



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

اثر حامل ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی و روش خشک کردن انجمادی بر فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست-فعال فانوس ماهی (*Bentosema pterotum*) علیه باکتری های عامل فساد مواد غذایی

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

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

گرگان، ایران

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- دانشجوی تحصیلات تکمیلی، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

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

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۲۸

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۱۲/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵

کلمات کلیدی:

فانوس ماهی،

پپتیدهای زیست فعال،

نانوریزپوشانی،

صمغ عربی،

لیستریا مونوسیتوژنز،

MIC

DOI: 10.48311/fsct.2026.84087.0

* مسئول مکاتبات:

soheylreyhani@gmail.com

طی دو دهه اخیر تحقیقات پیرامون استفاده از نگهدارنده های طبیعی در مواد غذایی بجای ترکیبات شیمیایی به دلیل ایمن بودن مورد توجه محققین قرار گرفته است. پپتیدهای زیست فعال یکی از ترکیبات طبیعی هستند که پتانسیل بالایی برای جلوگیری از فساد (اکسیدایتو و میکروبی) مواد غذایی دارند. هدف تحقیق حاضر نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال تولیدشده از فانوس ماهی (*Bentosema pterotum*) (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی و سپس ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانوکپسول های حامل و پپتیدهای آزاد علیه باکتری های عامل فساد مواد غذایی از جمله لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کلوستریدیوم پرفرنژنس، باسیلوس سرئوس، اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی موریوم بود. مطابق نتایج، نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال، علاوه بر اینکه موجب افزایش فعالیت ضد باکتریایی آن ها شد (افزایش مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری ها و کاهش MIC و MBC)، بلکه موجب پایداری این خصوصیت طی ۶۰ روز نگهداری نانوکپسول های حامل در دمای ۴ درجه سانتی گراد گردید ($p < 0.05$). افزایش غلظت پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسول های حامل آن ها (از ۳۰ به ۱۵۰ میکروگرم بر میلی-لیتر) غالباً با افزایش قطر هاله عدم رشد باکتری ها همراه بود ($p < 0.05$). در بین باکتری ها، بیشترین مقادیر قطر هاله عدم رشد و کمترین میزان MIC و MBC برای لیستریا مونوسیتوژنز ثبت شد. همچنین حساسیت باکتری های گرم مثبت در برابر پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسول های حامل، بیشتر از باکتری های گرم منفی گزارش گردید. پپتیدهای آزاد در روز ۶۰ و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار باکتری های کلوستریدیوم پرفرنژنس و اشریشیاکلی بودند اما نتوانستند این باکتری ها را حذف کنند. این در حالیست که فرم نانوریزپوشانی شده این پپتیدها (نانوکپسول های حامل) در همین غلظت قادر به کشتندگی باکتری مذکور بودند. براساس نتایج، نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی موجب افزایش و پایداری فعالیت ضد باکتریایی و در نتیجه کارایی بیشتر آن ها در فرمولاسیون مواد غذایی می گردد.

۱-مقدمه

تحقیقات پیرامون استفاده از ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی به عنوان نگهدارنده در صنعت غذا و دارو طی دو دهه اخیر پیشرفت چشمگیری داشته و بالطبع تولید صنعتی این ترکیبات هم گسترش یافته است. این نگهدارنده‌ها برخلاف نگهدارنده‌های شیمیایی نه تنها برای سلامتی مصرف‌کنندگان مضر نیستند بلکه اثرات مثبتی بر واکنش‌های فیزیولوژیک بدن دارند. از جمله نگهدارنده‌های طبیعی مستخرج از آبزیان و ضایعات حاصل از فرآوری آن‌ها که در پژوهش‌های متعدد خواص نگهدارندگی (فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی) آن‌ها تأیید شده و تولید (استخراج) آن‌ها توسعه پیدا کرده می‌توان به کیتین و کیتوزان [۱]، فوکوئیدان [۲]، آلژینات [۳]، رنگدانه‌های مختلف نظیر آستاگزانتین [۴] و فیکوسیانیلین [۵] و ... اشاره کرد. پروتئین‌های هیدرولیز شده یکی دیگر از این ترکیبات هستند [۶] که در واقع حاصل هیدرولیز (آبکافت) پروتئین‌های موجود در بافت‌های مختلف پروتئینی با روش‌های آنزیمی و شیمیایی می‌باشند [۷].

پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی پپتیدهای زیست‌فعال هستند. پپتیدهای زیست‌فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که معمولاً ۲ تا ۲۰ آمینواسید و وزن مولکولی ۶۰۰۰ دالتون دارند و در ساختار پروتئین اصلی غیر فعال می‌باشند. اما وقتی توسط آنزیم و یا فرآیند تخمیر از دیگر آمینواسیدهای موجود در ساختار پروتئین جدا می‌شوند، فعالیت زیستی آن‌ها شروع می‌گردد [۸]. پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر کارایی در صنایع غذایی به عنوان امولسیفایر، کف‌زا [۹]، ضد میکروب و آنتی-اکسیدان [۱۰]، پس از مصرف توسط انسان اثرات فیزیولوژیکی خاصی (مانند تنظیم‌کنندگی فشار خون، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، کاهش کلسترول و اثرات ضد میکروبی) بر بدن اعمال می‌کنند [۸ و ۹]. پپتیدهای زیست‌فعال جهت اعمال این خواص (اثرات فیزیولوژیک) باید در جریان هضم و جذب (معده و روده) سالم و فعال باقی بمانند و سپس وارد جریان خون شوند [۱۱]. از آنجا که ممکن است این پپتیدها در شرایط اسیدی و آنزیمی (آنزیم-های پروتئولیتیک) دستگاه گوارش دنا توره و تجزیه شوند،

استفاده از روش‌هایی جهت حفاظت از این پپتیدها ضروری به نظر می‌رسد. همچنین جهت حفظ خواص نگهدارندگی (ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی) پپتیدهای زیست‌فعال در مواد غذایی، لازم است روش‌های حفاظتی مقتضی بکار گرفته شود. چرا که هر ماده غذایی شرایط تولید (استفاده از دماهای بالا) و نگهداری خاصی دارد و ممکن است پپتیدهای زیست‌فعالی که جهت افزایش ماندگاری ماده غذایی در فرمول استفاده شده‌اند، دچار تغییرات نامطلوب ساختاری شوند و کارایی خود را از دست دهند. یکی از روش‌های مقتضی حفاظتی ترکیبات فعال از جمله پپتیدهای زیست‌فعال، درون‌پوشانی (ریزپوشانی) آن‌ها می‌باشد [۱۲]. طی این فرایند پوششی اطراف پپتیدها ایجاد می‌شود که این ترکیبات فعال را در شرایط نامساعد از تغییرات احتمالی حفاظت می‌کند. ضمن اینکه پوشش (کپسول)‌های تشکیل‌شده اطراف پپتیدها در این روش، محتویات خود را با سرعت کنترل‌شده و شرایط ویژه رها می‌کنند [۱۳].

در فرآیند نانوریزپوشانی از ترکیبات مختلف کربوهیدراتی (مالتودکسترین، نشاسته، کیتوزان، دکسترین، ساکارز و ...)، سلولزی (کربوکسی‌متیل سلولز، متیل سلولز، اتیل سلولز، نیتروسلولز و ...)، پروتئینی (کازئین، پروتئین آب پنیر، ژلاتین و ...)، لیپیدی (لیپوزوم، واکس، پارافین، بی‌زواکس، دی‌گلیسریدها، مونوگلیسریدها و ...) و ... جهت پوشش (دیواره) ترکیبات فعال (هسته) استفاده می‌شود [۱۴]. مالتودکسترین یکی از پوشش‌های کربوهیدراتی است که از مشتقات نشاسته می‌باشد و از منابع مختلف نشاسته‌ای مانند سیب زمینی، ذرت و گندم تهیه می‌گردد. این ماده بدلیل حلالیت بالا در آب و عدم داشتن بو و رنگ شاخص، از مهم‌ترین مواد پلی‌ساکاریدی است که به عنوان دیواره یا پوشش هسته طی فرآیند ریزپوشانی استفاده می‌گردد [۴ و ۵]. صمغ عربی نیز پلی‌ساکاریدی است که به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی خاص دارای کاربرد گسترده در صنایع غذایی (امولسیفایر، تثبیت و پایدارکننده، قوام‌دهنده و ...) است و طی دهه اخیر به عنوان دیواره در فرایند ریزپوشانی بسیار مورد توجه بوده است [۱۴ و ۱۵]. مالتودکسترین و

صمغ عربی ویژگی‌هایی از قبیل قیمت مناسب، خوراکی بودن، حلالیت بالا و ویسکوزیته پائین دارند که همین ویژگی‌ها موجب استفاده گسترده از آن‌ها به عنوان حامل یا دیواره در ریزپوشانی ترکیبات فعال چسبنده و آنتی‌اکسیدان شده است.

از مهم‌ترین باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی مختلف می‌توان به لیستریا مونوسیژن^۱، استافیلوکوکوس اورئوس^۲، کلوستریدیوم پرفرنژنس^۳، باسیلوس سرئوس^۴، اشریشیا کلی^۵ و سالمونلا تیفی‌موریوم^۶ اشاره کرد. اگر از رشد و تکثیر این باکتری‌ها در مواد غذایی جلوگیری نشود، در نتیجه فعل و انفعالات شیمیایی صورت گرفته توسط آن‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها هیدرولیز و در نتیجه فساد اتفاق می‌افتد که غالباً با تغییر نامطلوب مزه و بو و نهایتاً افت کیفیت مواد غذایی بروز می‌کند. مصرف چنین مواد غذایی باعث بروز مسمومیت‌های مختلف و عوارض (اکثراً گوارشی) در مصرف‌کننده می‌گردد. در صنعت به منظور جلوگیری از چنین مشکلاتی از نگهدارنده‌ها استفاده می‌کنند که بیشترشان ماهیت شیمیایی و مضر (برای سلامت مصرف‌کنندگان) دارند. لذا استفاده از ترکیباتی مانند پپتیدهای زیست‌فعال به این منظور، که ماهیت طبیعی دارند و علاوه بر افزایش ماندگاری مواد غذایی (از طریق مهار رشد میکروب‌ها و کنترل اکسیداسیون چربی‌ها)، خواص سلامت‌بخشی نیز بر بدن اعمال می‌کنند [۶، ۸-۱۰]، امر مهم و تا حد زیادی ضروری به نظر می‌رسد.

منابع دریایی که برای تولید پروتئین‌های هیدرولیزشده (پپتیدهای زیست‌فعال) استفاده می‌شوند باید فراوان، ارزان و دارای بازارپسندی بسیار کم باشند تا تولید محصول از نظر اقتصادی مقرون به صرفه واقع گردد. به همین دلیل استفاده از ضایعات و همچنین آبزیانی که بازارپسندی بسیار کمی دارند، در اولویت هستند. خانواده بزرگ فانوس ماهیان یا میکتوفیده^۷ حدود ۷۰ درصد از ماهیان مزوپلاژیک آب‌های آزاد را

تشکیل می‌دهند. در حقیقت فانوس ماهیان در زمره ماهیانی هستند که بیشترین پراکنش، جمعیت و تنوع را در میان همه مهره‌داران دارند؛ به گونه‌ای که زیست توده آن‌ها ۵۵۰ تا ۶۵۰ میلیون تن برآورد می‌شود. گونه‌های مختلف این خانواده دارای یک زیست‌توده عظیم و دست‌نخورده (بکر) در آب‌های ایرانی دریای عمان هستند؛ به گونه‌ای که ۹۰ درصد ماهیان این دریا را به خود اختصاص می‌دهند و به عنوان صید جانبی تلقی می‌شوند [۱۶]. در بین گونه‌های مختلف فانوس ماهیان، گونه غالب، بتوزوما پتروتوم^۸ است که با نام فانوس ماهی شناخته می‌شود و بزرگترین ذخیره خانواده میکتوفیده در دریای عمان و چین شرقی مربوط به همین گونه است. خانواده فانوس ماهیان، علی‌رغم غنی بودن از نظر پروتئین باکیفیت و مواد معدنی فراوان [۱۷]، به دلیل مقادیر بالای استرواکس در چربی و همچنین ساینز بسیار کوچک (۱ تا ۵ سانتی‌متر) غالباً به عنوان غذای انسان قابل مصرف نیستند (در واقع کمتر از ۱۰ گونه از ۲۴۹ گونه فانوس ماهیان قابلیت استفاده انسانی دارند). ارزش غذایی بالا، عدم مصرف انسانی به صورت مستقیم، فراوانی زیاد و بالطبع ارزان بودن و دسترسی آسان همگی موجب شده‌اند که خانواده فانوس ماهیان به عنوان منبع مناسب و مطلوبی در تولید پودر ماهی و تامین غذای دام، طیور و آبزیان مطرح باشند [۱۸]. پیشرفت تکنولوژی در زمینه فرآوری آبزیان این امکان را فراهم کرده تا بتوان از این گونه ماهیان برای تولید ترکیبات زیست‌فعال با کاربردهای کلیدی در صنایع غذایی و دارویی نیز استفاده کرد تا به نوعی هم پروتئین‌های آن‌ها وارد جیره غذایی انسان شوند [۱۷].

هدف تحقیق حاضر تولید پپتیدهای زیست‌فعال از فانوس ماهی به روش آنزیمی (پروتامکس) و سپس نانوریزپوشانی این پپتیدها با استفاده از روش خشک کردن انجمادی و پوشش ترکیبی مالتودکسترین و صمغ عربی است. در مرحله

5- *Escherichia coli*6- *Salmonella typhimurium*7- *Myctophidae*8- *Benthosema pterotum*1- *Listeria monocytogenes*2- *Staphylococcus aureus*3- *Clostridium perfringens*4- *Bacillus cereus*

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 (میزان فعالیت: ۱/۵ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم) به مقدار ۳۰ واحد آنسون (به ازای یک کیلوگرم سوبسترای پروتئینی) به ارلن مربوطه اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و ۹۰ دقیقه در این شرایط انکوبه شد تا فرایند هیدرولیز پروتئین‌ها انجام شود. بعد از این زمان‌ها، به منظور قطع واکنش هیدرولیز، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت و خنک شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد [۱۹ و ۲۰]. لازم به ذکر است شرایط هیدرولیز (دما، زمان، میزان آنزیم و pH) بهینه‌یابی و سپس حدود بهینه لحاظ شدند.

۲-۳- درجه هیدرولیز و بازیابی پروتئین فرایند

بعد از پایان فرایند آبکافت، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید^{۱۱} (مرک، آلمان) ۲۰ درصد با نسبت برابر به سوپرناتانت افزوده شد و محلول حاصل با دور ۶۷۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید به روش بیورت سنجیده شد. نهایتاً درجه هیدرولیز از نسبت نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد تری‌کلرواستیک‌اسید به نیتروژن کل نمونه به صورت درصد محاسبه شد. بازیابی پروتئین با استفاده از نسبت [گرم پروتئین هیدرولیزشده×میزان نیتروژن پروتئین هیدرولیزشده] بر [گرم سوبسترا×میزان نیتروژن سوبسترا] به صورت درصد بدست آمد [۲۱].

۲-۴- آنالیز تقریبی سوبسترا و پودرهای هیدرولیزشده

به منظور تعیین میزان رطوبت، ۱ گرم نمونه در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد (آون، Fanazma gostar, BM 55) تا

بعد، فعالیت ضد باکتریایی فرم آزاد پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل، علیه گونه‌های گرم مثبت و گرم منفی عامل فساد مواد غذایی ارزیابی (و مقایسه) می‌شوند.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه سوبسترا، آنزیم و باکتری‌ها

فانوس ماهی از صیادان محلی بندرعباس پس از پهلویی‌گیری کشتی صید ترال خریداری گردید. سپس ماهی در باکس ۵ کیلوگرمی که محتوی یخ بود، بسته‌بندی شد و در کوتاه‌ترین زمان ممکن با هواپیما به تهران و سپس به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایشات در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنزیم مورد استفاده در این پژوهش، آنزیم (تجاری) میکروبی پروتامکس مستخرج از باکتری باسیلوس سوبتیلیس^۹ بود که از نمایندگی شرکت نووزایم^{۱۰} دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این پژوهش باکتری‌های گرم مثبت از جمله لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 7644)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، کلسترییدیوم پرفرنژنس (PTCC 1766)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1247) و گرم منفی اش‌ریشیاکلی (PTCC 1330) و سالمونلا تیفی‌موریوم (PTCC 1609) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند.

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیزشده

به منظور آماده‌سازی سوبسترا، مقدار مشخصی از فانوس-ماهی از فریزر خارج شد و با قرارگیری در دمای یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) 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 میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه (فانوس‌ماهی چرخ-شده) 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

رسیدن به وزن ثابت، خشک شد. درصد رطوبت نمونه بر پایه اختلاف وزن اولیه از وزن ثانویه محاسبه شد. از قرارداد نمونه در یک کوره (FM.2.8) با دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری گردید [۲۲].

۵-۲- 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، ۲-۱۶ kl، 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 [۲۳]. از آنجا که بر اساس نتایج پیش‌تست، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون عملکردی مطلوب‌تری نسبت به دو وزن دیگر از خود نشان دادند، این وزن برای انجام عملیات‌های بعدی انتخاب شد.

۶-۲- نانو ریزپوشانی کردن پپتیدهای زیست‌فعال

به منظور نانو ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال، از پوشش ترکیبی مالتودکسترین (سیگما، آلمان) و صمغ عربی (سیگما، آلمان) با نسبت ۱:۱ استفاده و نسبت پوشش‌ها به هسته نیز ۴ به ۱ در نظر گرفته شد. ابتدا سوسپانسیون همگنی از مالتودکسترین در آب مقطر (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس جهت تهیه پوشش دوم، سوسپانسیونی از صمغ عربی

در آب مقطر تهیه (۴ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) و با قرارداد 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 زیست‌فعال (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) به محلول حاوی پوشش‌ها اضافه و پس از حل شدن آن، جهت تولید نانوکپسول، از دستگاه اولتراسوند (Hilscher, UP200، آلمان) با طول موج ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۱۵ دقیقه و تعداد ۶ سیکل (زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل‌ها، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. برای کاهش بیشتر اندازه ذرات و افزایش راندمان ذرات نانوکپسوله، از دستگاه هموژنایزر با دور بالا (اولتراتوراکس، Ika، ایتالیا) با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه استفاده گردید. محلول حاصل از فرآیند، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus، آلمان) در فشار ۰/۰۵۱ میلی‌بار و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک گردید [۲۴-۲۶].

۷-۲- ارزیابی خواص فیزیکی نانوکپسول‌ها

شاخص‌های میانگین سایز ذرات و توزیع اندازه ذره‌ای پس از رقیق کردن نمونه‌ها به میزان ۱۰ برابر با بافر فسفات نمکی^{۱۲} به روش تفرق نور پویا^{۱۳} با استفاده از دستگاه زتاسایزر (نانوسایزر، ۳۰۰۰، ساخت انگلستان، شرکت Malvern، زاویه ۹۰ درجه و سل مخصوص با عرض ۰/۰۱ متر) اندازه‌گیری شدند. به منظور اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح نانوکپسول‌ها، از دستگاه زتاسایزر استفاده شد. در این روش نانوکپسول‌ها با استفاده از ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات (pH=۷/۴) به میزان ۱۰ برابر رقیق شدند. ارزیابی پتانسیل زتا در زاویه ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج ۶۳۳ نانومتر هلیوم-تنگستن (در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد)

انجام شد [۱۳]. بازده فرآیند نانو ریزپوشانی نیز با استفاده از روش Yan و همکاران (۲۰۱۴) تعیین گردید [۲۵].

۸-۲- شرایط کشت باکتری‌های مورد استفاده

محیط کشت مورد استفاده به منظور آماده‌سازی باکتری‌ها، آبگوشت اینفیوژن مغز و قلب گاو^{۱۴} (شرکت بیولب هندوستان) بود. پس از کشت اولیه باکتری‌ها، نمونه‌ها در دو دمای ۳۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای باکتری‌های گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کلوستریدیوم پرفرنزنس و باسیلوس سرئوس) و گرم منفی (اشریشیاکلی و سالمونلا تیفی‌موریوم) به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد، جهت دستیابی به رسوب باکتریایی، محیط‌های کشت حاوی سوسپانسیون باکتری‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از خارج کردن مایع رویی و افزودن بافر فسفات به رسوب باقیمانده، فرآیند سانتریفوژ دو بار دیگر تکرار گردید. در هر مرحله نیز از بافر فسفات جهت خارج کردن اثرات محیط آبگوشت اولیه استفاده شد. سپس به رسوب باقیمانده مقداری بافر فسفات اضافه و با لوله استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند (معادل $10^8 \times 1/5$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر^{۱۵}) مقایسه گردید. نهایتاً با رقیق‌سازی نمونه‌ها، رقت $10^6 \times 1$ به منظور انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت [۲۶-۲۸].

۹-۲- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل

۱-۹-۲- روش انتشار در محیط آگار

در این روش، ابتدا سوسپانسیون تهیه‌شده از باکتری‌ها به صورت سطحی بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار^{۱۶} (شیمی پترو سهند) کشت داده شد. در مرحله بعد، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در سطح محیط تعبیه و مقدار ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکروگرم

بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن-ها به چاهک‌ها منتقل گردید. سپس نمونه‌ها در دو دمای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک با استفاده از کولیس ورنیه با دقت ۰/۲ میلی‌متر اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید. از آنتی‌بیوتیک داکسی-سیلین^{۱۷} ۳۰ میلی‌گرمی (پادتن طب) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۶-۲۸].

۲-۹-۲- روش رقیق‌سازی در لوله^{۱۸}

در این روش، حداقل غلظت مهارکننده^{۱۹} و حداقل غلظت کشنده باکتری^{۲۰} پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها با استفاده از رقیق‌سازی در لوله‌های آزمایش مشخص شد. رقت‌های مورد استفاده پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌گرم بود که به همراه یک میلی‌لیتر از محیط آبگوشت اینفیوژن قلب و مغز گاو (شرکت بیولب هندوستان) به لوله آزمایش اضافه شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های شاخص به لوله‌ها اضافه و در دماهای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. جهت بررسی تغییرات حاصله، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. آب مقطر و داکسی‌سیلین نیز به عنوان کنترل منفی و مثبت در نظر گرفته شدند. غلظتی از سوسپانسیون میکروبی که کمترین جذب نوری را نشان داد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده و غلظتی از سوسپانسیون که بعد کشت ۲۴ ساعته، فاقد رشد کلنی در محیط کشت بود نیز به عنوان حداقل غلظت کشنده باکتری تعیین شد [۲۶-۲۸].

۲-۱۰- تجزیه و تحلیل آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه^{۲۱} و آزمون

18- Microdilution test

19- Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

20- Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

21- One way Anova

14 -Brain Heart Infusion Broth

15- CFU/ml

16 -Muller-Hinton Agar

17 -Doxycycline

دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) استفاده شد. از نرم افزار آماری SPSS²² برای آنالیز داده ها و نرم افزار EXCEL (نسخه ۱۶) جهت رسم جداول و اشکال استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- خصوصیات فرآیند هیدرولیز و ترکیب شیمیایی سوپسترا و پودر هیدرولیز شده

Table 1. Analysis of the hydrolysis process, substrate and fish protein hydrolysate (%)

	Protein	Fat	Moisture	Ash	DH	PR
Substrate	21.04±0.71	2.96±0.57	66.32±1.43	7.89±0.68		
Fish Protein Hydrolysate	93.21±1.46	0.23±0.03	0.65±0.1	3.7±0.09	21.53±1.86	92.67±1.24

ارائه شده است. مطابق این جدول، میانگین سایز نانوکپسول ها، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای آن ها به ترتیب حدود ۲۹۳/۶ نانومتر، ۰/۳۹۸ و ۴۱/۲۶+ میلی ولت است. همچنین بازده فرایند نانوریزپوشانی ۸۹/۱۲±۳/۰۵ درصد ثبت شد.

۳-۲- خواص فیزیکی نانوکپسول ها

خواص فیزیکی نانوکپسول های حامل پپتیدهای زیست فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی در جدول ۲

Table 2- Physical properties of nanocapsules carrying bioactive peptides coated by maltodextrin- gum arabic

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

مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر نانوکپسول های حامل بیشتر از پپتیدهای آزاد می باشند ($p < 0.05$). همچنین، با گذشت ۶۰ روز نگهداری فرم نانوریزپوشانی شده پپتیدها (نانوکپسول های حامل) در دمای ۴ درجه سانتی گراد (یخچال) و انجام مجدد تست ضد باکتریایی، مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر آن ها نسبت به روز صفر تغییر نکردند و ثابت ماندند ($p > 0.05$). اما با نگهداری پپتیدهای آزاد در دما و زمان یکسان و انجام دوباره تست ضد باکتریایی، مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری ها در برابر آن ها

۳-۳- سنجش فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست -

فعال و نانوکپسول های حامل آن ها

۱-۳-۳- قطر هاله عدم رشد

در جدول ۳، فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای آزاد و نانوکپسول های حامل (در ۵ غلظت و دو زمان) علیه باکتری های گرم مثبت (لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، کلوستریدیوم پرفرنژنس و باسیلوس سرئوس) از روش انتشار در محیط کشت حاوی آگار به صورت قطر هاله عدم رشد (میلی متر) ارائه شده است. مطابق این جدول،

غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز ثبت شد. اما چنین مقاومتی برای باکتری لیستریا مونوسیتوزنز فقط در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر وجود داشت. از بین چهار باکتری گرم مثبت مورد مطالعه، به طور کلی (میانگین) بیشترین و کمترین مقادیر قطر هاله عدم رشد به ترتیب مربوط به لیستریا مونوسیتوزنز و کلوستریدیوم پرفرنزنس بودند ($p < 0.05$).

به صورت معنی‌داری کاهش یافتند ($p < 0.05$). با افزایش غلظت پپتیدها و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها، مقادیر قطر هاله عدم رشد هر چهار باکتری گرم مثبت به صورت معنی‌داری بیشتر شدند ($p < 0.05$). البته در این مورد دو استثنا وجود داشت؛ مقادیر قطر هاله عدم رشد کلوستریدیوم پرفرنزنس با افزایش غلظت از ۱۲۰ به ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین مقادیر قطر هاله عدم رشد باسیلوس سرئوس با افزایش غلظت از ۹۰ به ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییر معنی‌داری نکردند ($p > 0.05$). مطابق جدول ۳، باکتری کلوستریدیوم پرفرنزنس نسبت به سه غلظت ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای آزاد و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها مقاوم بود (R)؛ ضمن اینکه این وضعیت برای دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در

Table 3- Diameter of non-growth zone of Gram positive bacteria against bioactive peptides and nanocapsules carrying them on days 0 and 60 of storage at refrigerator temperature (mm)

Strain	Time (day)	T		Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)					Positive control
				30	60	90	120	150	Doxycycline
<i>L. monocytogenes</i>	0	F	R	6.73 $\pm$ 0.18 ^{Db}	10.32 $\pm$ 0.01 ^{Cc}	15.43 $\pm$ 0.29 ^{Bb}	21.64 $\pm$ 0.42 ^{Ab}		44.53 $\pm$ 1.82
		N	R	8.94 $\pm$ 0.34 ^{Da}	14.15 $\pm$ 1.05 ^{Ca}	18.41 $\pm$ 1.54 ^{Ba}	24.68 $\pm$ 1.12 ^{Aa}		
	60	F	R	5.11 $\pm$ 0.16 ^{Dc}	9.51 $\pm$ 0.08 ^{Cd}	12.26 $\pm$ 0.77 ^{Bc}	17.51 $\pm$ 0.01 ^{Ad}		1.82
		N	R	8.84 $\pm$ 0.92 ^{Da}	14.08 $\pm$ 1.46 ^{Ca}	18.29 $\pm$ 1.31 ^{Ba}	24.51 $\pm$ 1.83 ^{Aa}		
<i>Staph. aureus</i>	0	F	R		6.15 $\pm$ 0.07 ^{Cf}	9.09 $\pm$ 0.16 ^{Bd}	12.84 $\pm$ 0.11 ^{Ag}		35.69 $\pm$ 1.34
		N	R		7.49 $\pm$ 0.24 ^{Ce}	12.17 $\pm$ 0.1 ^{Bc}	14.24 $\pm$ 0.26 ^{Af}		
	60	F	R		5.26 $\pm$ 0.09 ^{Cg}	7.23 $\pm$ 0.08 ^{Bf}	10.11 $\pm$ 0.05 ^{Ah}		1.34
		N	R		7.5 $\pm$ 0.32 ^{Cc}	12.14 $\pm$ 0.15 ^{Bc}	14.18 $\pm$ 0.44 ^{Af}		
<i>C. perfringens</i>	0	F	R			6.14 $\pm$ 0.38 ^{Ag}	6.32 $\pm$ 0.11 ^{Aj}		30.72 $\pm$ 0.98
		N	R			8.3 $\pm$ 0.42 ^{Ac}	8.38 $\pm$ 0.23 ^{Ai}		
	60	F	R			5.19 $\pm$ 0.27 ^{Ah}	5.26 $\pm$ 0.21 ^{Ak}		0.98
		N	R			8.31 $\pm$ 0.19 ^{Ac}	8.42 $\pm$ 0.15 ^{Ai}		
<i>Bacillus cereus</i>	0	F	R		9.54 $\pm$ 0.12 ^{Bd}	9.46 $\pm$ 0.1 ^{Bd}	15.28 $\pm$ 0.07 ^{Ae}		39.25 $\pm$ 1.12
		N	R		12.09 $\pm$ 0.28 ^{Bb}	12.21 $\pm$ 0.32 ^{Bc}	18.97 $\pm$ 0.29 ^{Ac}		
	60	F	R		7.41 $\pm$ 0.15 ^{Be}	7.19 $\pm$ 0.34 ^{Bf}	12.84 $\pm$ 0.22 ^{Ag}		1.12
		N	R		12.1 $\pm$ 0.31 ^{Bb}	12.2 $\pm$ 0.22 ^{Bc}	19.02 $\pm$ 0.36 ^{Ac}		

- T: Treatments, F: Free bioactive peptides, N: Nanoencapsules carrying bioactive peptides, R: Resistant
- The different lowercase and uppercase letters in each column and row indicate significant difference between the data, respectively ($p < 0.05$).

افزایش غلظت، مقادیر قطر هاله عدم رشد /شریشیاکلی و سالمونلا تیغی‌موریوم به صورت معنی‌داری افزایش یافتند ($p < 0.05$). البته مقادیر قطر هاله عدم رشد سالمونلا تیغی-موریوم در برابر پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها در دو غلظت ۹۰ و ۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم منفی (شریشیاکلی و سالمونلا تیغی‌موریوم) در برابر پپتیدهای آزاد و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها (در پنج غلظت و دو زمان) در جدول ۴ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، با نانوریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال و

میکروگرم بر میلی لیتر و/شریشیاکلی به همه غلظت های مورد مطالعه به غیر از ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر پپتیدهای زیست فعال و نانوکپسول های حامل آن ها مقاوم بود.

فاقد اختلاف معنی دار بودند ($p>0.05$). با گذشت ۶۰ روز از نگهداری نانوکپسول های حامل در دمای ۴ درجه سانتی گراد، قابلیت آن ها برای ایجاد قطر هاله عدم رشد هر دو باکتری گرم منفی تغییری نکرد (ثابت ماندن قطر هاله عدم رشد) ($p>0.05$). اما این توانایی در پپتیدهای آزاد با گذشت زمان نگهداری به صورت معنی داری کمتر شد ($p<0.05$) که به صورت کاهش قطر هاله عدم رشد باکتری ها بروز کرد. مطابق جدول ۴، *سالمونلا تیفی موریوم* به غلظت های ۳۰ و ۶۰

Table 4- Diameter of non-growth zone of Gram negative bacteria against bioactive peptides and nanocapsules carrying them on days 0 and 60 of storage at refrigerator temperature (mm)

Strain	Time (day)	T	Concentrations (μg/ml)					Positive control Doxycycline
			30	60	90	120	150	
<i>E.coli</i>	0	F	R	R	R	R	6.85±0.02 ^d	27.36±1.64
		N	R	R	R	R	7.57±0.16 ^c	
	60	F	R	R	R	R	5.87±0.06 ^e	
		N	R	R	R	R	7.52±0.11 ^c	
<i>S.typhimurium</i>	0	F	R	R	6.52±0.42 ^{Bb}	6.54±0.18 ^{Bb}	9.25±0.44 ^{Ab}	32.47±1.28
		N	R	R	8.25±0.28 ^{Ba}	8.23±0.31 ^{Ba}	11.37±0.43 ^{Aa}	
	60	F	R	R	5.55±0.36 ^{Bc}	5.48±0.16 ^{Bc}	7.56±0.12 ^{Ac}	
		N	R	R	8.21±0.22 ^{Ba}	8.25±0.24 ^{Ba}	11.28±0.58 ^{Aa}	

- T: Treatments, F: Free bioactive peptides, N: Nanoencapsules carrying bioactive peptides, R: Resistant
- The different lowercase and uppercase letters in each column and row indicate significant difference between the data, respectively ($p<0.05$).

حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده آن ها برای باکتری های مورد مطالعه تغییری نکردند و ثابت باقی ماندند. اما این مقادیر در فرم آزاد پپتیدهای زیست فعال (پس از ۶۰ روز نگهداری آن ها در دمای یخچال) برای همه باکتری ها به غیر از *باسیلوس سرئوس* و *سالمونلا تیفی موریوم* افزایش یافتند. در بین باکتری های مورد مطالعه، کمترین مقادیر حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده مربوط به *لیستریا مونوسیژنوز* بودند. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می شود، پپتیدهای آزاد در روز ۶۰ و غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر قادر به مهار باکتری های *کلستریدیوم پرفرنزس* و *شریشیاکلی* بودند اما نتوانستند این باکتری ها را حذف کنند. اما فرم نانوریزپوشانی شده این پپتیدها (نانوکپسول های حامل) در همین غلظت قادر به کشندگی باکتری های مذکور بودند.

۳-۳-۲- حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده
در جدول ۵، حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده پپتیدهای آزاد و نانوریزپوشانی شده علیه باکتری های گرم مثبت و منفی نشان داده شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می شود، حداقل غلظت مهارکننده پپتیدهای زیست فعال (آزاد و نانو) برای پنج گونه باکتری از ۵۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر متغیر بود. این سطح برای حداقل غلظت کشنده از ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (و بیشتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) ثبت شد. در ادامه مشخص شد حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده فرم نانوریزپوشانی شده پپتیدها برای همه باکتری های مورد مطالعه کمتر از پپتیدهای آزاد است. همچنین با گذشت ۶۰ روز از نگهداری نانوکپسول های حامل پپتیدهای زیست فعال در دمای یخچال و انجام مجدد تست ضد باکتریایی، مقادیر

Table 5- MIC and MBC of bioactive peptides and nanocapsules carrying them against six strain of bacteria on days 0 and 60 of storage at refrigerator temperature (µg/ml)

Strain	Time (day)	Form of peptides	MIC	MBC
<i>L. monocytogenes</i>	0	Free	100	200
		Nanoencapsulated	50	100
	60	Free	200	400
		Nanoencapsulated	50	100
<i>Staph. aureus</i>	0	Free	200	400
		Nanoencapsulated	100	200
	60	Free	400	500
		Nanoencapsulated	100	200
<i>C.perfringens</i>	0	Free	400	500
		Nanoencapsulated	200	400
	60	Free	500	-
		Nanoencapsulated	200	500
<i>Bacillus cereus</i>	0	Free	200	400
		Nanoencapsulated	100	200
	60	Free	200	400
		Nanoencapsulated	100	200
<i>E.coli</i>	0	Free	400	500
		Nanoencapsulated	200	400
	60	Free	500	-
		Nanoencapsulated	200	500
<i>S.typhimurium</i>	0	Free	400	500
		Nanoencapsulated	200	400
	60	Free	400	500
		Nanoencapsulated	200	400

۴-بحث

Micrococcus luteus و *faecalis* و گرم منفی *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Klebsiella pneumonia* و *Salmonella enterica* بودند [۲۹]. در تحقیق یگانه و ریحانی پول (۱۴۰۰)، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو و نانولیپوزوم‌های حامل آن‌ها توانایی مهار رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* و *Escherichia coli* را بروز دادند [۳۰]. در پژوهشی که امعاء و احشاء ماهی بیاح^۱ با استفاده از آلکالاز و فلاورزایم در سه زمان ۱۰، ۲۰ و ۳۰ هیدرولیز و خاصیت ضد باکتریایی پروتئین‌های تولیدشده ارزیابی شد، مشخص گردید که این پروتئین‌ها قابلیت مهار رشد و کشندگی باکتری‌های *Escherichia coli* و

پپتیدهای تولیدشده در پژوهش حاضر و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها قابلیت مهار رشد و کشندگی باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی را دارا بودند. در تحقیقات متعددی فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آبزیان و ضایعات آن‌ها تأیید شده است. نتایج پژوهش Sila و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که پپتیدهای هیدرولیزشده حاصل از عضله ماهی *Barbus callensis* دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *Staphylococcus aureus*، *Listeria*، *Bacillus subtilis*، *monocytogenes* و *Enterococcus*

1- Liza abu

تحقیق Ghelichi و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت ضد باکتریایی پروتئین‌های حاصل از هیدرولیز تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ به ۱۲۰ دقیقه افزایش یافت اما این پروتئین‌ها قادر به مهار رشد *Listeria monocytogenes*، *Enterococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* نبودند [۳۶].

خصوصیت مشترک غالب پپتیدهای ضد باکتریایی داشتن ساختمان دوم آلفاهلیکس است که این ساختمان احتمالا به دلیل قرارگیری در کانال یونی غشای باکتری و تغییر نفوذپذیری این ساختار می‌تواند سلول را نابود کند [۲۳]. به طور کلی و خلاصه، احتمالاتی که در زمینه مکانیسم ضد باکتریایی پروتئین‌های هیدرولیز شده (پپتیدهای زیست‌فعال) مطرح است عبارتند از الف) پپتیدها به غشای سلول‌های باکتری متصل شده و منافذ غیر قابل برگشتی در سطح غشا ایجاد می‌کنند که در نتیجه سیتوپلاسم به خارج از سلول جریان می‌یابد و سلول کاملا تخریب می‌شود. ب) پپتیدها از غشای سلولی عبور کرده و با اندامک‌های درون‌سلولی مانند ریبوزم و ژنوم باند می‌شوند و در روند رشد طبیعی سلول اختلال ایجاد می‌کنند [۳۷].

در این تحقیق انجام فرآیند نانوریزپوشانی، علاوه بر افزایش فعالیت ضد باکتریایی (در هر دو روش مورد بررسی) پپتیدهای زیست‌فعال، به پایداری این فعالیت در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال نیز منجر شد. به این معنی که نانوکپسول‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با پوشش ترکیبی مالتودکسترین-صمغ عربی نسبت به پپتیدهای آزاد قابلیت بیشتری برای مهار رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشتند؛ ضمن اینکه از خاصیت ضد باکتریایی نانوکپسول‌ها بر خلاف پپتیدهای آزاد در طول دوره نگهداری کاسته نشد (ثابت ماندن مقادیر قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها و همچنین MIC و MBC نانوکپسول‌ها پس از ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال). افزایش فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال

Staphylococcus aureus را دارند و پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه در این زمینه کارایی بیشتری داشت [۳۱]. البته همه پپتیدهای زیست‌فعال (پروتئین‌های هیدرولیز شده) با هر ویژگی و در هر شرایطی فعالیت ضد باکتریایی از خود بروز نمی‌دهند؛ بلکه بسته به گونه باکتریایی مورد تست (اینکه گرم منفی یا گرم مثبت باشد)، نوع منبع پپتید (اینکه پپتید گیاهی باشد یا جانوری، از بافت جانور باشد یا ضایعات آن، گونه جانوری و یا گیاهی چه باشد و ...)، غلظت مورد استفاده [۲۳]، مشخصات پپتیدها از جمله درجه هیدرولیز [۳۱]، وزن مولکولی [۳۲]، ترکیب و توالی اسیدهای آمینه [۳۳] و همچنین شرایط واکنش هیدرولیز از جمله نوع آنزیم مصرفی، دما، زمان، پی‌اچ، نسبت آنزیم به سوبسترا [۳۱] و ... وجود یا عدم وجود این خاصیت و میزان آن در پپتیدهای زیست‌فعال تغییر می‌کند. پژوهشی که خاصیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال تولید شده از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان^۲ (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلوالتون) با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم را مورد بررسی قرار داد (با استفاده روش‌های انتشار دیسک و رقیق‌سازی در لوله)، گزارش کرد که این پپتیدها قابلیت مهار رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* را نداشتند [۲۳]. در تحقیق دیگری پپتیدهای زیست‌فعال تولید شده از پوست سگ‌ماهی^۳ با استفاده از آنزیم‌های کموتریپسین، تریپسین و پیپسین قادر به مهار رشد باکتری‌های *Escherichia coli*، *Lactococcus lactis* و *Bacillus subtilis* نبودند [۳۴]. پپتیدهای زیست‌فعال تولید شده از اویستر در درجات هیدرولیز ۳۰/۱۲، ۳۲/۶۹ و ۳۸/۴۷ درصد و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاقد قدرت مهار رشد باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و *Bacillus cereus* بودند اما با افزایش درجه هیدرولیز و غلظت‌های مورد استفاده، پپتیدها توانستند رشد باکتری‌های مذکور را مهار کنند [۳۵]. در

باکتری‌های گرم منفی تا حد قابل توجهی می‌تواند از ورود پپتیدهای زیست‌فعال به سلول جلوگیری و اثرات تخریب-کننده آن را خنثی کند [۲۳]. حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی در سایر تحقیقات نیز ثابت شده است [۴، ۲۶ و ۳۸].

در پژوهش حاضر، /شریشیاکلی فقط به غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها حساسیت نشان داد. همچنین سایر باکتری‌ها نیز به برخی از غلظت‌ها در روش انتشار در محیط کشت آگار و رقیق‌سازی در لوله مقاوم بودند. این مقاومت باکتری‌ها در برابر پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها دلایل مختلفی دارد که به طور کلی به دو دسته تقسیم می‌شوند؛ دسته اول مربوط به خصوصیات باکتری‌ها هستند مانند وجود ژن‌های مقاوم در برابر ترکیبات ضد باکتری در سلول، وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی در دیواره باکتری‌های گرم منفی و مقاومت سلولی در برابر شرایط سخت محیطی [۳۴]. دسته دوم در ارتباط با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول‌های حامل آن‌ها می‌باشند که در این زمینه می‌توان به مواردی نظیر عدم حساسیت باکتری‌ها به غلظت‌های مورد استفاده پپتیدهای زیست‌فعال و نانوکپسول-های حامل آن‌ها (به این معنی که با افزایش غلظت پپتیدها و نانوکپسول‌ها، مهار رشد باکتری‌ها اتفاق می‌افتد که این مورد در تحقیق حاضر نیز ثبت و تأیید شد)، عدم بهینه‌بودن وزن مولکولی [۳۲] و درجه هیدرولیز [۳۱]، عدم وجود یا کمبود برخی از اسیدهای آمینه با خاصیت ضد میکروبی در زنجیره پپتیدی، مناسب نبودن خواص فیزیکی نانوکپسول‌های حامل (میانگین سایز ذرات، شاخص توزیع اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی) برای اعمال خاصیت ضد باکتریایی و ... اشاره کرد.

۵- نتیجه‌گیری

با انجام عمل نانوریزپوشانی می‌تواند مربوط به افزایش سطح تماس باشد. همچنین پایداری فعالیت ضد باکتریایی 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 زیست‌فعال) در برابر شرایط محیطی از جمله دمای یخچال، رطوبت و ... محافظت و خواص آن را حفظ کند. در پژوهش ریحانی پول و یگانه (۲۰۲۳) که رنگدانه آستاگزانتین مستخرج از میکروجلبک هماتوکوکوس پلوویالیس^۴ با استفاده از پوشش ترکیبی مالتودکسترین-کازئینات سدیم (و روش خشک‌کردن انجمادی) نانوریزپوشانی شد، افزایش فعالیت ضد باکتریایی و پایداری این فعالیت (طی ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال) در آستاگزانتین گزارش گردید [۴]. در تحقیق دیگری ثابت شد که نانوریزپوشانی رنگدانه فیکوسیاین با استفاده از پوشش-های مالتودکسترین و کازئینات سدیم (و روش خشک‌کردن انجمادی) می‌تواند فعالیت ضد باکتریایی رنگدانه را تقویت و به پایداری این خاصیت (طی ۶۰ روز نگهداری در دمای یخچال) کمک کند [۲۶]. یافته‌های دو پژوهش مذکور با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارند. در مقابل، در تحقیق یگانه و ریحانی پول (۱۴۰۰) که پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو در قالب نانولپوزوم ریزپوشانی شدند، مشخص گردید که فعالیت مهار رشد باکتری‌های *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* در پپتیدهای زیست‌فعال آزاد و نانولپوزوم‌های حامل اختلاف معنی‌داری ندارند [۳۰].

نتایج تحقیق پیش‌رو نشان داد حساسیت باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی (مورد مطالعه) نسبت به پپتیدهای زیست‌فعال و بخصوص نانوکپسول‌های حامل آن‌ها بیشتر است. این حساسیت بالاتر احتمالاً مربوط به عدم وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت است. لایه لیپوپلی ساکاریدی در دیواره

۶-تشریح و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۴-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

تامین مالی

نویسنده اعلام می‌کند که هیچ بودجه‌ای دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام فعالیت‌ها توسط نویسنده انجام شده است.

منافع رقابتی

نویسنده تایید می‌کند که هیچ‌گونه تضاد منافع مالی یا منافع رقابتی در این مطالعه ندارد.

۷-منابع

- [1] Alishahi, A. Antibacterial effect of chitosan nanoparticle loaded with nisin for the prolonged effect. *Journal of Food Safety*, 2014; 34(2), 111-118.
- [2] Ayrapetyan, O. N., Obluchinskaya, E. D., Zhurishkina, E. V., Skorik, Y. A., Lebedev, D. V., Kulminkaya, A. A., and Lapina, I. M. Antibacterial properties of fucoidans from the brown algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology*, 2021; 10(1), 67-81.
- [3] Gharekhan Taghar Tapeh, R., Kordjazi, M., Ahmad Nasrollahi, S., Shabanpour, B., and Adeli, A. Investigation of antioxidant properties and antibacterial activity of alginate and fucoidan extracted from *Sargassum boveanum* algae collected from the Persian Gulf coast. *Aquaculture Sciences*, 2020; 7(2), 64-76 [In Persian].
- [4] Reyhani Poul, S., and Yeganeh, S. 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*. 2023; 20(140), 52-65.
- [5] Safari, R., Raftani Amiri, Z., and Esmaeilzadeh Kenari, R. Antioxidant and antibacterial activities of C-phycoerythrin from common name *Spirulina platensis*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2020; 19(4), 1911-1927 [In Persian].
- [6] Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., and Shabanpour, B. Antioxidant and antibacterial effect of protein hydrolysis of yellowfin tuna waste on flesh quality parameters of minced silver carp. *Journal of Genetic Resources*, 2017; 3(2), 103-112.
- [7] Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., and Chamcheun, C. Production of fish protein hydrolysates by acid and enzymatic hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering*, 2015; 4(6), 466-470.

- [8] Sánchez, A., & Vazquez, A. Bioactive peptides: A review. *Food quality and safety*, 2017; 1(1), 29-46.
- [9] Cunha, S. A., and Pintado, M. E. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 2022; 119, 348-370.
- [10] Ng, W. J., Wong, F. C., Abd Manan, F., Chow, Y. L., Ooi, A. L., Ong, M. K., and Chai, T. T. Antioxidant Peptides and Protein Hydrolysates from Tilapia: Cellular and In Vivo Evidences for Human Health Benefits. *Foods*, 2024; 13(18), 29-45.
- [11] Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., and Hernandez-Escalante, V. M. Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International*, 2011; 27(3), 213-226.
- [12] Reyhani Poul, S. and Yeganeh, S. Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2022; 21(4), 987-1003.
- [13] Hasani, Sh., Shahidi, M. and Ojagh. M.. 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*. 2018; 8 (1), 31-44 [In Persian].
- [14] Rao, P. S., Bajaj, R. K., Mann, B., Arora, S., and Tomar, S. K. Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin-gum arabic blend. *Journal of Food Science and Technology*. 2016; 53, 3834-3843.
- [15] Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., and Mohammadi, A. Application of gum Arabic and maltodextrin for encapsulation of eggplant peel extract as a natural antioxidant and color source. *International journal of biological macromolecules*. 2019; 140, 59-68.
- [16] Shaviklo, A., and Moradi, Y. Supplying nutritional needs of livestock and humans from lanternfishes. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 2019; 28 (4), 89-102.
- [17] Kazemi, M., Ojagh, S. M., Abdollahi, M., and Alishahi, A. Extraction optimization of gel-forming proteins and collagen hydrolysate from whole lanternfish (*Benthosema pterotum*) with a biorefinery approach. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 2024; 13(2), 157-175.
- [18] Shaviklo, A. R. 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), 2020; 827-843.
- [19] Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food chemistry*. 2009; 115(1), 238-242.
- [20] Alahmad, K., Xia, W., Jiang, Q., and Xu, Y. Effect of the degree of hydrolysis on nutritional, functional, and morphological characteristics of protein hydrolysate produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) using ficin enzyme. *Foods*. 2022; 11(9), 13-20.
- [21] Reyhani Poul, S., and Jafarpour, A. Effects of degree of hydrolysis on functional properties and antioxidants activity of hydrolysate from head and frame of common carp (*Cyprinus carpio*) fish. *Journal of Food Science and Technology*. 2017; 68(14), 113-124 [In Persian].
- [22] AOAC. 2002. Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- [23] Yaghoobzadeh, Z., Kaboosi, H., Peyravii Ghadikolaii, F., Safari, S., and Fattahi, E. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2017; 28 (2), 117-129 [In Persian].
- [24] Machado, A. R., Assis, L. M., Costa, J. A. V., Badiale-Furlong, E., Motta, A. S., Micheletto, Y. M. S. and Souza-Soares, L. A.. Application of sonication and mixing for nanoencapsulation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in liposomes. *International Food Research Journal*. 2014; 21(6), 2201-2206.
- [25] Yan, M., Liu, B., Jiao, X., and Qin, S. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. *Food and bioproducts processing*. 2014; 92(1), 89-97.
- [26] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul, S., and Esmailzadeh Kenari, R. 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*. 2022; 127 (19), 345-347 [In Persian].
- [27] Sarada, R. M. G. P., Pillai, M. G. and Ravishankar, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*. 1999; 34(8), 795-801.

- [28] Sitohy, M., Osman, A., Ghany, A. G. A. and Salama, A. Antibacterial phycocyanin from *Anabaena oryzae* SOS13. *International Journal of Applied Research in Natural Products*. 2015; 8(4), 27-36.
- [29] Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., and Bougatef, A. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*. 2014; 55(1), 183-188.
- [30] Yeganeh, S., and Reyhani poul, S. 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*. 2022; 30 (6), 83-95 [In Persian].
- [31] Shah Hosseini, R., Javadian, S. R., and Safari, R. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of Liza abu viscera protein hydrolysate. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 2023; 15(1), 143-155 [In Persian].
- [32] Reyhani Poul, S., Yeganeh, S., and Safari, R. Effect of molecular weight on antibacterial, antioxidant activity and functional properties of bioactive peptides produced from enzymatic hydrolysis of head and shell of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hygiene*. 2021; 11(42), 91-106 [In Persian].
- [33] Zhou, Q. J., Wang, J., Liu, M., Qiao, Y., Hong, W. S., Su, Y. Q., and Zheng, W. Q. Identification, expression and antibacterial activities of an antimicrobial peptide NK-lysin from a marine fish *Larimichthys crocea*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016; 55, 195-202.
- [34] Rajendran, S. Biologically active protein hydrolysates from dogfish «*Squalus acanthias*» skin. (Doctoral dissertation, McGill University). 2013.
- [35] Zhang, L., Liu, Y., Tian, X., and Tian, Z. Antimicrobial Capacity and Antioxidant Activity of Enzymatic Hydrolysates of Protein from R ushan Bay Oyster (*C rassostrea gigas*). *Journal of Food Processing and Preservation*. 2015; 39(4), 404-412.
- [36] Ghelichi, S., Shabanpour, B., and Pourashouri, P. Proximate and amino acid composition, antioxidant properties, ACE inhibitory effect, and antibacterial power of protein hydrolysates of common carp roe by Alcalase. *Fisheries Science and Technology*. 2018; 7(2), 145-155.
- [37] Amissah, J. Bioactive properties of salmon skin protein hydrolysates. Doctoral dissertation, McGill University Libraries. 2012.
- [38] Mahdavi, Y. M., Nouri, L., and Azizi, M. H. Antimicrobial activity of active peptide extracted from quinoa on *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Science and Technology*, 2019; 91(16), 315-322 [In Persian].



Scientific Research

The effect of maltodextrin-gum arabic combined carrier and freeze drying method on the antibacterial activity of lanternfish (*Benthosema pterotum*) bioactive peptides against bacteria causing food spoilage

Soheyl Reyhani Poul^{1*}, Sakineh Yeganeh², Farzaneh Shakerian³, Faezeh Tork Pahnabi⁴, Arash Rakhshani³

1- PhD graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

3- Postgraduate education student, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

4- Laboratory expert, Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education And Extension Organization, Sari, Iran

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2025/08/19

Review: 2026/02/27

Accepted: 2026/05/26

Keywords:

Lanternfish,

Bioactive peptides,

Nanoencapsulation,

Gum arabic,

Listeria monocytogenes,

MIC

DOI: 10.48311/fsct.2026.84087.0

*Corresponding Author E-

soheylreyhani@gmail.com

During the last two decades, research on the use of natural preservatives in food instead of chemical compounds has attracted the attention of researchers due to their safety. Bioactive peptides are one of the natural compounds that have a high potential to prevent food spoilage (oxidative and microbial). The aim of the current research was nanoencapsulation of bioactive peptides produced from lanternfish (*Benthosema pterotum*) (with a molecular weight of less than 3 kDa) using freeze-drying method and maltodextrin-gum arabic combined coating and then evaluating the antibacterial activity of carrier nanocapsules and free peptides against food spoilage bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. According to the results, nanoencapsulation of bioactive peptides in addition to increasing their antibacterial activity (increasing the diameter values of non-growth halo of bacteria and reducing MIC and MBC), also caused the stability of this property during 60 days of storage of carrier nanocapsules at 4°C ($p < 0.05$). Increasing the concentration of bioactive peptides and nanocapsules carrying them (from 30 to 150 µg/ml) was often associated with increasing the diameter of the non-growth halo of bacteria ($p < 0.05$). Among the bacteria, the highest diameter values of non-growth halo and the lowest MIC and MBC were recorded for *Listeria monocytogenes*. Also, the sensitivity of gram-positive bacteria to bioactive peptides and carrier nanocapsules was reported to be higher than gram-negative bacteria. The free peptides on day 60 and the concentration of 500 µg/ml were able to inhibit *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* bacteria, but they could not eliminate these bacteria. This is while the nanoencapsulated form of these peptides (carrier nanocapsules) at the same concentration was able to kill the mentioned bacteria. According to the findings, nanoencapsulation of bioactive peptides using freeze-drying method and combined coating of maltodextrin-gum arabic increases and stabilizes antibacterial activity and, as a result, makes them more effective in food formulations.