



Effect of a maltodextrin-gum arabic composite carrier in freeze-drying on the antioxidant activity of lanternfish (*Benthosema pterotum*) bioactive peptides and core release in a simulated gastrointestinal model

Yeganeh, S.^{1*}, Reyhani Poul, S.², Tork Pahnabi, F.³, Shakerian, F.⁴

1. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2. PhD graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Laboratory expert, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran
4. MSc student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

*Corresponding author: skyeganeh@gmail.com; yeganeh@sanru.ac.ir
(Received: 2025/6/5 Accepted: 2025/9/16)

Abstract

Due to the concerns raised about the use of chemical antioxidants in food formulation, research on the use of natural compounds as alternatives has been developed. The use of these compounds in the formulation of food and pharmaceutical products requires methods that protect their structure in adverse environmental conditions and facilitate gradual release. Bioactive peptides produced from aquatic sources are one of the natural sources of antioxidants. In this research, at first, the bioactive peptides obtained from the enzymatic hydrolysis of lanternfish were nanocapsulated using the freeze-drying method and maltodextrin-gum arabic combination coating. In the next step, the antioxidant activity and stability of this property were evaluated during 60 days of storage of free peptides and carrier nanocapsules at refrigerator temperature. According to the results, nanoencapsulation of bioactive peptides using the aforementioned coating and method, in addition to increasing their antioxidant activity ($p < 0.05$), significantly contributed to the stability of this property during storage of carrier nanocapsules at 4 °C. Also, increasing the concentration of peptides and carrier nanocapsules from 100 to 200 µg/ml was associated with an increase in the ability to inhibit ABTS and Hydroxyl radicals ($p < 0.05$). According to the findings, the release rate of peptides in the SGF (Simulated Gastric Fluid) was significantly lower than SIF (Simulated Intestinal Fluid) ($p < 0.05$). Based on the results, the produced peptides have the potential to be used in food formulations as antioxidant compounds, and this potential becomes more stable with nanoencapsulation. Also, the freeze-drying method using maltodextrin-gum arabic combined coating for nanoencapsulation can properly protect the peptides against acidic and enzymatic conditions.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Lanternfish, Bioactive peptides, Nanoencapsulation, Maltodextrin, Antioxidant activity



DOI: 10.71876/jfh.2025.1211763

"مقاله پژوهشی"

اثر حامل ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی در روش خشک کردن انجمادی بر فعالیت آنتی اکسیدانی پتیدهای زیست فعال فانوس ماهی (*Benthoosema pterotum*) و رهایش هسته در مدل شبیه سازی شده دستگاه گوارش

اثر نانوکپسولاسیون بر فعالیت آنتی اکسیدانی پتیدهای زیست فعال

سکینه یگانه^{۱*}، سهیل ریحانی پول^۲، فائزه ترک پهنابی^۳، فرزانه شاکریان^۴

۱. استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲. دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳. کارشناس آزمایشگاه، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: yeganeh@sanru.ac.ir; skyeganeh@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۳/۱۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۵/۲۵)

چکیده

با توجه به نگرانی های ایجاد شده پیرامون استفاده از آنتی اکسیدان های شیمیایی در فرمولاسیون مواد غذایی، تحقیقات پیرامون استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان جایگزین، توسعه یافته اند. استفاده از این ترکیبات در فرمولاسیون مواد غذایی و همچنین فرآورده های دارویی مستلزم به کارگیری روش هایی است که از ساختار آنها در شرایط سخت محیطی حفاظت و به رهایش تدریجی کمک کنند. پتیدهای زیست فعال تولید شده از آبزیان یکی از منابع آنتی اکسیدانی با منشأ طبیعی هستند. در این تحقیق، ابتدا پتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی فانوس ماهی با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی نانوریزپوشانی شدند. در مرحله بعد، فعالیت آنتی اکسیدانی و پایداری این خصوصیت طی ۶۰ روز نگهداری پتیدهای آزاد و نانوکپسول های حامل در دمای یخچال ارزیابی شدند. مطابق نتایج، نانوریزپوشانی پتیدهای زیست فعال با پوشش و روش مذکور، علاوه بر اینکه موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنها شد ($p < 0.05$)، بلکه به پایداری این خصوصیت طی نگهداری نانوکپسول های حامل در دمای ۴ درجه سلسیوس کمک قابل توجهی کرد. همچنین افزایش غلظت پتیدها و نانوکپسول های حامل از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، با افزایش قدرت مهار رادیکال های ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) و هیدروکسیل (OH) همراه بود ($p < 0.05$). مطابق یافته ها، میزان رهایش پتیدها در محیط مشابه معده، به صورت قابل ملاحظه ای کمتر از محیط مشابه روده بود ($p < 0.05$). بر اساس نتایج، پتیدهای تولید شده قابلیت استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان را دارا هستند که این قابلیت با نانوکپسولاسیون بیشتر و پایدارتر می شود. همچنین، روش خشک کردن انجمادی با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی به منظور نانوکپسولاسیون می تواند از پتیدها در برابر شرایط اسیدی و آنزیمی محافظت کند.

واژه های کلیدی: فانوس ماهی، پتیدهای زیست فعال، نانوریزپوشانی، مالتودکسترین، فعالیت آنتی اکسیدانی

مقدمه

ازجمله راه‌های مدیریت آبریزان دارای بازارپسندی بسیار کم، تولید محصولاتی با ارزش افزوده نظیر بیوسیلارژ، کیتین، کیتوزان، ژلاتین، رنگ‌دانه‌های مختلف مانند آستاگرانترین و فیکوسیائین، پلی ساکاریدهای سولفات ازجمله فوکوئیدان و آلژینات، کودهای بیولوژیک و ... است (Gharekhan et al., 2019; Santos et al., 2020; Safari et al., 2021; Safari et al., 2022a,b; Rocha-Pimienta et al., 2023; Reyhani Poul et al., 2024).

پروتئین‌های هیدرولیز شده یکی دیگر از ترکیباتی هستند که می‌توان از منابع مذکور تولید کرد (Reyhani Poul and Yeganeh, 2021). این پروتئین‌ها حاوی پپتیدهای زیست فعال هستند. پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که معمولاً ۲ تا ۲۰ آمینواسید و وزن مولکولی ۶۰۰۰ دالتون دارند و در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال‌اند. اما وقتی توسط آنزیم و یا فرآیند تخمیر از دیگر آمینواسیدهای موجود در ساختار پپتید جدا می‌شوند، فعالیت زیستی آن‌ها شروع می‌گردد. ازجمله خواص مهم پپتیدهای زیست فعال در صنایع غذایی و داروسازی، می‌توان به فعالیت امولسیفایری، کف‌زایی، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اشاره کرد (Korczech et al., 2015; Reyhani Poul et al., 2018; Reyhani Poul and Jafarpour, 2020; Ben et al., 2020; Yeganeh and Reyhani Poul, 2022; Alahmad et al., 2023).

اکسیداسیون چربی‌ها در مواد غذایی، علاوه بر ایجاد اختلال در ارزش تغذیه‌ای (آسیب به پروتئین‌ها، بلوکه شدن و اکسیداسیون اسیدآمینه‌های ضروری، کاهش فعالیت امولسیفایری و حلالیت

پروتئین‌ها، تولید هیدروپراکسیدها، آلدئیدها، اپوکسیدها، دیمرها، اکسی کلسترول‌ها و اسیدهای چرب ترانس و محصولات نوع میلارد) و حسی ماده غذایی (طعم رنسید، رنگ، بو و بافت نامطلوب)، می‌تواند سبب آغاز فرایندهای اکسیداتیو در بدن انسان شود. به‌منظور جلوگیری از بروز چنین مشکلاتی و همچنین افزایش زمان ماندگاری، از آنتی اکسیدان‌ها استفاده می‌شود. با توجه به وجود نگرانی در زمینه به‌کارگیری آنتی اکسیدان‌های شیمیایی برای سلامتی مصرف‌کنندگان، استفاده از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی بسیار حائز اهمیت شده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای زیست فعال یکی از انواع آن‌ها هستند (Ng et al., 2024).

در صورت استفاده از پپتیدهای زیست فعال در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان آنتی اکسیدان، به‌منظور حفظ و یا ارتقاء این خاصیت در آن‌ها (پپتیدها)، لازم است تکنیک‌های حفاظتی مقتضی بکار گرفته شوند. چراکه هر ماده غذایی شرایط تولید و نگهداری خاصی دارد و ممکن است پپتیدهای زیست فعالی که جهت به تاخیر انداختن اکسیداسیون به فرمولاسیون ماده غذایی اضافه می‌شوند، دچار تغییرات ساختاری نامطلوبی شوند که نتیجه آن اختلال در عملکرد است. پپتیدهای زیست فعال بسته به نوع منبع، روش و شرایط تولید، وزن مولکولی، پروفیل اسیدهای آمینه، درجه هیدرولیز و ... پس از مصرف توسط انسان می‌توانند اثرات فیزیولوژیکی خاصی (مانند تنظیم‌کنندگی فشارخون، تقویت-کنندگی سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و اثرات ضد میکروبی) بر بدن اعمال کنند (Sánchez and Vazquez, 2017). اعمال این اثرات بر بدن، مشروط

(۱-۵ سانتی-متر) غالباً به‌عنوان غذای انسان قابل مصرف نیستند. ارزش غذایی بالا، عدم مصرف انسانی به‌صورت مستقیم و فراوانی زیاد، همگی موجب شده‌اند که این خانواده به‌عنوان منبع مطلوبی در تولید فرآورده‌های باارزش افزوده مطرح باشند (Shaviklo, 2000).

ریزپوشانی (نانوکپسولاسیون) پتیدهای استخراج‌شده از آبزیان به‌منظور ارتقاء خواص عملکردی، فیزیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی آن‌ها در بسیاری از مطالعات موردبررسی قرار گرفته و نتایج درخور توجهی نیز ارائه‌شده است (Mosquera et al., 2014; Zavareze et al., 2014; Ramezanzadeh et al., 2017; Ojagh et al., 2022). در تحقیقی که پتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز ضایعات ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با آنزیم آلکالاز در قالب نانولیپوزوم و با پوشش کیتوزان ریزپوشانی شدند، ارتقاء خواص فیزیکی و رهایش تدریجی پتیدها در محیط‌های مشابه روده و معده گزارش شد (Hasani et al., 2019). همچنین در پژوهش دیگری که پتیدهای حاصل از هیدرولیز ضایعات میگو (با استفاده از آنزیم نئوتراز) با پوششی مشابه تحقیق مذکور نانوکپسوله شدند، علاوه بر بهبود خواص فیزیکی پتیدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد فشارخونی آن‌ها نیز ارتقا یافت (Yeganeh and Reyhani Poul, 2022).

هدف تحقیق حاضر تولید پتیدهای زیست فعال از فانوس ماهی با استفاده از روش آنزیمی و سپس نانوکپسولاسیون آن‌ها با استفاده از تکنیک خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین و صمغ عربی است. در مرحله بعد فعالیت

به ورود این پتیدها با ساختار سالم به جریان خون است. این در حالی است که شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش مانعی در تحقق این امر هستند. به‌منظور غلبه بر چالش‌های فوق‌الذکر، شاید مطلوب‌ترین روش، ریزپوشانی باشد. طی این فرایند کپسولی اطراف پتیدها ایجاد می‌شود که از تغییرات ساختاری آن‌ها در شرایط نامساعد جلوگیری می‌کند. همچنین کپسول‌های تشکیل‌شده اطراف پتیدها، محتویات خود را با سرعت کنترل‌شده و شرایط ویژه رها می‌کنند (Hasani et al., 2019; Safari et al., 2022a,b; Reyahni Poul and Yeganeh, 2022). فرآیند ریزپوشانی، از ترکیبات کربوهیدراتی، سلولزی، پروتئینی و لیپیدی جهت پوشش ترکیبات فعال استفاده می‌شود. مالتودکسترین و صمغ عربی به دلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد کربوهیدراتی (پلی-ساکاریدی) جهت ریزپوشانی مواد محسوب می‌شوند (Sarabandi et al., 2019; Akbarbaglu et al., 2021).

خانواده بزرگ فانوس ماهیان یا میکتوفیده (*Myctophidae*) با زیست‌توده ۵۵۰ تا ۶۵۰ میلیون تن، حدود ۷۰ درصد از ماهیان مزوپلاژیک آب‌های آزاد را تشکیل می‌دهند (Shaviklo and Moradi, 2019). در بین گونه‌های مختلف فانوس ماهیان، گونه غالب، بتوزوما پتروتوم (*Benthosema pterotum*) است که با نام فانوس ماهی شناخته می‌شود. خانواده فانوس ماهیان، علی‌رغم غنی بودن از نظر پروتئین باکیفیت و مواد معدنی فراوان (Kazemi et al., 2024)، به دلیل مقادیر بالای استرواکس در چربی و همچنین ساین بسیار کوچک

آنتی اکسیدانی فرم آزاد پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل بررسی و مقایسه می‌شوند. ضمن اینکه به منظور ارزیابی میزان کارایی پوشش ترکیبی و روش خشک کردن انجمادی در حفاظت از هسته در برابر شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش، از محیط‌های شبیه سازی شده معده (Simulated Gastric Fluid) و روده (Simulated Intestinal Fluid) استفاده و میزان رهایش هسته بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

- سوبسترا، آنزیم و باکتری‌ها

فانوس ماهی از صیادان محلی بندرعباس پس از پهلوییگری کشتی صید ترال خریداری گردید. سپس ماهی در باکس ۵ کیلوگرمی که محتوی یخ بود، بسته بندی شد و در کوتاه ترین زمان ممکن با هواپیما به تهران و سپس به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایشات در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید. آنزیم مورد استفاده در این پژوهش، آنزیم (تجاری) میکروبی پروتامکس (میزان فعالیت: ۱/۵ واحد آنسون به ازای یک میلی-لیتر آنزیم) مستخرج از باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) بود که از نمایندگی شرکت نووزایم (Novozyme) دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

- تولید پروتئین هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال

به منظور آماده سازی سوبسترا، وزن مشخصی از فانوس ماهی از فریزر خارج شد و با قرارگیری در دمای یخچال (4 ± 1 درجه سلسیوس) به مدت ۲۴ ساعت انجمادزدایی صورت گرفت. سپس نمونه با

آب سرد شستشو و نهایتاً به طور کامل چرخ شد. به منظور آغاز واکنش هیدرولیز، ابتدا در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ۱۰۰ گرم نمونه (فانوس ماهی چرخ شده) قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی لیتر 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 سلسیوس قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت غیرفعال شوند. پس از سپری شدن این زمان به ارلن اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در مرحله بعد آنزیم پروتامکس (نووزایم، دانمارک) به میزان ۳۰ واحد آنسون (به ازای یک کیلوگرم سوبسترای پروتئینی) به ارلن مربوطه اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سلسیوس منتقل و ۹۰ دقیقه در این شرایط انکوبه گردید تا فرایند هیدرولیز پروتئین‌ها انجام شود. بعد از این زمان‌ها، به منظور قطع واکنش هیدرولیز، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از این مدت و خنک شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه با دور $g 8000$ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد (Ovissipour et al., 2012). لازم به ذکر است شرایط هیدرولیز (دما، زمان، میزان آنزیم و pH) بهینه یابی و سپس حدود بهینه لحاظ شدند.

- درجه هیدرولیز و بازیابی پروتئین فرایند

بعد از پایان فرایند هیدرولیز، محلول تری-کلرواستیک اسید (مرک، آلمان) ۲۰ درصد با نسبت برابر به سوپرناتانت افزوده شد و محلول حاصل با دور $g 6700$ در دمای ۴ درجه سلسیوس 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 تری کلرواستیک اسید به نیتروژن کل نمونه به صورت درصد محاسبه شد. بازیابی پروتئین با استفاده از نسبت (گرم پروتئین هیدرولیز شده/میزان نیتروژن پروتئین هیدرولیز شده) بر (گرم سوپسترا/میزان نیتروژن سوپسترا) به صورت درصد بدست آمد (Ovissipour et al., 2012).

- آنالیز تقریبی سوپسترا و پودرهای هیدرولیز شده

به منظور تعیین میزان رطوبت، ۱ گرم نمونه در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس (آون، Fanazma gostar, BM 55) تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. درصد رطوبت نمونه بر پایه اختلاف وزن اولیه از وزن ثانویه محاسبه شد. از قراردادن نمونه در یک کوره (FM.2.8) با دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس و تفاوت وزن، مقدار خاکستر تعیین گردید. جهت ارزیابی محتوی چربی و نیتروژن نیز به ترتیب از روش استخراج کلدال و سوکسله استفاده شد. پروتئین خام نمونه از طریق ضریب ۶/۲۵ در محتوای نیتروژن اندازه گیری گردید (AOAC, 2002).

- جداسازی پپتیدها

به منظور جداسازی پپتیدها 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، ۳ تا ۳۰ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتون در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰g سانتریفیوژ (Sigma، kl

۱۶-۲، اسپانیا) شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۳۰ کیلودالتون مجدداً با استفاده از فیلتر آمیکون ۳ کیلودالتون در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰g سانتریفیوژ سانتریفیوژ گردید. بدین ترتیب پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون، بین ۳ و ۳۰ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند (Yaghoubzadeh et al., 2017). از آنجا که بر اساس نتایج پیش تست، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون عملکردی مطلوب تری نسبت به دو وزن دیگر از خود نشان دادند، این وزن برای انجام عملیات های مختلف انتخاب شد.

- نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال

به منظور نانو ریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین (سیگما، آلمان) و صمغ عربی (سیگما، آلمان) با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از صمغ عربی در آب مقطر تهیه (۴ گرم در ۵۰ میلی لیتر) و با قراردادن بر روی همزن مغناطیسی و دمای ۴۵ درجه برای مدت ۳۰ دقیقه، سوسپانسیون همگنی از آن حاصل شد. محلول حاوی صمغ عربی (پس از کاهش دما به ۲۵ درجه) به محلول دارای مالتودکسترین اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه جهت افزایش جذب آب نگهداری گردید. در مرحله انتهایی، ۲ گرم از پپتیدهای زیست فعال (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) به محلول حاوی پوشش ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher,

پوشش و A، مقدار پپتیدهای اضافه‌شده در ابتدای آزمایش است.

رابطه ۱

$$EE (\%) = (FA - A) / A$$

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در دو فرم آزاد و نانو ریزپوشانی‌شده

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال در دو فرم آزاد و نانو ریزپوشانی‌شده (غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با استفاده از دو آزمون فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS و قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ روز (نگهداری در دمای یخچال یا 4 ± 1 درجه سلسیوس) ارزیابی گردید. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل با دو آنتی‌اکسیدان شیمیایی بوتیل هیدروکسی‌آنیزول (Butylated hydroxyanisole) و بوتیل هیدروکسی-تولون (Butylated hydroxytoluene) در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقایسه شدند.

- فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

ابتدا محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات (مرک، آلمان) $2/45$ 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 0.7 ± 0.2 در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه ۲ تعیین و به صورت درصد گزارش شد (Alemán et al., 2011).

UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سلسیوس) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، JKa، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سلسیوس منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار 0.051 میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سلسیوس خشک گردید (Safari et al., 2022a).

- ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

شاخص‌های میانگین اندازه ذره‌ای و پراکندگی ذرات پس از رقیق‌کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی (Phosphate-buffered saline) به روش تفرق نور پویا (Dynamic Light Scattering) با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض 0.1 متر) اندازه‌گیری شدند. به منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. در این روش نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات ($pH=7.4$) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سلسیوس و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم-تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) انجام شد (Hasani et al., 2019). بازده فرآیند نانوریزپوشانی نیز با استفاده از روش Yan و همکاران (۲۰۱۴) و از طریق رابطه ۱ تعیین گردید. در این رابطه، FA، مقدار پپتیدهای فاقد

رابطه ۲ $\times 100$ [جذب نمونه شاهد / (جذب نمونه - جذب نمونه شاهد)] = قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS

- قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن آبدار (با غلظت ۱۰ میلی مول)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (Ethylenediamine tetra acetic acid؛ با غلظت ۱۰ میلی مول)، ۲۰۰ میکرولیتر دی اکسی ریبوز (با غلظت ۱۰ میلی مول)، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه و یک میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۷/۴) مخلوط شدند. در مرحله بعد به این ترکیب، ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه (با غلظت ۱۰ میلی مول) اضافه و مخلوط حاصل ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباتور قرار گرفت. پس از این زمان، یک میلی لیتر TCA (Trichloroacetic acid) ۲/۸ درصد و یک میلی لیتر TBA (Thiobarbituric acid) ۲۰ میلی مول به این مخلوط اضافه شد. این نمونه ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و نهایتاً پس از سرد شدن جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل از رابطه ۳ محاسبه و به صورت درصد گزارش شد (Chung et al., 1997).

رابطه ۳ $\times 100$ (جذب شاهد/جذب نمونه - ۱) = قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (%)

- رهایش محصول در محیط‌های شبیه سازی شده معده (SGF: Simulated gastric fluid) و روده (SIF: Simulated intestinal fluid) انسان

به منظور طراحی محیطی مشابه معده، ۱۰۰ میلی گرم آنزیم پپسین (مرک، آلمان) در ۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۳۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید

غلظت حل شد. در ادامه، ۱۰۰ میلی گرم کلرید سدیم به محلول اضافه گردید. حجم نهایی این محلول با استفاده از آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر و pH آن به ۱/۲ تنظیم شد. با توجه به اینکه زمان تخلیه معده برای یک وعده غذایی استاندارد ۱۱۲ دقیقه است (Cann et al., 1983)، محصول تولید شده به مدت ۲ ساعت در محیط SGF قرار گرفت. به منظور آماده سازی محیطی مشابه روده، در ابتدا ۳۴۰ میلی گرم پتاسیم فسفات مونوبازیک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. در مرحله بعد، ۴ میلی لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۲ مولار و ۵۰۰ میلی گرم پانکراتین (مرک، آلمان) به محلول تهیه شده اضافه گردید. در نهایت حجم و pH نهایی محلول به ترتیب به ۵۰ میلی لیتر و ۶/۸ تنظیم شد. با توجه به اینکه زمان عبور غذا از روده کوچک ۲ تا ۴ ساعت است (Davis et al., 1986)، زمان انکوباسیون محصول در این محیط ۴ ساعت در نظر گرفته شد. جهت انجام آزمایش، ۲۰ میکرولیتر نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست فعال تا رسیدن به حجم یک میلی لیتر رقیق و در تیوب‌های میکروسانتریفوژ با هر دو محلول ساخته شده (SGF و SIF) توسط ترمومیکسر به طور مداوم انکوبه شدند. در فواصل زمانی ۰/۵ ساعت، مقادیر پروتئین‌های هیدرولیز شده (پپتیدها) به روش تشخیص با کیت BCA (Bicinchoninic acid) اندازه گیری گردید (Hasani et al., 2019).

- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (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 ۱۶) جهت رسم جداول و نمودارها استفاده گردید.

یافته‌ها

- خصوصیات فرآیند هیدرولیز و ترکیب شیمیایی سوبسترا و پودر هیدرولیز شده

در جدول (۱) 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 $21/53 \pm 1/86$ و بازیابی پروتئین $92/67 \pm 1/24$ درصد ثبت شد.

جدول (۱) - آنالیز فرایند هیدرولیز، سوبسترا و پودر پروتئین هیدرولیز شده (درصد)

تیما	شاخص				
	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر	درجه هیدرولیز
سوبسترا	$21/04 \pm 0/71$	$2/96 \pm 0/57$	$66/32 \pm 1/43$	$7/89 \pm 0/68$	
پودر پروتئین هیدرولیز شده	$93/21 \pm 1/46$	$0/23 \pm 0/03$	$0/65 \pm 0/1$	$3/7 \pm 0/09$	$21/53 \pm 1/86$

*داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار می‌باشند

- خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل پیتیدهای زیست‌فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی در جدول (۲) 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 بازده فرایند نانوریزپوشانی نیز $89/12 \pm 3/05$ درصد ثبت شد.

جدول (۲) - خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل پیتیدهای زیست‌فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی

خواص فیزیکی	سطح
میانگین سایز ذرات (نانومتر)	$293/6 \pm 2/83$
شاخص توزیع اندازه ذره‌ای	$0/398 \pm 0/06$
پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	$+41/26 \pm 1/53$
بازده ریزپوشانی (درصد)	$89/12 \pm 3/05$

داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار می‌باشند

- فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدهای آزاد و نانوکپسوله طی زمان نگهداری

در جداول (۳) و (۴)، به ترتیب فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و هیدروکسیل پیتیدهای

آزاد و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها ارائه شده است. همانطور که در این جداول مشاهده می‌شود، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پیتیدها در هر دو فرم و سه زمان، با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۲۰۰ میکروگرم بر

میلی‌لیتر به صورت معنی‌داری افزایش یافته است ($p < 0/05$). مطابق نتایج، با نانوریزپوشانی پتیدهای زیست‌فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای بیشتر شد و نانوکپسول‌ها مقادیر بیشتری از فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS و هیدروکسیل را نسبت به پتیدهای آزاد ارائه کردند ($p < 0/05$). در ادامه مشخص شد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (در هر دو تست) فرم آزاد پتیدها در طول زمان نگهداری به صورت معنی‌داری کاهش یافته است ($p < 0/05$). در مقابل، این فعالیت در نانوکپسول‌ها در طول زمان

نگهداری، ثابت و بدون تغییر معنی‌دار باقی ماند ($p > 0/05$). حداکثر میزان فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و هیدروکسیل پتیدهای آزاد مربوط به روز صفر و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (به ترتیب $59/43 \pm 0/37$ و $76/45 \pm 1/31$ درصد). مقادیر این دو آزمون در نانوکپسول‌ها در طول زمان، ثابت و بیشترین حد آن‌ها در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. این مقادیر به ترتیب حدود ۷۱ و ۸۴ درصد برای آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS و هیدروکسیل اندازه‌گیری شدند.

جدول (۳)-درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS پتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ نگهداری در دمای یخچال (4 ± 1 درجه سلسیوس)

زمان نگهداری (روز)	غلظت (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	فرم پتیدهای زیست‌فعال		کنترل مثبت	
		آزاد	نانوکپسوله	بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)	بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)
صفر	۱۰۰	$67/18 \pm 1/11^{Bc}$	$57/38 \pm 1/75^{Ab}$	$92/15 \pm 2/65^A$	$81/56 \pm 1/35^B$
	۲۰۰	$59/43 \pm 0/37^{Da}$	$71/14 \pm 1/39^{Ca}$		
	۱۰۰	$41/28 \pm 0/64^{Bd}$	$57/88 \pm 1/16^{Ab}$		
۳۰	۲۰۰	$51/44 \pm 0/81^{Bb}$	$70/99 \pm 2/26^{Aa}$	$92/15 \pm 2/65^A$	$81/56 \pm 1/35^B$
	۱۰۰	$34/28 \pm 0/42^{Be}$	$58/02 \pm 1/65^{Ab}$		
۶۰	۲۰۰	$41/35 \pm 1/51^{Bd}$	$71/09 \pm 1/96^{Aa}$		

داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ به ترتیب در هر ستون و سطر نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها هستند ($p < 0/05$).

جدول (۴)- درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسولهای حامل آنها در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ نگهداری در دمای یخچال ($\pm 4^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس)

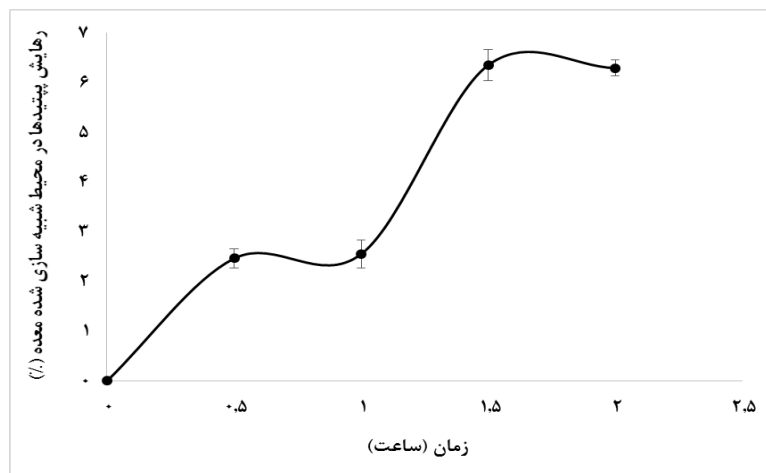
زمان نگهداری (روز)	غلظت (میکروگرم بر میلی لیتر)	فرم پپتیدهای زیست فعال		کنترل مثبت	
		آزاد	نانوکپسوله	بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)	بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)
صفر	۱۰۰	$62/54 \pm 1/02^{Bb}$	$73/47 \pm 2/14^{Ab}$	$95/33 \pm 2/54^A$	$84/58 \pm 2/31^B$
	۲۰۰	$76/45 \pm 1/31^{Ca}$	$84/55 \pm 1/63^{Ba}$		
۳۰	۱۰۰	$54/72 \pm 0/97^{Bc}$	$74/06 \pm 1/48^{Ab}$	$85/12 \pm 2/01^{Aa}$	$73/92 \pm 1/57^{Ab}$
	۲۰۰	$62/83 \pm 1/17^{Bb}$	$85/12 \pm 2/01^{Aa}$		
۶۰	۱۰۰	$40/37 \pm 0/85^{Be}$	$73/92 \pm 1/57^{Ab}$	$84/72 \pm 2/25^{Aa}$	$84/72 \pm 2/25^{Aa}$
	۲۰۰	$49/23 \pm 1/68^{Bd}$	$84/72 \pm 2/25^{Aa}$		

داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف می‌باشند. حروف کوچک و بزرگ به ترتیب در هر ستون و سطر نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی-دار بین داده‌ها هستند ($p < 0/05$).

- میزان رهائش پپتیدهای زیست فعال از نانوکپسول‌ها

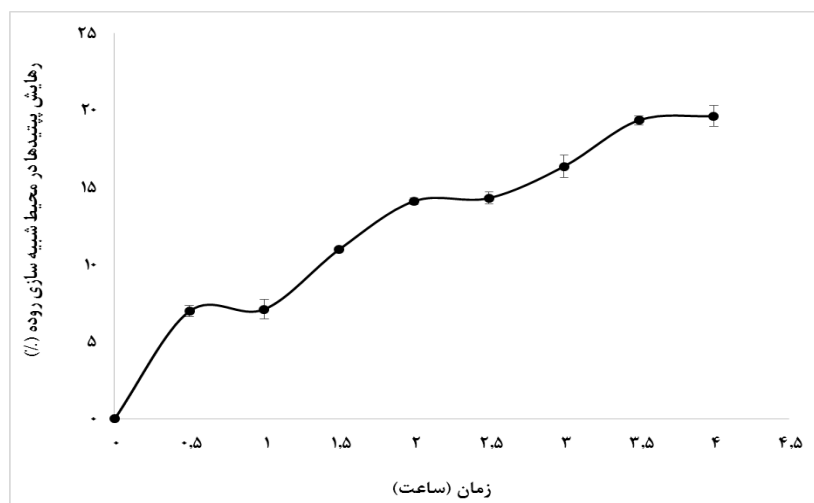
اشکال (۱) و (۲)، پروفیل رهائش پپتیدها از نانوکپسول‌ها را در شرایط و محیط‌های مشابه دستگاه گوارش انسان نشان می‌دهند. مطابق این نمودارها، میزان رهائش پپتیدها از نانوکپسول‌های حامل در محیط مشابه معده (SGF , $\text{pH}=1.2$)، به صورت قابل

ملاحظه‌ای کمتر از میزان رهائش در محیط مشابه روده (SIF , $\text{pH}=6.8$) است. در SGF ، میزان رهائش پپتیدها از $2/46 \pm 0/19$ تا $6/29 \pm 0/16$ درصد متغیر بود اما در SIF ، این میزان در محدوده $6/98 \pm 0/36$ تا $19/64 \pm 0/67$ درصد قرار داشت.



شکل (۱)- نمودار پروفیل رهائش پپتیدها در محیط شبیه‌سازی شده معده (SGF).

داده‌ها به صورت میانگین همراه با انحراف می‌باشند.



شکل (۲) - پروفیل رهایش پتیدها در محیط شبیه سازی شده روده (SIF).

داده ها به صورت میانگین همراه با انحراف معیار می باشند

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش مشخص شد پتیدهای زیست فعال حاصل از آنزیم پروتامکس در وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون (درجه هیدرولیز 21.53 ± 1.86 درصد) و نانوکپسول های حامل آن ها با پوشش ترکیبی مالتودکسترین - صمغ عربی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند. پتیدهای زیست فعال در فرم آزاد، روز صفر و غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر بودند حدود ۶۰ درصد از رادیکال های آزاد ABTS و ۷۷ درصد از رادیکال های هیدروکسیل را مهار کنند که این ارقام برای نانوکپسول های حامل پتیدهای زیست فعال به ترتیب حدود ۷۱ و ۸۴ درصد اندازه گیری شد. در تحقیقات مختلفی وجود فعالیت آنتی اکسیدانی در پروتئین های هیدرولیز شده (پتیدهای زیست فعال) ثابت شده است (Mohanty et al., 2021; Czelej et al., 2022; Alahmad et al., 2023). در پژوهشی که

خواص پتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پوست ماهی قزل آلائی رنگین کمان با استفاده از آنزیم آلکالاز مورد بررسی قرار گرفت، فعالیت آنتی - اکسیدانی پتیدهای زیر ۳ کیلودالتون تأیید گردید (Yaghoubzadeh et al., 2017). طی تحقیقی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیزی تولید شده از ضایعات ماهی قزل آلائی رنگین کمان با استفاده از آنزیم های نئوتراز و پروتامکس تأیید شد (Reyhani Poul et al., 2018). پتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز ضایعات میگو با استفاده از آنزیم نئوتراز در وزن کمتر از ۳ کیلودالتون دارای قابلیت مهار رادیکال های ABTS و DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) بودند (Yeganeh and Reyhani, 2022). عوامل مختلفی مانند منبع سوبسترا، نوع آنزیم مصرفی جهت هیدرولیز، شرایط هیدرولیز از جمله دما، زمان و پی اچ، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی و پروفیل اسیدهای آمینه در این زمینه موثر

هستند (Nalinanon et al., 2011; Elavarasan et al., 2014; Najafian and babji, 2018; Ramzanzadeh et al., 2018; Reyhani Poul and Yeganeh, 2021; Reyhani Poul et al., 2021; Ma et al., 2022; Moreira et al., 2023).

در این تحقیق، انجام فرآیند نانوکپسولاسیون، علاوه بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی (در هر دو روش مورد بررسی) پپتیدهای زیست فعال، به پایداری این فعالیت در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال نیز منجر شد. به این معنی که نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی نسبت به پپتیدهای آزاد قابلیت بیشتری برای مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و هیدروکسیل داشتند؛ ضمن اینکه از فعالیت مهار نانوکپسول‌ها بر خلاف پپتیدهای آزاد در طول دوره نگهداری کاسته نشد (۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال). افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال با انجام عمل نانوکپسولاسیون می‌تواند مربوط به افزایش سطح تماس باشد. همچنین پایداری فعالیت آنتی اکسیدانی نانوکپسول‌ها (در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال) احتمالاً بدین صورت قابل توجیه است که پوشش ترکیبی مورد استفاده (مالتودکسترین-صمغ عربی) توانسته از ساختار هسته (پپتیدهای زیست فعال) در برابر شرایط محیطی از جمله دمای یخچال، رطوبت و ... محافظت و خواص آن را حفظ کند. در پژوهشی که رنگدانه آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک هماتوکوکوس پلویالیس (*Haematococcus pluvialis*) با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم و روش خشک کردن انجمادی نانوریزپوشانی شد، افزایش فعالیت آنتی-

اکسیدانی و پایداری این فعالیت (دوره نگهداری ۳۰ روزه در دمای یخچال) در آستاگزانتین گزارش گردید (Yeganeh and Reyhani Poul, 2023). در تحقیق دیگری ثابت شد که نانوکپسولاسیون رنگدانه فیکوسیانین با استفاده از پوشش‌های مالتودکسترین و کازئینات سدیم (روش خشک کردن انجمادی) می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی رنگدانه را تقویت و به پایداری این خاصیت (دوره نگهداری ۶۰ روزه در دمای یخچال) کمک کند (Safari et al., 2022a). یافته‌های دو پژوهش مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند. در مقابل، در مطالعه‌ای که پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو در قالب نانولیپوزوم ریزپوشانی شدند، مشخص شد که فعالیت آنتی اکسیدانی در پپتیدهای زیست فعال آزاد و نانولیپوزوم‌های حامل آن‌ها اختلاف معنی‌داری ندارند (Yeganeh and Reyhani Poul, 2022). همچنین طی پژوهشی که کازئین با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین، هیدرولیز و پودرهای حاصل با پوشش ترکیبی مالتودکسترین و صمغ عربی ریزپوشانی شدند، فعالیت آنتی اکسیدانی نانوکپسول‌ها در مقایسه با هیدرولیزشده‌ها نه تنها بیشتر نشد بلکه کاهش یافت که این نتیجه با یافته‌های پژوهش حاضر مغایرت دارد (Akbarbaglu et al., 2021).

نتایج این پژوهش نشان داد پپتیدهای زیست فعال تولیدشده نسبت به آنتی اکسیدان‌های شیمیایی BHT و BHA دارای فعالیت آنتی اکسیدانی کمتری هستند که این مورد با سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه مطابقت دارد (Elavarasan et al., 2014; Reyhani Poul et al., 2018). لازم به ذکر است که آنتی اکسیدان‌های طبیعی به دلیل قدرت کمتر نسبت

آنتی اکسیدان‌های شیمیایی اگر در غلظت‌های بالاتر استفاده شوند، قابلیت رقابت با آنتی اکسیدان‌های شیمیایی را خواهند داشت (Yaghoubzadeh et al., 2017). در تحقیق پیش‌رو، فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل نانوکپسول‌های حامل در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با آنتی اکسیدان شیمیایی بوتیل هیدروکسی تولوئن اختلاف معنی‌داری نداشت که این یافته نشان‌دهنده پتانسیل بالای نانوکپسول‌های حامل تولیدشده به منظور جایگزینی با آنتی اکسیدان‌های شیمیایی است.

در پژوهش حاضر، به منظور ارزیابی کارایی تکنیک نانوریزپوشانی با روش خشک کردن انجمادی و همچنین پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی در حفاظت از پپتیدهای زیست‌فعال در دستگاه گوارش، از محیط‌های اسیدی و آنزیمی مشابه شرایط معده و روده استفاده شد و نتایج نشان داد که میزان رهایش پپتیدهای زیست‌فعال از نانوکپسول‌ها در شرایط خنثی (محیط مشابه روده)، بیشتر از شرایط اسیدی (محیط مشابه معده) است. به نظر می‌رسد pH‌های خنثی و همچنین آنزیم پانکراتین اثرگذاری و نفوذ بیشتری (نسبت به pH اسیدی و آنزیم پپسین) به ساختار دیواره (مالتودکسترین-صمغ عربی) داشتند و از طریق تخریب آن، موجب رهاسازی هسته (پپتیدهای زیست‌فعال) شدند. مطابق نتایج پژوهش حاضر، بخش قابل توجهی از پپتیدهای زیست‌فعال طی فرایند هضم مصنوعی، در نانوکپسول‌ها به صورت سالم و دست‌نخورده باقی ماندند که این مورد، مطلوب و تحقق هدف پژوهش است. در پژوهشی که نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات

میگو با (و بدون) پوشش کیتوزان ریزپوشانی و پروفیل رهایش آن‌ها در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF) و روده (SIF) ارزیابی شد، میزان رهایش در SIF بیشتر از SGF بود (Reyhani Poul and Yeganeh, 2022). در تحقیقی که پروفیل رهایش فیکوسیانیین از نانوکپسول‌های حامل با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم در دو محیط با pHهای ۱/۲ و ۷/۴ (فاقد آنزیم‌های پپسین و پانکراتین) ارزیابی شد، میزان رهایش رنگدانه در محیط خنثی بیشتر از محیط اسیدی بود (Safari et al., 2022b). در پژوهشی که رنگدانه آستاگزانتین با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم نانوریزپوشانی و سپس نانوکپسول‌های حامل رنگدانه در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده (SGF) و روده (SIF) رها شدند مشخص شد که میزان رهایش آستاگزانتین از نانوکپسول‌ها در شرایط خنثی (محیط مشابه روده)، بیشتر از شرایط اسیدی (محیط مشابه معده) است (Yeganeh and Reyahni Poul, 2023). در مطالعه‌ای که پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی (آلکالاز) ضایعات ماهی کپور معمولی در قالب نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان ریزپوشانی شدند، میزان رهایش پپتیدها در SIF بیشتر از SGF گزارش شد (Hasani et al., 2019). یافته‌های چهار پژوهش مذکور با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشتند و آن‌ها را تأیید کردند.

پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی فانوس‌ماهی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون می‌توانند در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی با ماهیت طبیعی و ایمن مورد استفاده قرار گیرند. همچنین می-

توان حد و پایداری این قابلیت در پپتیدهای زیست-فعال را با استفاده از تکنیک نانوریزپوشانی (پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی و روش خشک کردن انجمادی) به شکل قابل توجهی ارتقا داد. در ادامه می توان ادعا کرد که ترکیب مالتودکسترین و صمغ عربی (به عنوان دیواره نانوکپسول ها) به عنوان یک سد محکم به منظور

حفاظت از ساختار پپتیدهای زیست فعال در برابر شرایط اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش مطرح است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و بر اساس قرارداد شماره ۰۳-۱۴۰۴-۰۳ انجام شده است. بدین وسیله از این حمایت صمیمانه قدردانی می شود.

منابع

- AOAC. (2002). Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- 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.
- Akbarbaglu, Z., Kamali Shojaei, A., and Sarabandi, Kh. (2021). Effect of maltodextrin and gum Arabic carriers on the physicochemical properties and antioxidant activity of spray dried casein hydrolysates. Journal of Food Sciences and Technology, 107(17): 131-145
- Alahmad, K., Noman, A., Xia, W., Jiang, Q., and Xu, Y. (2023). Influence of the enzymatic hydrolysis using flavourzyme enzyme on functional, secondary structure, and antioxidant characteristics of protein hydrolysates produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). Molecules, 28(2): 51-69.
- Ben, S., Krichen, F., and Kechaou, N. (2020). Feather protein hydrolysates: a study of physicochemical, functional properties and antioxidant activity. Waste and Biomass Valorization, 11 (1): 51-62.
- Cann, P. A., Read, N. W., Cammack, J., Childs, H., Holden, S., Kashman, R., and Weller, J. (1983). Psychological stress and the passage of a standard meal through the stomach and small intestine in man. Gut, 24(3): 236-240.
- Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Journal of Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 61 (1): 118 –123.
- Czelej, M., Garbacz, K., Czernecki, T., Wawrzykowski, J., and Waśko, A. (2022). Protein hydrolysates derived from animals and plants—a review of production methods and antioxidant activity. Foods, 11(13): 1953.
- Davis, S. S., Hardy, J. G., and Fara, J. W. (1986). Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. Gut, 27(8): 886-892.
- Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., and Shamasundar, B. A. (2014). Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the Nature of Enzyme. Journal of Food Processing and Preservation, 38(3): 1207-1214.

- Galla, N. R., Pamidighantam, P. R., Akula, S., and Karakala, B. (2012). Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry*, 135(3): 1479-1484.
- 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 [In Persian].
- Hasani, Sh., Shahidi, M. and Ojagh, 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 Industry*. 8 (1): 31-44 [In Persian]
- Korczek, K., Tkaczewska, J., and Migdał, W. (2018). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates in fish products—a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(3): 195-207.
- 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.
- Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., and Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food chemistry*, 156 (1): 144-150.
- Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., and Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*. 58 (1): 4349-4358.
- Ma, Y., Zhang, D., Liu, M., Li, Y., Lv, R., Li, X., ... and Zhou, H. (2022). Identification of antioxidant peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin and their mechanism of action by molecular docking. *Foods*, 11(17), 2576.
- Moreira, M. J. P., Ribeiro, T. B., Coscueta, E., and Pintado, M. (2023). Influence of temperature and pH on antioxidant and antihypertensive activities of a fish protein hydrolysate. *New advances from PRIMA projects for improving Mediterranean Agro-Food value chains*.
- Najafian, L., and Babji, A. S. (2018). Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from fermented fish (pekasam). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 2174-2183.
- 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): 29-45.
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., and Shabanpour, B. (2012). Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1): 460-465.
- Ojagh, M., Hasani, Sh., and Hasani, M. (2022). The effect of freezing/thawing and freeze-drying / rehydration processes on the physical stability of nano-liposomes containing the bioactive peptides. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 13(4): 65-81. [In Persian]
- 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.
- Ramezanzadeh, L., Hosseini, S. F., and Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234 (1): 220-229.
- Reyhani Poul, S., Jafarpour, 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. [In Persian]
- Reyhani Poul, S., and Jafarpour, S. A. (2020). Effect of edible active film of chitosan containing fish protein hydrolysate (FPH) on chemical and microbial properties of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during the refrigerated storage. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 16(4): 493-505 [In Persian].
- Reyhani Poul, S., and Yeganeh, S. (2021). Comprehensive comparison of antioxidant activity of bioactive peptides produced from fish, poultry and shrimp wastes using Flavourzyme enzyme. Journal of food science and technology, 18(119): 307-318. [In Persian]
 - Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., and Safari, R. (2021). Evaluation of the relationship of molecular weight of bioactive peptides resulting from enzymatic hydrolysis of Vanami shrimp (*Litopenaeus vannamei*) head and shell with their antibacterial, antioxidant and functional properties. Food Hygiene, 11 (42): 90-106 [In Persian].
 - Reyhani Poul, S., and Yeganeh, S. (2022). Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 21(4): 987-1003.
 - 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.
 - Rocha-Pimienta, J., Navajas-Preciado, B., Barraso-Gil, C., Martillanes, S., and Delgado-Adámez, J. (2023). Optimization of the extraction of chitosan and fish gelatin from fishery waste and their antimicrobial potential as active biopolymers. Gels. 9(3): 254-271
 - 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.
 - Sánchez, A., and Vazquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. Food Quality and Safety, 1(1): 29-46.
 - 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 (1): 59-68.
 - 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. R. (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.
 - Safari, R., Reyhani Poul, S., Bankehsaz, Z., Taghavi, M. J., and Safari, E. (2021). Production of biological silage from wastes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using autogenous bacteria and quantitative and qualitative measurement of amino acid and fatty acid profiles of the product. Aquaculture Sciences. 2021; 9(1): 203-212.
 - Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Esmaeilzadeh Kenari, R. (2022a) Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial activity of phycocyanin extracted from spirulina microalgae (*Spirulina Platensis*) in both pure and nanoencapsulated forms with maltodextrin - sodium caseinate combination coating. Iranian Journal of Food Science and Technology, 127 (19): 345-347. [In Persian]
 - Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Ghaffari, H. (2022b). Nanoencapsulation of phycocyanin extracted from the alga *Spirulina* (*Spirulina platensis*) and use of nanoparticles in ice cream formulation. Journal of Food Science and Technology, 19(123): 145-159. [In Persian]
 - 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.
 - Yaghoubzadeh, Z., Kaboosi, H., Peyravii Ghadikolaii, F., Safari, S., and Fattahi, E. (2017). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate. Iranian Scientific Fisheries Journal, 28 (2): 117-129.[In Persian]

-
- Yeganeh, S., and Reyhani 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. [In Persian]
 - Yeganeh, S., and Reyhani Poul, S. (2023). Production of nanocapsules carrying astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis* with maltodextrin-sodium caseinate combined coating and evaluation of physical, antioxidant and color properties of the product. Journal of Food Science and Technology, 19(131): 303-317. [In Persian]
 - Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L. M., ... and Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. LWT-Food Science and Technology, 59(2): 841-848.