از سپری‌شدن این مدت، محلول تا رسیدن به میزان جذب ۰/۰±۷/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه ذیل و بر حسب درصد محاسبه شد (Alemán *et al.*, 2011). از بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید:

فعالیت مهار رادیکال ABTS (٪) = [جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد)] × ۱۰۰

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید: جهت بررسی این شاخص، ابتدا ۴۰۰ میلی‌گرم از نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مول (pH=۷)، ۱/۳ میلی‌لیتر لینولئیک‌اسید و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۵ درصد حل شد. سپس حجم این محلول با آب مقطر به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. این مخلوط در یک لوله آزمایش ۳۰ میلی‌لیتری ریخته (با درپوش پیچی) و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. شرایط اتاق تاریک با بسته‌بندی با فویل آلومینیوم و کاغذ ضخیم‌تر حفظ شد. درجه اکسیداسیون اسید لینولئیک با استفاده از روش تیوسیانات فریک اندازه‌گیری گردید (Mitsuda, 1966). به ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش، ۴/۷ میلی‌لیتر اتانول ۰/۷۵، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم تیوسانات ۳۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر فروزکلرید ۲۰ میلی‌مول 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 میلی‌مول (pH=۷) به عنوان شاهد و از آلفاتوکوفرول به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. از رابطه ذیل جهت محاسبه فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید استفاده گردید (Osawa and Namiki, 1985):

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید (٪) = ۱- (جذب شاهد/جذب نمونه) ×۱۰۰

خاصیت ضد فشار خونی محصول

فعالیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (ACE): به منظور بررسی این شاخص، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از ACE (۲۵ واحد بر میلی‌لیتر حل‌شده در ۵۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl) با ۲۰۰ میکرولیتر محصول (با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۵۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl) مخلوط و ترکیب حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 میلی‌لیتر به

ترکیب مذکور اضافه و پس انکوبه‌شدن 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 (۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. فعالیت مهار ACE بر حسب درصد از رابطه ذیل محاسبه شد (Hou *et al.*, 2003):

فعالیت مهار ACE (٪) = [جذب کنترل/(جذب نمونه-جذب کنترل)] × ۱۰۰

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>۰/۰۵). همچنین فعالیت مهار نانولیپوزوم‌های پوشش داده‌شده با کیتوزان به صورت معنی‌داری از تیمارهای P و NP بیشتر است (p<۰/۰۵). در این سه تیمار با افزایش میزان کیتوزان اطراف نانولیپوزوم‌ها، فعالیت مهار رشد روند افزایشی داشته است (p<۰/۰۵). بیشترین فعالیت مهار رشد باکتری‌های *اشریشیاکلای*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (به‌ترتیب ۴۵/۸۹±۰/۹۶، ۳۴/۸۲±۰/۷۵ و ۴۹/۱±۶۷/۴۵ درصد) مربوط به تیمار NP-CH-0.5 بود (p<۰/۰۵).

جدول ۲: فعالیت مهار رشد باکتری‌های شاخص مواد غذایی

Table 2: Growth inhibition activity of food index bacteria

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

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست (p<۰/۰۵).

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

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 ندارند (p>۰/۰۵). همان‌طوری‌که در جدول مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش نانولیپوزم‌ها، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارها به صورت معنی‌داری افزایش یافته است (p<۰/۰۵)؛ به گونه‌ای که این شاخص از ۲۹/۱۱ در تیمار NP-CH-0.05 به ۳۸/۸۵

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	نانولیپوزم فاقد پوشش	۲۱/۱±۰۸/۳۵^{e}
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۲۹/۰±۱۱/۹۲^{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 نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست (p<۰/۰۵).

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

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS: در جدول ۴ فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS تیمارهای تحقیق ارائه شده است. همان‌طوری‌که در جدول مشاهده می‌شود، این شاخص در تیمارهای دارای پوشش کیتوزان (NP-CH-0.05، NP-CH-0.1، NP-CH-0.5) به صورت معنی‌داری بیشتر از تیمارهای فاقد پوشش (P و NP) است (p<۰/۰۵). تیمارهای P و NP فعالیت مهار تقریباً برابری دارند (p>۰/۰۵). اما تیمارهای دارای پوشش کیتوزان به صورت معنی‌داری از نظر شاخص مذکور متفاوت هستند (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که با افزایش غلظت کیتوزان در تیمارها، فعالیت مهار افزایش یافته است. بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS (۷۳/۰±۹۱/۲۹ درصد) در تیمار NP-CH-0.5 ثبت شد که اختلاف معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول نداشت (p>۰/۰۵).

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	نانولیپوزم فاقد پوشش	۳۴/۱±۹۷/۱۶^{d}
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۴۰/۰±۳۱/۵۲^{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 نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست (p<۰/۰۵).

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

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید: در جدول ۵ فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید پپتیدهای آزاد و نانولیپوزوم‌های بارگذاری‌شده ارائه شده است. همان‌طوری‌که در جدول مشاهده می‌شود، با نانو ریزپوشانی پپتیدهای آزاد در قالب نانولیپوزوم (NP) تغییری در فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید آنها ثبت نشد (p>۰/۰۵). اما با اضافه‌کردن کیتوزان به نانولیپوزوم‌ها، فعالیت مهار آنها به صورت معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). همچنین در نانولیپوزوم‌های دارای پوشش، با افزایش غلظت کیتوزان، فعالیت مهار

پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید تیمارها به صورت معنی‌داری بیشتر شد، گرچه اختلاف بین تیمارهای NP-CH-0.05 و NP-CH-0.1 معنی‌دار نبود ($p>0/05$). در بین تیمارها، بیشترین میزان شاخص مورد بررسی (۸۹/۲±۰۶/۱۱ درصد) در NP-CH-0.5 ثبت شد ($p<0/05$).

جدول ۵: فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید تیمارهای تحقیق

Table 5: Linoleic acid peroxidation inhibition activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید (٪)
P	پپتید آزاد	۵۵/۱±۳۱/۲۷^{d}
NP	نانولیپوزم فاقد پوشش	۵۶/۲±۰۲/۴۹^{d}
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۶۸/۱±۳۳/۸۴^{c}
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	۶۸/۰±۹۲/۷۲^{c}
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	۸۹/۲±۰۶/۱۱^{b}
α-Tocopherol		۹۸/۰±۲۳/۲^{a}

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p<0/05$).

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

خواص ضد فشارخونی محصول

فعالیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱:

جدول ۶ فعالیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (خاصیت ضد فشار خونی) تیمارها را نشان می‌دهد. مطابق جدول، تیمارهای P و NP از نظر فعالیت مهار آنزیم اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>0/05$). همچنین تیمارهای NP-CH-0.05 و NP-CH-0.1 ($p>0/05$) به صورت معنی‌داری 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 تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (۳۷/۹۱±۱/۲۹ درصد) برخوردار بود ($p<0/05$).

جدول ۶: فعالیت مهار آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (ACE)

Table 6: ACE inhibition activity of research treatments

کد تیمار	تیمار	فعالیت مهار **ACE** (٪)
P	پپتید آزاد	۱۱/۱±۶۴/۰۳^{d}
NP	نانولیپوزم فاقد پوشش	۱۲/۲±۰۱/۳۶^{d}
NP-CH-0.05	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۰۵ درصد	۱۹/۰±۷۵/۴۲^{c}
NP-CH-0.1	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۱ درصد	۲۰/۱±۵۳/۱۷^{c}
NP-CH-0.5	نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد	۳۷/۱±۹۱/۲۹^{b}
Captopril		۶۱/۲±۴۲/۳۸^{a}

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌هاست ($p<0/05$).

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

بحث

یکی از خواص پپتیدهای زیست‌فعال، خواص ضد میکروبی آنهاست که در تحقیقات مختلف مورد ارزیابی و تائید قرار گرفته است (Di Bernardini *et al*., 2011؛ یعقوب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۸؛ ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۹). پژوهش حاضر نیز این خاصیت را در پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافت ضایعات میگو تائید کرد. همه تیمارهای تحقیق تا حد مشخصی دارای خاصیت مهار باکتری‌های شاخص مواد غذایی مورد بررسی (*اشریشیاکلای*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) بودند. با

نانوکپسوله‌کردن 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 تائید 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 احاطه‌کردن پپتیدهای زیست‌فعال با کپسولی از جنس نانولیپوزوم (تیمار NP) تاثیری 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 شد (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 تاکید کرده‌اند (Khantaphant *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

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

تکنیک انکپسوله‌کردن پپتیدهای زیست‌فعال 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 می‌کند. به همین جهت از این روش می‌توان جهت افزایش اثربخشی پپتیدهای زیست‌فعال به عنوان یک داروی طبیعی در درمان فشار خون بالا بهره برد. زیرا مهارکننده‌های سنتزی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین ۱ (مانند کاپتوپریل و آنالاپریل) عوارض جانبی مختلفی از جمله سرفه، تغییر حس چشایی، جوش و ادم پوستی ایجاد می‌کنند (Messerli, 1999) و نگرانی‌هایی در زمینه مصرف آنها وجود دارد.

پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافت آنزیمی ضایعات مراکز فراوری و بسته‌بندی میگو دارای خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشارخونی هستند. نانو ریزپوشانی این پپتیدها با پوشش نانولیپوزوم، تغییر معنی‌داری در خواص آنها ایجاد نمی‌کند. اما با افزودن کیتوزان به پوشش (پوشش ترکیبی نانولیپوزوم-کیتوزان)، خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضد فشارخونی پپتیدها به شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش ترکیبی، خواص مورد بررسی نیز شدت می‌گیرد. بنابراین، پوشش ترکیبی نانولیپوزوم-کیتوزان در تکنیک نانو ریزپوشانی، از قابلیت ارتقاء و بهبود خواص پپتیدهای زیست‌فعال برخوردار است.

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 بدین‌وسیله سپاسگزاری می‌شود.

منابع

اجاق، م.، حسنی، ش. و حسنی، م.، ۱۴۰۰. تأثیر فرایندهای انجماد-انجمادزدایی و خشک‌کردن انجمادی-رهیدراسیون بر پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال. 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 زیست‌فعال به دست‌آمده 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 آنتی‌اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز. 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان (*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 آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌های

بارگیری‌شده با پروتئین هیدرولیزشئه دانه کینوآ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱۵ (۲): ۸۲-۷۱

صفری، ر.، ریحانی پول، س.، بانکه‌ساز، ز.، تقوی، م. و صفری، ع.، ۱۳۹۹. تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از باکتری‌های اتوژن و سنجش کمی و کیفی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول. علوم آبزی‌پروری، ۹(۱): ۲۱۲-۲۰۳.

طاهری، ع.، جلالی‌نژاد، س. و علی‌انوار، ا.، ۱۳۹۱. خواص ضد فشار خون و ضداکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۹(۱): ۶۰۸-۵۹۹

یعقوب‌زاده، ز.، کابوسی، ح.، پیروی، ف.، صفری، ر. و فتاحی، ا.، ۱۳۹۸. بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۲): ۱۲۸-۱۱۷. 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.

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.

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 Neuterase 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±1.45%, respectively), the maximum amount of inhibition of DPPH, ABTS and linoleic acid peroxidation (63.52±2.86, 73.91±0.29 and 89.06±2.11%, respectively) and also the most effective antihypertensive property (37.91±1.29%) were related to NP-CH-0.5 treatment.

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

*Corresponding author