تاثیر پوشش کیتوزانی حاوی نانولیپوزوم پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو در کنترل لکه‌سیاه و افزایش ماندگاری میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

سیده معصومه کمالی[1]، بهاره شعبانپور[1*]، پرستو پورعاشوری[1]، معظمه کردجزی[1]

۱. گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: b_shabanpour@yahoo.com. تلفن: ۰۱۷۳۲۴۲۷۰۴۰

چکیده

در پژوهش حاضر، اثر پوشش کیتوزان حاوی نانولیپوزوم پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو بر کنترل لکه‌سیاه و ماندگاری میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) طی ۲۰ روز نگهداری در یخ مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین هیدرولیز شده (H) با استفاده از آنزیم آلکالاز تولید شد و خواص عملکردی آن مورد سنجش قرار گرفت. همچنین اثر غلظت‌های مختلف آن بر مهار آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) میگو اندازه‌گیری شد. غلظت بهینه H با بالاترین درصد بازدارندگی آنزیم انتخاب و در نانولیپوزوم بارگذاری شده یا با کیتوزان پوشش داده شدند، سپس میگوها در این پوشش‌ها غوطه‌ور شدند. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده (H) دارای محتوای پروتئین (۸۱/۶٪)، درجه هیدرولیز (DH) (۳۲/۵۴٪) و میانگین طول زنجیره پپتیدی (PCL) (۳/۰۷) است. پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۱/۵٪ بالاترین اثر بازدارندگی آنزیم PPO را پس از ۱ و ۳ دقیقه با مقادیر ۶۰/۰۸ و ۴۷/۹۸٪ نشان داد. در آخرین روز نگهداری، تیمار Ch-N-H بهترین عملکرد را در فاکتورهای PH، ارزش پراکسید (PV) و بافت (سختی) نشان داد ($P < ۰/۰۵$). تغییرات رنگ در تیمار N-H کمترین مقدار را داشت ($P < ۰/۰۵$). نتایج بازهای نیتروژنه فرار (TVN) نشان داد میگوهای تیمار Ch-N-H ۱۶ روز قابلیت ماندگاری در یخ را دارند. لکه‌سیاه میگوهای تیمار شده با انواع پوشش‌های پروتئین هیدرولیز شده به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. این نتایج نشان می‌دهد که ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده با نانولیپوزوم و پوشش کیتوزان می‌تواند در کنترل لکه‌سیاه و افزایش ماندگاری میگو به عنوان یک جایگزین طبیعی مناسب برای متابی‌سولفیت‌سدیم موثر واقع شود.

کلمات کلیدی: نانولیپوزوم، پروتئین هیدرولیز شده، لکه‌سیاه، ماندگاری، میگوی پا سفید غربی

۱- مقدمه

در طول دو دهه گذشته مصرف میگو و همچنین محصولات غذایی حاوی میگو به صورت تجاری توسعه یافته است. با این حال، این توسعه، تولید ضایعات از صنایع غذاهای دریایی را افزایش می‌دهد. تقریباً ۴۵-۴۸٪ وزنی مواد خام میگو بسته به گونه به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود. چندین مطالعه نشان داده‌اند که پوسته میگو ممکن است به عنوان منبع بالقوه مواد تشکیل دهنده کاربردی باشد و می‌تواند به عنوان ماده خام برای تولید محصولات با ارزش افزوده استفاده شود. ضایعات میگو از ۱۸ تا ۴۰ درصد پروتئین، ۳۵ درصد مواد معدنی و ۱۴ تا ۳۰ درصد کیتین تشکیل شده است (۵).

پروتئین‌های هیدرولیز شده محصولاتی هستند که از نظر شیمیایی یا بیولوژیکی پروتئین‌ها را به پپتیدهایی با اندازه‌های مختلف تجزیه می‌کنند. محققان همچنین به تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای فعال زیستی از محصولات جانبی دریایی به دلیل محتوای پروتئین بالا توجه کرده‌اند. هیدرولیز آنزیمی، به ویژه آنزیم میکروبی آلکالاز، فرآیندی نسبتا ساده، موثر و کارآمد است که از تخریب پروتئین‌ها نسبت به هیدرولیز با مواد شیمیایی مانند اسیدکلریدریک، سدیم هیدروکسید و هیدروکسید پتاسیم جلوگیری می‌کند. در مقایسه با سایر آنزیم‌ها، آلکالاز با بالاترین درجه هیدرولیز می‌تواند هیدرولیز را در زمان نسبتاً کوتاهی و در pH قلیایی انجام دهد و به دلیل مصرف کم این آنزیم و بازده بالا مقرون به صرفه می‌باشد (۲۱). این ترکیبات نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. بسیاری از گزارش‌ها نشان داده‌اند که پروتئین‌ها و پپتیدهای فعال زیستی مشتق شده طبیعی، مانند پروتئین ابریشم، پروتئین گندم و پروتئین برنج، می‌توانند فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز را مهار کنند (۲).

لکه‌سیاه یک مکانیسم طبیعی پس از مرگ است که شامل یک کمپلکس آنزیمی پلی‌فنل اکسیداز[1] است و در حضور اکسیژن ترکیباتی را تشکیل می‌دهد که می‌توانند به رنگدانه‌های نامحلول پلیمریزه شوند (۲۸). لکه‌سیاه در میگو ارزش بازار آن را به شدت کاهش می‌دهد و منجر به زیان مالی قابل توجهی می‌شود. ترکیبات سولفیت اغلب برای غلبه بر یا کاهش لکه‌سیاه در میگو و سخت‌پوستان استفاده می‌شوند، اما در سال‌های اخیر واکنش‌های نامطلوب و آلرژی‌زا در مواد سولفیتی جستجو برای روش‌های جایگزین برای کاهش ملانوز، با استفاده از ترکیبات با منشاء طبیعی ضروری به نظر می‌رسد.

بنابراین می‌توان به جای سولفیت‌ها از پروتئین‌ها برای سرکوب PPO استفاده کرد. ضایعات میگو به دلیل این که حجم بالایی از محصول را تشکیل می‌دهند از این رو تبدیل آنها به یک محصول با ارزش افزوده هم می‌تواند مشکلات زیست‌محیطی ناشی از

1- PPO

دور ریز این ضایعات را کم کند و همچنین در طی فرآوری و تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌توان از باقیمانده مواد کیتینی حاصل، کیتوزان تولید کرد که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد (۵). به عبارتی چندین محصول با ارزش افزوده با قابلیت‌های زیستی تولید می‌شودکه دارای خواص زیست‌فعال بالایی هستند.

با این حال، یکی از مشکلات اساسی که به طور عمده کاربرد ترکیبات طبیعی را در صنایع غذایی و دارویی محدود می‌سازد، کارایی پایین ناشی از حساسیت به شرایط محیطی و کاهش پایداری در طی فرایند و نگهداری و دسترسی زیستی پایین آن‌ها است (۲۶). ریزپوشانی روشی برای محافظت از ترکیبات در برابر واکنش‌های ناخواسته، افزایش پایداری آنها در برابر عوامل نامطلوب محیطی، محدود کردن واکنش احتمالی آنها با ترکیبات غذایی، حفظ ثبات و کنترل انتشار هدفمند آنها است. این یک راه حل موثر برای غلبه بر این چالش‌ها است (۳۴). نانولیپوزوم‌ها مقاومت بیشتری در برابر ناپایداری نشان می‌دهند و همچنین می‌توانند اثربخشی و پایداری مواد محصور شده را افزایش دهند (۲۹). نانولیپوزوم‌ها نیز با موانعی در کپسوله‌سازی ترکیبات کاربردی و تقویت فرمول‌های غذایی مختلف از جمله دوام فیزیکی پایین، حساسیت بالا به تنش‌های دما و آزادسازی سریع ترکیبات بارگذاری شده در طول نگهداری مواجه هستند. رویکرد جدید پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها با ترکیبات خوراکی می‌تواند بر محدودیت ذکر شده و چالش تثبیت نانولیپوزوم‌ها در سطح غذا غلبه کند. این استراتژی در تعدیل آزادسازی ترکیبات زیست فعال موثر است. همچنین می‌تواند اثر مواد محصور شده را بر روی سطح جامد محصولات طولانی‌تر کند و عملکرد پوشش‌های خوراکی را افزایش دهد (۸). پوشش کیتوزان منجر به پایداری بهتر لیپوزوم‌ها در طول فرآوری و نگهداری می‌شود، از شرایط محیطی نامطلوب و تخریب محافظت می‌کند و از تعامل با ترکیبات غذا جلوگیری می‌کند (۱۳). از سوی دیگر، پوشش‌های زیست تخریب‌پذیر مانند کیتوزان به دلیل فعالیت‌های ضد میکروبی ذاتی، اثرات هم افزایی در ترکیب با مواد دیگر از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این، برخی مطالعات دیگر پایداری لیپوزوم‌ها و پراکندگی همگن آنها را در ساختار فیلم کیتوزان گزارش کرده‌اند (۳۰). یک مطالعه نشان داده است که نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با فنیل اتیل رزورسینول یک سیستم تحویل مناسب برای مهار فعالیت تیروزیناز و ملانین در پوست هستند (۳۸). علاوه بر این، لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان برای درمان ملانوم موضعی پوست موثر هستند (۲۲).

در این راستا، در تحقیق حاضر، تولید و شناسایی پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو با استفاده از آنزیم تجاری آلکالاز انجام شد و با غلظت‌های مختلف بر مهار آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز میگو مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس بهترین غلظت با بیشترین اثر

بازدارندگی بر روی آنزیم PPO انتخاب و در نانولیپوزوم بارگذاری و با کیتوزان پوشش داده شدند. در نهایت، تأثیر پوشش‌های مختلف بر ویژگی‌های شیمیایی، رنگ، بافت، و لکه‌سیاه میگو (*Litopenaeus vannamei*) در طی ۲۰ روز نگهداری در یخ مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی پروتئین هیدرولیز شده

ضایعات میگو از بازار ماهی فروشان گرگان تهیه شد و پس از انتقال به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در آسیاب با نیتروژن مایع خرد و پودر شد. آلکالاز با فعالیت ۲/۴ واحد آنسون (AU/kg) و چگالی ۱/۱۸ گرم در میلی‌لیتر از شرکت نووازیم دانمارک در تهران تهیه شد. تجزیه و تحلیل کلدال برای تعیین مقدار پروتئین برای محاسبه مقدار نمونه مورد نیاز برای فرآیند هیدرولیز بر اساس نسبت آنزیم به پروتئین با استفاده از روش AOAC (۲۰۰۵) استفاده شد (۳). آزمایش هیدرولیز در ارلن مایر شیشه‌ای در شرایط کنترل شده با استفاده از pH متر مطابق روش جرارد و همکاران (۲۰۰۷) با تغییرات جزئی انجام شد (۱۵). برای اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم‌های درون‌زای ضایعات میگو، ۱۰۰ گرم ضایعات آسیاب شده میگو با آب دیونیزه شده مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در یک ارلن مایر با صفحه داغ، دماسنج و pH متر ارتعاشی هیدرولیز شد. مقدار کمی از هیدروکسید سدیم ۴ مولار و یا هیدروکلراید ۴ مولار اضافه شد تا pH ۸ ثابت بماند. واکنش با حرارت دادن نمونه در آب جوش به مدت ۲۰ دقیقه تکمیل شد که آلکالاز را غیرفعال کرد. سپس پروتئین هیدرولیز شده پس از سانتریفیوژ کردن مخلوط واکنش در ۴۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. سپس مایع رویی جمع‌آوری و در فریزر ^{o}C ۸۰- نگهداری شد و پس از آن در دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) به صورت پودر درآمد. از پروتئین هیدرولیز شده مایع برای تعیین خواص عملکردی استفاده شد.

۲-۲- سنجش خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده

میزان کل پروتئین در مواد خام (N× ۶/۲۵) با دستگاه کجلدال به روش AOAC (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد (۳). غلظت پروتئین در نمونه پروتئین هیدرولیز شده به روش بیورت با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷). برای رسم منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی خالص استفاده گردید. بازده محصول بر اساس وزن ضایعات میگو با استفاده از معادله

۱ محاسبه شد. درجه هیدرولیز[1] با روش فونک و سینگ (۱۹۹۶) به کمک تری‌کلرواستیک اسید[2] اندازه‌گیری شد (۱۲). مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله ۲ محاسبه گردید. میانگین طول زنجیره پپتیدی[3] بر اساس معادله ۳ معرفی شده توسط آدلر- نیسن و اولسن (۱۹۸۶) در نمونه تخمین زده شد (۱).

بازده (٪) = (ضایعات میگو (g)/ پروتئین هیدرولیز شده تولیدی (g)) × ۱۰۰ (۱)

DH (٪) = (مقدار پروتئین نمونه/پروتئین محلول در ۱۰٪ TCA) × ۱۰۰ (۲)

PCL = ۱۰۰/DH (۳)

۲-۳- استخراج آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) میگو

آنزیم PPO با استفاده از روش نیرمال و بنجاکول (۲۰۰۹) با تغییرات جزئی استخراج گردید (۳۲). سفالوتوراکس‌های چندین میگو جدا و با نیتروژن مایع آسیاب و پودر شدند. بافر فسفات سدیم (۱۵۰ میلی‌لیتر، با pH ۷/۲، حاوی NaCl ۱ مولار) و۰/۲٪ بریج-۳۵ به مخلوط حاصل اضافه شد. سپس مخلوط در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Eppendorf Centrifuge, 5810R, Germany) با دور ۸۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به مایع رویی سولفات آمونیوم جامد اضافه شد تا ۴۰ درصد اشباع به دست آید و در یخچال به مدت نیم ساعت نگهداری شد. رسوب حاصله با سانتریفیوژ جمع‌آوری شد و با بافر فسفات‌سدیم در سه برابر حجم خود مخلوط شد. نمونه در کیسه دیالیز ۱۲ ساعت در یخچال نگهداری شد تا دیالیز انجام شود، با جایگزینی بافر جدید با بافر قبلی سه بار دیالیز صورت گرفت. در نهایت با سانتریفیوژ مواد ته‌نشین شده جدا گردید و از فاز آبی به عنوان آنزیم PPO استفاده گردید. با استفاده از L-DOPA به عنوان یک سوبسترا ظرفیت فعالیت آنزیم با روش نیرمال و بنجاکول (۲۰۰۹) با تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد (۳۲). فعالیت آنزیم (۰/۱ میلی‌لیتر) به صورت رنگ‌سنجی در ترکیب با L-DOPA (۰/۶ میلی‌لیتر)، بافر فسفات‌سدیم (۰/۴ میلی‌لیتر)، آب دیونیزه و تولید دوپاکروم در ۴۷۵ نانومتر به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد توسط اسپکتروفتومتر UV (Libra S12, UK ،Biochrom) اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، افزایش در

1- DH
2- TCA
3- PCL

جذب به میزان ۰/۰۰۱ درنظر گرفته شد. بلانک‌های آزمایش با حذف آنزیم و سوبسترا و جایگزینی آن‌ها با آب در محلول واکنش ساخته شد.

۲-٤- ارزیابی بازدارندگی آنزیم PPO توسط پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین هیدرولیز شده (۰/۱ میلی‌لیتر) با غلظت‌های مختلف ۱، ۲، ۳ و ۴ درصد در حجم مساوی با آنزیم PPO مخلوط شد تا غلظت‌های نهایی ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد (w/v) به دست آید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت نیم ساعت نگهداری شد. سپس L-DOPA ۱۵ میلی‌مولار ۴۵ درجه سانتیگراد و بافر سنجش (۰/۴ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد (۳۲). اثر بازدارندگی آنزیم PPO توسط غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده با ثبت اعداد جذب در ۲۱۰ ثانیه (هر ۳۰ ثانیه) اندازه‌گیری شد و فعالیت بازدارنده به صورت درصد مهار با فرمول زیر محاسبه گردید:

مهار آنزیم (٪) = [(فعالیت آنزیم PPO در حضور پروتئین هیدرولیز شده – فعالیت آنزیم PPO)/(فعالیت آنزیم PPO)] × ۱۰۰

۲-۵- آماده‌سازی نانولیپوزوم

محلولی حاوی ۵ درصد (وزنی/وزنی) لسیتین با مخلوط کردن لسیتین با آب مقطر ساخته شد. در دمای اتاق، سوسپانسیون به مدت ۴ ساعت مخلوط شد. برای به دست آوردن سوسپانسیون کلوئیدی، مخلوط به مدت ۱۸۰ ثانیه در فرکانس ۴۰ کیلوهرتز و توان ۴۰ درصد (۱ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) فراصوت (Topsonics Sonicator، ایران) شد (۱۸). نانولیپوزوم‌ها در بطری‌های استریل در دمای ۴ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند.

۲-٦- تهیه محلول‌های پوششی آزمایش

محلول کیتوزان ۱ درصد (۹۰ درصد درجه استیلاسیون و وزن مولکولی ۲۵ کیلو دالتون) در اسید استیک (۱ درصد) تهیه شد و به مدت ۱ ساعت هم زده شد. محلول ۱/۵٪ پروتئین هیدرولیز شده (H) در آب مقطر ساخته شد. (H) در محلول نانولیپوزوم (۱۰۰ میلی‌لیتر) حل شد تا محلول نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده (N-H) به دست آید. (H) به محلول کیتوزان اضافه شد تا پروتئین هیدرولیز شده با پوشش کیتوزان (Ch-H) بدست آید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر محلول نانولیپوزوم حاوی (H) با ۸۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان (v/v) به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی مخلوط شد تا محلول نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان (Ch-N-H) بدست آید (۱۸).

۲-۷- جمع‌آوری و آماده سازی نمونه‌های میگو

میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با وزن حدود ۱۷- ۱۶ گرم از سایت پرورش میگوی گمیشان در استان گلستان خریداری شد. نمونه‌ها به صورت تازه و بدون هیچ نوع افزودنی در مخلوط یخ با نسبت وزنی (۱:۲) نگهداری و به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. سپس با آب سرد شسته و در یخ نگهداری شدند. میگوها بلافاصله برای اعمال پوشش‌ها و تیماربندی مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۸- غوطه‌وری میگو در محلول‌های پوششی

میگوها به طور تصادفی به ۶ گروه کنترل (Con)، متابی‌سولفیت‌سدیم (Met)، پوشش‌های پروتئین هیدرولیز شده (H)، نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده (N-H)، پروتئین هیدرولیز شده با پوشش کیتوزان (Ch-H) و نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان (Ch-N-H) تقسیم شدند. میگوهای گروه‌های مختلف به ترتیب در محلول‌های موردنظر با نسبت میگو به محلول ۱:۲ (w/v) در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. پس از غوطه‌ور شدن، میگوها به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق آبکش شدند. بخش دیگری از میگوها با ۱/۲۵٪ متابی‌سولفیت‌سدیم حل شده در آب مقطر به نسبت میگو/ محلول ۱:۲ (w/v) به مدت ۱ دقیقه تیمار شدند (۴۰). نمونه‌های هر تیمار در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار و در یخ با نسبت میگو به یخ ۱:۲ (w/w) در جعبه‌های یونولیت قرار داده شدند و سپس در یخچال نگهداری شدند. هر دو روز، یخ ذوب شده برداشته می‌شد و با حجم مساوی از یخ دوباره پر می‌شد تا نسبت میگو به یخ حفظ شود.

۲-۹- ارزیابی آزمایش‌های شیمیایی

pH -۱-۹-۲

تقریباً ۲ گرم میگوی پوست کنده با آب مقطر (۱:۲) (w/v) در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه همگن شد. با استفاده از pH متر دیجیتال (Metrohm, Switzerland, 713) pH تعیین شد (۴۰). آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

۲-۹-۲- بازهای نیتروژنه فرار[1]

1- TVN

مطابق روش (۲۰۰۵) AOAC در دستگاه سوکسله، ۵ گرم نمونه به ۲ گرم اکسید منیزیم در یک فلاسک حرارتی حاوی آب مقطر اضافه شد. در ظرف دریافت کننده، چند قطره نشانگر فنل فتالئین به اسید بوریک (۲ درصد) اضافه شد (۳). در قسمت بعدی به دو مخزن (گرمایش و دریافت‌کننده) وصل و دمای آب کنترل شد. پس از ۳ دقیقه، تقطیر متوقف شد. محتوای فلاسک گیرنده با اسید H_2SO_4 ۰/۰۵ نرمال تا نقطه پایانی تیتر شد. بازهای نیتروژنه فرار به شرح زیر تعیین شد:

$$TVN\ (mg/100g) = (V \times N \times 100 \times 14) / W \qquad (۴)$$

V = حجم H_2SO_4 مورد استفاده برای نمونه (ml)، N = نرمالیته H_2SO_4، W= وزن نمونه بر حسب گرم.

۲-۹-۳- ارزش پراکسید[1]

مقدار پراکسید با توجه به روش سالام و همکاران تعیین شد (۳۵). ۳ گرم نمونه در یک ارلن در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در حمام آب حرارت داده شد تا چربی ذوب شود. ظرف به مدت ۳ دقیقه با ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید استیک- کلروفرم (v/v ۳:۲) کاملاً تکان داده شد تا چربی حل شود. پس از افزودن محلول یدید پتاسیم اشباع (۰/۵ میلی‌لیتر) به فیلتراسیون، واکنش با افزودن محلول نشاسته به عنوان شاخص ادامه یافت. تیتراسیون با محلول استاندارد تیوسولفات سدیم انجام شد. برای تعیین PV از معادله زیر استفاده شد که به عنوان پراکسید میلی‌اکی والان در هر کیلوگرم نمونه گزارش شد:

$$PV\ (meq / kg) = [(S \times N) / W] \times 100 \qquad (۵)$$

S = حجم تیتراسیون (ml)، N = نرمالیته محلول تیوسولفات سدیم (N = ۰/۰۱) و W = وزن نمونه (g).

۲-۱۰- اندازه‌گیری رنگ پوسته میگو

رنگ میگو با استفاده از رنگ‌سنج اتوماتیک (Hunter Lab, Lovibond, CAM-System 500, UK) طبق روش زانگ و همکاران (۲۰۱۵) اندازه‌گیری شد (۴۱). *L (روشنایی) نشان‌دهنده روشنایی در مقیاس ۰ (تاریکی) تا ۱۰۰ (سفیدی)، مقیاس *a (قرمزی) از مقادیر منفی برای سبز تا مقادیر مثبت برای قرمز و مقیاس *b (زردی) محدوده از مقادیر منفی برای آبی به مقادیر مثبت برای زرد است. رنگ در سه ناحیه (سر، بدن و دم) روی پوسته میگو تعیین شد. برای هر نمونه، اندازه‌گیری‌های سه‌گانه در هر

1- PV

ناحیه پوسته انجام شد و میانگین مقادیر نمونه‌ها ثبت شد. اختلاف رنگ کل[1] که نشان‌دهنده میزان تفاوت رنگ بین میگوها در ابتدای نگهداری و پس از دوره نگهداری است، با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\Delta E = [(L^*-L^*_0)^2 + (a^*- a^*_0)^2+ (b^*- b^*_0)^2]^{1/2} \qquad (۶)$$

که در آن L^*_0، a^*_0 و b^*_0 مقادیر پارامترهای رنگ L^*، a^* و b^* در شروع نگهداری.

۲-۱۱- سنجش بافت (سختی)

بافت‌سنج (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) برای ارزیابی بافت (سختی) نمونه‌های گوشت میگو بر اساس روش زانگ و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد (۴۱). تجزیه و تحلیل پروفایل بافت[2] در دمای اتاق و تحت شرایط زیر انجام شد: سرعت ثابت آزمایش: ۱ میلی‌متر بر ثانیه، تغییر شکل نمونه: ۵۰٪ و زمان نگه داشتن بین چرخه‌ها: ۳ ثانیه. پارامتر تحلیل بافت با استفاده از نرم‌افزار Pro-Lite V1.0 از منحنی‌های نیرو- زمان تولید شده از هر نمونه محاسبه شد. تمام اندازه‌گیری‌ها بر روی شش نمونه میگو انجام شد و مقدار متوسط به دست آمد.

۲-۱۲- ارزیابی لکه‌سیاه

ارزیابی لکه‌سیاه میگوی پا سفید غربی از طریق بازرسی بصری توسط شش نفر از اعضای آموزش دیده با استفاده از امتیاز دهی بر اساس روش مونترو و همکاران (۲۰۰۱) انجام شد (۳۱). از اعضای پانل خواسته شد که امتیاز لکه‌سیاه (۱۰۰٪- ۰) را برای میگو، که در آن ۰ = بدون لکه‌سیاه، ۲۰٪ = خفیف (۲۰٪ سطح میگو)، ۴۰٪ = متوسط (۲۰ تا ۴۰٪ سطح میگو)، ۶۰٪ = قابل توجه (۴۰ – ۶۰٪ سطح میگو)، ۸۰٪ = شدید (۶۰ – ۸۰٪ سطح میگو) و ۱۰۰٪ = بسیار سنگین (۸۰٪ تا کل سطح میگو) در نظر گرفته شود. برای ارزیابی لکه‌سیاه هر ۴ روز یکبار برای هر تیمار نمونه‌برداری شد.

۲-۱۳- تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد و آنالیزها در آزمایش لکه‌سیاه و بافت در ۶ تکرار، در آزمایش تغییر رنگ در ۳ تکرار در سه قسمت بدن (۹ تکرار) و در سایر آزمایش‌ها با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس

1- ΔE
2- TPA

دو طرفه (ANOVA) در نرم افزار SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون‌های چند دامنه‌ای دانکن برای برآورد تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌ها در بین تیمارها و زمان‌های مختلف انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد و تغییرات آماری در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ محاسبه شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های عملکردی پروتئین هیدرولیز شده (H)

نتایج آنالیز آماری نشان داد غلظت پروتئین اولیه در ضایعات میگو با روش کلدال ۱۲/۵٪، میزان پروتئین موجود در پروتئین هیدرولیز شده حاصل ۰/۵۳ ± ۸۱/۶٪ و بازده پروتئین ۰/۳۳ ± ۹/۴۹٪ برآورد شد (جدول ۱). بازیافت پروتئین یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیزهای پروتئینی غذایی محسوب می‌شود که بیان‌کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از غیر محلول و میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیزاسیون آنزیمی می‌باشد (۲۵). یکی دیگر از پارامترهای کلیدی پروتئین‌های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز است که به عنوان درصدی از پیوندهای پپتیدی شکسته شده تعریف می‌شود. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولید شده تعیین می‌شود و این موارد بستگی به طبیعت پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز به ویژه دما و pH دارد. در این مطالعه درجه هیدرولیز ۰/۶۸ ± ۳۲/۵۴٪ و طول زنجیره پپتیدی ۰/۰۶ ± ۳/۰۷ محاسبه شد. طول زنجیره به اندازه هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئین هیدرولیز شده بستگی دارد (۲۱). نتایج سایر محققین نیز حاکی از میزان بالای پروتئین در روش‌های هیدرولیز شده می‌باشد که نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کند. اویسی‌پور و همکاران (۲۰۰۹) طی تحقیقی نشان دادند که میزان پروتئین در هیدرولیز امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی با استفاده از آنزیم آلکالاز، در حدود ۶۶ درصد می‌باشد (۳۳).

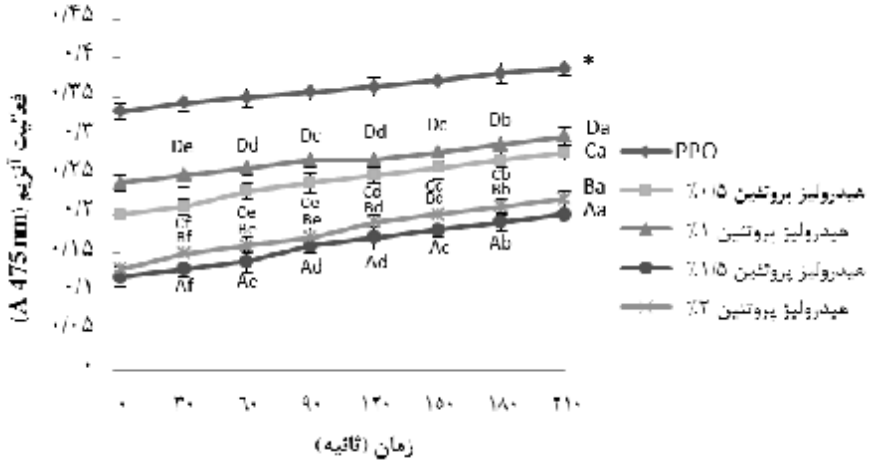
جدول ۱. ویژگی‌های عملکردی پروتئین هیدرولیز شده (H)

ویژگی‌های عملکردی	(٪)
پروتئین اولیه ضایعات	۱۲/۵ ± ۰
پروتئین در هیدرولیز	۸۱/۶۰ ± ۰/۵۳
بازده پروتئین	۹/۴۹ ± ۰/۳۳
درجه هیدرولیز	۳۲/۵۴ ± ۰/۶۸
طول زنجیره پپتید	۳/۰۷ ± ۰/۰۶

مقدارها بر اساس میانگین ± انحراف معیار

۳-۲- اثر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو (H) بر مهار آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) میگو

تغییرات در فعالیت آنزیم PPO و مهار آن در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲٪ از پروتئین هیدرولیز شده (H) در ۲۱۰ ثانیه در شکل ۱ نشان داده شده است. کاهش مقدار جذب (فعالیت) نشان داد که مهار PPO توسط پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت. در غلظت ۱/۵٪ H، فعالیت PPO به حداقل خود رسید. به عبارت دیگر، این غلظت H بعد از ۱ و ۳ دقیقه (به ترتیب ۶۰/۰۸ و ۴۷/۹۸ درصد) بازدارندگی بالاتری از PPO را نسبت به سایر غلظت‌ها نشان داد. قبلاً گزارش شده است که پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای آمینه می‌توانند فعالیت PPO را مهار کنند. آنها ممکن است مس ضروری را در محل فعال PPO کلات کنند و با o- کینون‌ها واکنش دهند (۱۴). در مطالعه لی و همکاران (۲۰۰۰) گزارش شده است که هیدرولیز پروتئین توسط پروتئازها، بسترهایی برای فعال‌سازی PPO فراهم می‌کند. به عبارت دیگر لیپوپلی‌ساکارید و پروتئین متصل به گلوکان[1] در فعال‌سازی سیستم فعال کننده PPO در خرچنگ آب شیرین (*Pacifastacus leniusculus*) نقش دارد (۲۳). با این حال، هیچ اطلاعات دقیق‌تری در مورد اثر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو بر روی آنزیم PPO میگوی پا سفید غربی در دسترس نیست.



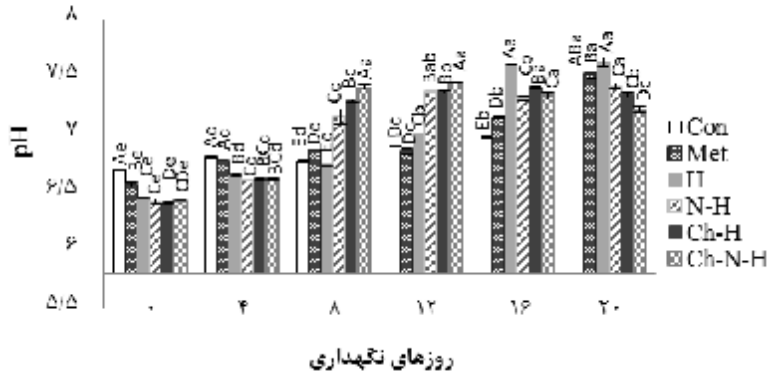
شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو بر بازدارندگی فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO) میگو طی زمان (میانگین ± انحراف معیار) (n= ۳). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری در غلظت‌ها و زمان-های مختلف است (p <۰/۰۵). (*) نشان‌دهنده فعالیت آنزیم PPO است.

1- LGBP

۳-۳- تغییرات آزمایشات شیمیایی

pH -۱-۳-۳

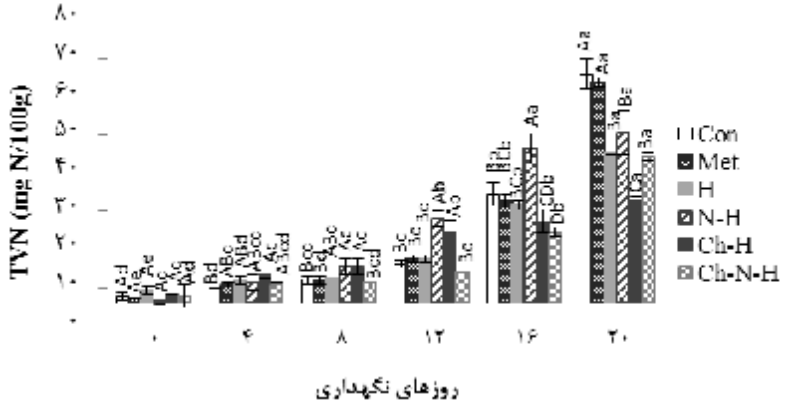
طبق یک گزارش، pH ۷/۷ یا کمتر برای میگو نشان‌دهنده کیفیت عالی، ۷/۷- ۷/۹۵ کیفیت قابل قبول و ۷/۹۵ یا بالاتر نشان‌دهنده کیفیت پایین است (۶). شکل ۲ میزان pH را در میگو با تیمارهای مختلف در طی ۲۰ روز نگهداری در یخ نشان می‌دهد. میگوی تازه سفید اقیانوس آرام در روز صفر دارای pH ۶/۴- ۶/۷ بود. با افزایش زمان نگهداری، pH تمام میگوها به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). در بین تمام نمونه‌ها، میگوهای تیمار شده با Ch-N-H کمترین pH با مقدار ۷/۲۲ را در روز آخر نگهداری نشان دادند ($P <۰/۰۵$). تیمار پروتئین هیدرولیز شده (H) از سایر تیمارها بالاتر بود. روند افزایشی pH با افزایش زمان نگهداری را می‌توان به افزایش فعالیت باکتری‌های اتولیتیک و پروتئولیتیک در طول دوره نگهداری و فساد میکروبی- آنزیمی نسبت داد که باعث تولید مواد افزایش دهنده pH مانند آمونیوم، آمونیاک، تری‌متیل آمین می‌شوند (۲۰). با همین استدلال می‌توان ثبات و پایداری pH را در تیمار نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان را در طول دوره نگهداری توجیه کرد. به این صورت که با افزایش زمان نگهداری، این پوشش توانسته تا حد زیادی مانع از فعالیت باکتری‌های عامل فساد و تولید ترکیبات فرار افزایش دهنده pH شود. این موضوع نشان می‌دهد که پوشش نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده توام با کیتوزان نسبت به پروتئین هیدرولیز شده خالص توانسته است از افزایش pH جلوگیری کند. در تحقیق فان و همکاران (۲۰۰۹) نیز مانند تحقیق حاضر روند افزایشی pH با افزایش زمان نگهداری مشاهده و همچنین اثر کیتوزان در کندترکردن سرعت افزایش pH ثابت شد (۹).



شکل ۲. تغییرات pH (میانگین ± انحراف معیار) میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ۳). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت روی ستون‌ها به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است (P < ۰/۰۵)

TVN -۲-۳-۳

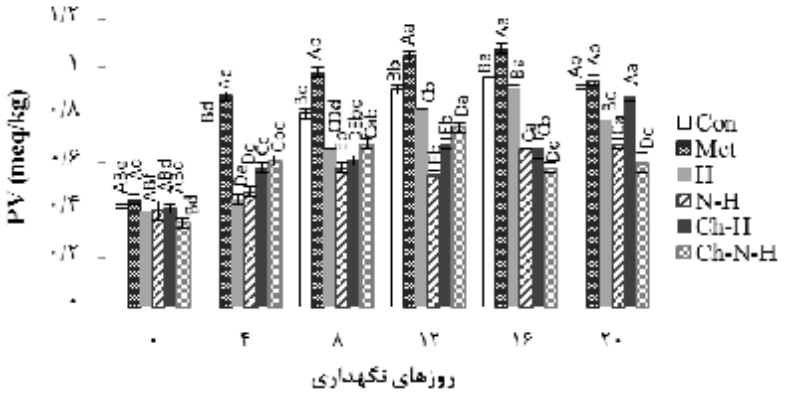
بازهای نیتروژنه فرار (TVN) نشانگر فساد است و ممکن است اساساً به آمونیاک تولید شده از کاتابولیسم باکتریایی ترکیبات حاوی نیتروژن نسبت داده شود (۴). محتوای اولیه TVN ۶/۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بود که کمتر از میزان گزارش شده توسط فرج‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) بود (۱۰). حد TVN ۳۰- ۳۵ میلی‌گرم نیتروژن بر ۱۰۰ گرم برای محصولات دریایی معمولاً فاسد در نظر گرفته می‌شود (۷). مقدار TVN در روز شانزدهم، در تیمارهای Ch-N-H و Ch-H در محدوده توصیه شده (زیر ۳۰ میلی-گرم در ۱۰۰ گرم) بود. در پایان نگهداری، محتوای TVN همه میگوهای از حد مجاز فراتر رفتند و کاهش تدریجی کیفیت را نشان دادند (شکل ۳). اندازه‌گیری‌های TVN نشان می‌دهد که میگوهای دارای پوشش Ch-N-H وCh-H در انبار یخ ۱۶ روز ماندگاری دارند. به عبارت دیگر، هنگامی که پروتئین هیدرولیز شده با پوشش کیتوزان و یا نانولیپوزوم ترکیب شد، مقدار TVN را کاهش داد. وانگ و همکاران (۲۰۱۸) دریافتند که در مقایسه با پوشش کیتوزان خالص، پوشش کیتوزان کارواکرول به طور قابل‌توجهی افزایش مقدار TVN میگو را در مراحل بعدی نگهداری کند کرد (۳۶). علاوه بر این، یافته‌های فوق با تحقیقات قبلی مطابقت دارد که فیلم‌های مبتنی بر کیتوزان به شکل نانوحامل برای ترکیبات زیست‌فعال امکان توسعه بسته‌بندی عملکردی با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی را فراهم می‌کند که سیستم مطلوبی برای تضمین کیفیت، ایمنی و ماندگاری محصولات غذایی دریایی است (۳۹).



شکل ۳. میزان بازهای نیتروژنه فرار (TVN) (میانگین ± انحراف معیار) در میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ۳). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت روی ستون-ها به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است (P < ۰/۰۵)

PV -۳-۳-۳

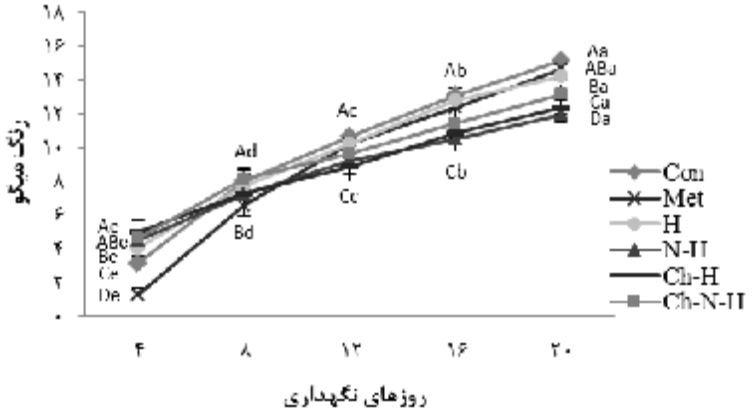
عدد پراکسید (PV) شاخصی جهت تشخیص میزان هیدروپراکسیدها یا محصولات اولیه اکسیداسیون چربی‌ها هستند. مطابق نتایج، نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان (Ch-N-H) توانست به صورت فعال‌تری با اکسیداسیون و تولید هیدرو پراکسیدها مقابله کند (شکل ۴). در روز آخر این تیمار و تیمار نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده (N-H) با مقادیر ۰/۶ و ۰/۶۸ عدد پراکسید پایین‌تر و نتیجه مطلوب‌تری نسبت به سایر تیمارها نشان دادند (P < ۰/۰۵). به طور محتمل این پوشش‌ها با اثر متقابل نسبت به پروتئین هیدرولیز شده خالص، قدرت بیشتری در برابر نفوذ اکسیژن داشته است. پراکسید (PV) کمتر در نمونه‌ها ممکن است به دلیل تبدیل سریعتر به مواد دیگر باشد. پوشش‌های کیتوزان و نانولیپوزوم به عنوان یک مانع موثر در برابر نفوذپذیری اکسیژن گزارش شده است و ممکن است به عنوان یک لایه محافظ بین سطح میگو و محیط اطراف عمل کند. از آنجایی که تمام نمونه‌ها کمتر از ده مگا اکی‌والان بر کیلوگرم چربی داشتند، این یک حد قابل قبول در نظر گرفته می‌شود. این نتایج با یافته‌های کمالی و همکاران (۲۰۲۳) همخوانی دارد که مشاهده کردند پوشش‌کیتوزان نانولیپوزوم حاوی پلی‌ساکارید سولفاته جلبک سبز در جلوگیری از اکسیداسیون لیپید در میگو مفید و موثر واقع شده است (۱۹). به طور مشابه فرج‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردندکه پوشش‌های ژلاتین-کیتوزان اکسیداسیون لیپید در میگو را به تاخیر می‌اندازد (۱۰).



شکل ٤. ارزش پراکسید (PV) (میانگین ± انحراف معیار) در میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ۳). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت روی ستون‌ها به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است (P < ۰/۰۵)

۳-٤- تغییرات رنگ

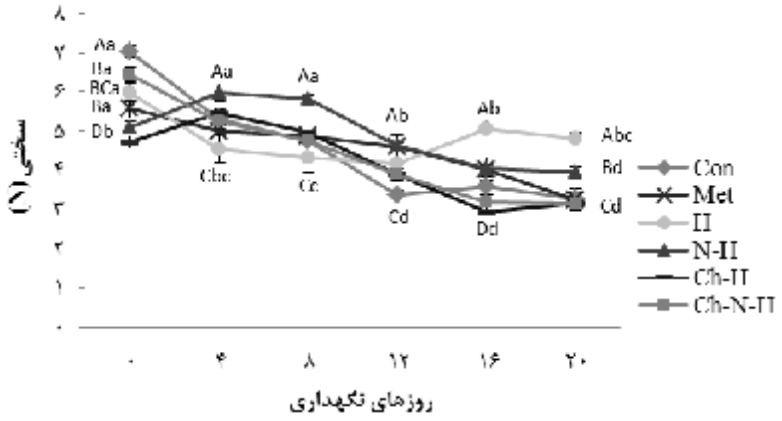
یکی از عوامل متعددی که بر ترجیحات مصرف‌کننده تأثیر می‌گذارد، رنگ غذاهای دریایی است. با افزایش زمان نگهداری، تغییر رنگ در تیمارهای کنترل و متابی‌سولفیت‌سدیم به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵)، در حالی که تغییر رنگ در تیمارها با پوشش‌های N-H و Ch-H به آرامی افزایش یافت و در روز آخر کمترین مقادیر ۱۱/۹۶ و ۱۲/۳۷ بدست آمد (P < ۰/۰۵). میگو حاوی هموسیانین است که عملکرد انتقال اکسیژن را همانند پروتئین‌های هم انجام می‌دهد. هموسیانین در حالت اکسیژن‌دار آبی و در حالت بدون اکسیژن بی‌رنگ یا سفید است. مرحله قهوه‌ای شدن عمدتاً به دلیل واکنش میلارد است که گلیکوژن و پروتئین‌ها برای تولید رنگ قهوه‌ای واکنش تولید می‌شوند (۱۶). تغییرات رنگ (ΔE) نشان‌دهنده تغییرات کلی *L، *a و *b است و در این مطالعه با افزایش زمان نگهداری، مشابه نتایج گزارش شده توسط وانگ و همکاران، (۲۰۱۸) اختلاف رنگ در میگوها افزایش یافت (۳۶). در مطالعات مشابه، یوان و همکاران (۲۰۱۶) با افزایش زمان نگهداری، مقادیر ΔE میگو به تدریج در همه گروه‌ها افزایش یافت (۴۰). بنابراین در مطالعه حاضر استفاده از پوشش‌های نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده و پروتئین هیدرولیز شده با پوشش کیتوزان می‌تواند تغییر رنگ میگو را به تاخیر بیندازد.



شکل۵. تغییر رنگ (میانگین ± انحراف معیار) در میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ۹). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است (P < ۰/۰۵)

۳-۵- بافت (سختی)

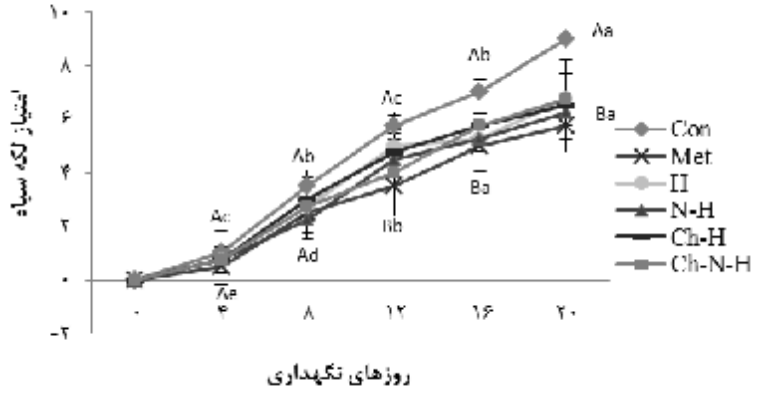
سختی مهم‌ترین ویژگی بافتی در گوشت یا غذاهای دریایی است. سختی در همه نمونه‌ها با افزایش زمان به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۶). سختی میگوهای تیمار شده با پروتئین هیدرولیز شده با مقدار ۴/۸ در طی نگهداری از همه تیمارها بالاتر بود در حالی که سختی تیمار نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان (Ch-N-H) با مقدار ۳/۱۵ از همه نمونه‌ها کمتر محاسبه شد ($P < ۰/۰۵$). تغییر پارامترهای بافت یکی از مولفه‌های اصلی مقبولیت است و تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله کاهش pH پس از مرگ و آرایش پروتئین عضلانی هستند. یافته‌های حاضر با یافته‌های لی و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد که بیان کردند عصاره هسته انگور و پلی‌فنل‌های چای، که غنی از ترکیبات پلی‌فنلی هستند، می‌توانند ماندگاری را افزایش دهند و پارامتر بافتی را در فیله ماهی قرمز بهبود بخشند (۲۴). در مطالعه حاضر نیز پروتئین هیدرولیز شده باعث تاخیر در تغییر پارامتر سختی بافت در میگو در طول نگهداری شده است. پیوند بین پروتئین هیدرولیز شده و ماهیچه می‌تواند با بهبود ویژگی‌های بافت در ماهیچه میگو همراه باشد. با این حال وانگ و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده کردند استفاده از پوشش‌های کیتوزان در به تاخیر انداختن تغییر پارامترهای بافت در میگو در طول ذخیره‌سازی مؤثر بوده است (۳۷).



شکل٦. سنجش بافت (سختی) (میانگین ± انحراف معیار) در میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ٦). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است ($P < ۰/۰۵$)

۳-٦- لکه‌سیاه

فرآیندهای قهوه‌ای شدن بر کیفیت غذایی و ظاهر تأثیر می‌گذارد. همچنین مقبولیت مصرف‌کننده را کاهش می‌دهد و تأثیر اقتصادی قابل‌توجهی بر تولیدکنندگان مواد غذایی و صنایع تبدیلی غذایی دارد. در روز صفر نگهداری، لکه‌سیاه در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد اما با افزایش زمان نگهداری لکه‌سیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۷). تمام نمونه‌ها پس از ۲۰ روز نگهداری، ارزش لکه‌سیاه کمتری نسبت به شاهد (با امتیاز ۹) داشتند. تفاوتی در لکه‌سیاه بین انواع تیمارهای مختلف حاوی پروتئین هیدرولیز شده و متابی‌سولفیت‌سدیم در طول نگهداری وجود نداشت ($P < ۰/۰۵$). پروتئین‌های هیدرولیز شده به دست آمده از طریق فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌هایی با منشاء دریایی به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مهم شناخته می‌شوند. این احتمال وجود دارد که ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده در نانولیپوزوم باعث حفظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها شده و اثر بخشی و پایداری مواد محصور شده را افزایش داده در نتیجه باعث تاخیر در ظهور لکه‌های سیاه در میگو شده است. به عبارت دیگر، پروتئین‌ها تمایل به تشکیل کمپلکس با آنزیم‌های مختلف دارند و با مسدود کردن محل فعال یا تغییر ساختار کمپلکس نهایی، آنها را غیرفعال کنند. به طور مشابه لو و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که بسته‌بندی پلی‌اتیلن با چگالی کم اصلاح شده با نانو TiO_2 در کاهش فعالیت PPO موثرتر بوده و با کاهش نفوذپذیری اکسیژن در به تاخیر انداختن لکه‌سیاه کمک می‌کند (۲۷). این نتیجه با یافته‌های فردوس و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت دارد که مشاهده کردند میگوهای درمان شده با چای سبز و آملا برای شرکت کنندگان تا ۲ هفته قابل قبول بودند زیرا میانگین لکه‌سیاه در آنها کم بود (۱۱). بنابراین مطالعه حاضر بیشتر تایید کرد که پروتئین هیدرولیز شده، به عنوان یک ماده طبیعی و با ارزش افزوده بر لکه‌سیاه میگو تاثیرگذار است و در پوشش نانولیپوزوم یا کیتوزان می‌تواند لکه‌سیاه را در میگو در طول نگهداری یخ کاهش دهد.



شکل۷. امتیاز لکه‌سیاه (میانگین ± انحراف معیار) در میگوی پا سفید غربی با انواع مختلف پوشش‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو یا بدون آن در طی روزهای نگهداری در یخ (n= ٦). حروف بزرگ (A-B) و کوچک (a-b) متفاوت به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی-داری بین تیمارها و روزهای نگهداری است (P < ۰/۰۵)

٤- نتیجه‌گیری

در این مطالعه پروتئین هیدرولیز شده با خواص عملکردی بالایی تولید شد و اثر مهارکنندگی بر آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز PPO میگو نشان داد. پروتئین هیدرولیز شده در پوشش کیتوزان و نانولیپوزوم باعث افزایش ماندگاری و کنترل لکه‌سیاه میگو شد. میگوهای این تیمار کمترین مقادیر pH، PV و بافت را نشان دادند. تیمار Ch-H کمترین تغییرات رنگ را نشان داد. با این وجود نتایج آزمایشات TVN نشان دادکه تیمارهای Ch-N-H و Ch-H تا ۱۶ روز قابلیت ماندگاری در یخ را دارند و در روز بیست تمام میگوها از حد مجاز مصرف طبق مقدار مجاز TVN فراتر رفتند. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند کاندید خوبی برای تحقیقات بیشتر برای جایگزینی متابی‌سولفیت‌سدیم در صنعت فرآوری میگو باشد.

٥- منابع

1. Adler-Nissen, J. 1986. A Review of food hydrolysis specific areas. In: Enzymic hydrolysis of food proteins, J. Adler-Nissen (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Copen hagen, Denmark pp. 57–109.
2. Altunkaya, A. 2011. Effect of whey protein concentrate on phenolic profile and browning of fresh-cut lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry*, 128: 754-760.
3. AOAC, 2005. Official methods of analysis. (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. USA
4. Arancibia, M. Y., Lopez-Caballero, M. E., Gomez-Guillen, M. C. and Montero, P. 2015. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. *Food Control*, 54: 259-266.
5. Cahú, T. B., Santos, S. D., Mendes, A., Córdula, C. R., Chavante, S. F., Carvalho, L. B. and et al. 2012. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. *Process Biochemistry*, 47: 570–577.

6. Colakoglu, F. A., Ormanci, H. B., and Altin, A. 2006. Determination of the shelf life of fresh shrimp (*Parapaneus longirostris*) treated with Frische-star. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1/3): 383–386.
7. Connell, J. J. 1995. Intrinsic quality. In control of fish quality (pp. 5-36). London, UK: Fishing News Books/Blackwell Science.
8. Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M. and Ferrari, G. 2012. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology*, 159 (4): 342–350.
9. Fan, W., Sun, J., Chen, Y., Qiu, J., Zhang, Y. and Chi, Y. 2009. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food chemistry*, 115(1): 66-70.
10. Farajzadeh, F. Motamedzadegan, A. Shahidi, S. A. and Hamzeh, S. 2016. The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. *Food control*, 67: 163-170.
11. Firdous, A., Ringø, E. and Elumalai, P. 2021. Effects of green tea and amla extracts on quality and melanosis of Indian white prawn (*Fenneropenaeus indicus*, Milne Edwards, 1837) during chilled storage. *Aquaculture and fisheries*, 6: 617–627.
12. Fonkwe, L. G. and Singh, R. K. 1996. Protein recovery from enzymatically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 31: 605.
13. Gibis, M., Ruedt, C. and Weiss, J. 2016. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, 88: 105–113.
14. Girelli, A. M. Mattei, E. Messina, A. and Tarola, A. M. 2004. Inhibition of polyphenol oxidases activity by various dipeptides, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2741-2745.
15. Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufosse, L. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42: 1486–1491.
16. Haard, N. F. 1992. Biochemistry and chemistry of color and color change in seafoods. Advances in seafood biochemistry: Composition and quality, 305–360.
17. Jean, W. G. and Sharron, L.O. 2001. Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(1): 16-18.
18. Jiménez, A., Sánchez-González, L., Desobry, S., Chiralt, A. and Arab Tehrany, E. 2014. Influence of nanoliposomes incorporation on properties of film forming dispersions and films based on corn starch and sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 35: 159-169.
19. Kamali, M., Shabanpour, B., Pourashouri, P. and Kordjazi, M. 2023. Effect of chitosan-coated *Ulva intestinalis* sulfated polysaccharide nanoliposome on melanosis and quality of Pacifc white shrimp during ice storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 230: 123275.
20. Kilincceker, O., Dogan, I. S. and Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *LWT-Food science and technology*, 42(4): 868-873.
21. Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43-81.
22. Lee, E. H., Lim, S. J. and Lee, M. K. 2019. Chitosan-coated liposomes to stabilize and enhance transdermal delivery of indocyanine green for photodynamic therapy of melanoma. *Carbohydrate Polymers*, 224: 115-143.
23. Lee, S. Y. Wang, R. and Sorderhall, K. 2000. A lipopolysaccharide- and β-1, 3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*

purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 1337-1343.
24. Li, T., Li, J., Hu, W. and Li, X. 2013. Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry*, 138 (2-3): 821-826.
25. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. and Espe, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmosalar*, L). frames by Protamex MT protease. *Process Biochem*istry, 37:1263–1239.
26. Lu, Q., Li, D. C. and Jiang, J. G. 2011. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24): 13004-13011.
27. Luo, Z., Qin, Y. and Ye, Q. 2015. Effect of nano-TiO_2-LDPE packaging on microbiological and physicochemical quality of Pacific white shrimp during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 1567–1573.
28. McEvily, A. J., Iyengar, R. and Otwell, S. 1991. Sulfit alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*, 45: 80-86.
29. Mehdizadeh, A., Shahidi, S. A., Shariatifar, N., Shiran, M., Ghorbani, A. and Sarae, H. 2021. Evaluation of chitosan-zein coating containing free and nano-encapsulated *Pulicaria gnaphalodes* (Vent.) Boiss. Extract on quality attributes of rainbow trout. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 30 (3): 1–14.
30. Mehdizadeh, A., Shahidi, S. A., Shariatifar, N., Shiran, M., Ghorbani, A. and Saraei, H. 2022. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of the chitosan/zein flms incorporated with *Pulicaria gnaphalodes* L. extract-loaded nanoliposomes. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16: 1252–1262.
31. Montero, P., Avalos, A. and Perez-Mateos, M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition - additives and high - pressure treatment. *Food Chemistry*, 75(3): 317-324.
32. Nirmal, N. P. and Benjakul, S. 2009. Effect of ferulic acid on inhibition of polyphenoloxidase and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage. *Food Chemistry*, 116(1): 323–331.
33. Ovissipour, M., Abedian, A. M., 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: 238-242.
34. Pabast, M., Shariatifar, N., Beikzadeh, S. and Jahed, G. 2018. Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated Satureja plant essential oil on quality characteristics of lamb meat. *Food Control*, 91: 185–192.
35. Sallam, K. I., Ishioroshi, M. and Samejima, K. 2004. Antioxidants and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie (LWT)*, 37(8): 849–855.
36. Wang, Q., Lei, J., Ma, J., Yuan, G. and Sun, H. 2018. Effect of chitosan-carvacrol coating on the quality of Pacific white shrimp during iced storage as affected by caprylic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 123-129.
37. Wang, Y., Liu, L., Zhou, J., Ruan, X., Lin, J. and Fu, L. 2014. Effect of chitosan nanoparticle coatings on the quality changes of postharvest whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during storage at 4 ºC. *Food and Bioprocess Technology*, 8(4): 907-915.

38. Xia, H., Tang, Y., Huang, R., Liang, J., Ma, S., Chen, D., Feng, Y., Lei, Y., Zhang, Q., Yang, Y. and Huang, Y. 2022. Nanoliposome use to improve the stability of phenylethyl resorcinol and serve as a skin penetration enhancer for skin whitening. *Coatings*, 12: 362.
39. Yu, S. H., Hsieh, H. Y., Pang, J. C., Tang, D. W., Shih, C. M., Tsai, M. L. and et al. 2013. Active films from water-soluble chitosan/cellulose composites incorporating releasable caffeic acid for inhibition of lipid oxidation in fish oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 32: 9–19.
40. Yuan, G., Lv, H., Tang, W., Zhang, X. and Sun, H. 2016. Effect of chitosan coating combined with pomegranate peel extract on the quality of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Control*, 59: 818-823.
41. Zhang, B., Ma, L. K., Deng, S. G., Xie, C. and Qiu, X. H. 2015. Shelf-life of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by weakly acidic electrolyzed water ice-glazing and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 51: 114-121.

The effect of chitosan coating containing hydrolyzed protein nanoliposome of shrimp waste in controlling black spot and increasing shelf life of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Masume Kamali[1], Bahareh Shabanpour[1]*, Parastoo Pourashouri[1], Moazame Kordjazi[1]

1. Department of Sea Food Processing, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: b_shabanpour@yahoo.com, Tel: 01732427040

Abstract

In this study, the effect of chitosan coating containing hydrolyzed protein nanoliposome of shrimp waste on black spot control and shelf life of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during 20 days storage in ice was investigated. Hydrolyzed protein (H) was produced using alcalase enzyme and its functional properties were measured. Also, the effect of its different concentrations on inhibiting the enzyme polyphenol oxidase (PPO) of shrimp was measured. The optimal concentration of H with the highest percentage of enzyme inhibition was selected and loaded into nanoliposomes or coated with chitosan, then the shrimps were immersed in these coatings. The results showed that hydrolyzed protein (H) has protein content (81.6%), degree of hydrolysis (DH) (32.54%), and an average length of the PCL peptide chain (3.07%). Hydrolyzed protein with a concentration of 1.5% showed the highest inhibitory effect of PPO enzyme after 1 and 3 minutes with values of 60.08 and 47.98%. On the last day of storage, the Ch-N-H treatment showed the best performance in the factors of pH, peroxide value (PV), and texture (Hardness) ($P < 0.05$). Color changes in the N-H treatment had the lowest value ($P < 0.05$). The results of volatile basic nitrogen (TVN) showed that shrimps treated with Ch-N-H can be kept in ice for 16 days. The black spot of shrimps treated with different types of hydrolyzed protein coatings was significantly lower than the control treatment. These results show that hydrolyzed protein microencapsulation with nanoliposome and chitosan coating can be effective in controlling black spot and increasing shelf life of shrimp as a suitable natural alternative to sodium metabisulfite.

Key words: Nanoliposome, Hydrolyzed protein, Black Spot, Shelf life, white leg shrimp