

## تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال به‌دست‌آمده از ضایعات ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز

شیرین حسنی<sup>۱</sup>، مصطفی شهیدی نوقابی<sup>۲\*</sup>، سیدمه‌دی اجاق<sup>۳</sup>

- ۱- دانش‌آموختهٔ دکتری فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- ۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران  
\* نویسنده مسئول: مصطفی شهیدی نوقابی (m.shahidi@rifst.ac.ir)
- ۳- دانشیار، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

### چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۰  
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۵

### واژه‌های کلیدی

پپتید زیست‌فعال  
رهایش  
فعالیت آنتی‌اکسیدانی کیتوزان  
نانولیپوزوم

در سال‌های اخیر مطالعه‌های متعددی روی تولید پپتیدهای زیست‌فعال از ضایعات ماهی، به‌واسطهٔ اثرات مفید آن بر سلامتی انسان، متمرکز شده است. لیکن تولید پپتیدهای زیست‌فعال نیازمند روش‌های محافظتی می‌باشد تا علاوه بر افزایش پایداری در محیط گوارش و جذب فعال، منجر به رهایش کنترل‌شده و بهینه‌سازی تأثیر آن طی مصرف گردد. تحقیق حاضر با هدف ایجاد یک سیستم نانولیپوزومی فسفولیپیدی خوراکی حامل پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از پروتئین هیدرولیزشده (FPH) ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) توسط آنزیم آلکالاز با پوشش کیتوزان (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد وزنی/حجمی) انجام گرفت. نتایج نشان داد کیتوزان تا حد زیادی سبب بهبود پایداری در نانولیپوزوم گردید. میانگین اندازهٔ ذرات نانولیپوزوم در محدودهٔ ۳۳۹ تا ۴۵۹ نانومتر با پتانسیل زتای ۵۱/۷- تا ۵۰+ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی (PDI) ۰/۳۸۸ تا ۰/۴۸۷ قرار داشت. مقادیر راندمان ریزپوشانی به‌طور قابل‌توجهی مؤثر از تغییرات غلظت کیتوزان در پوشش بود و حدکثر راندمان ریزپوشانی (۸۶±۲/۶۵ درصد) در نانولیپوزوم حامل با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان مشاهده شد. بررسی میزان رهایش پپتید در محیط‌های شبیه‌سازی‌شدهٔ معده و روده حاکی از تأثیر پوشش بر افزایش پایداری پپتیدها در محیط‌های بیولوژیکی شبیه‌سازی‌شده بود. همچنین ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌وسیلهٔ آزمون‌های دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و ۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS)) بیانگر وجود فعالیت بالای مهارکنندگی رادیکال در نانولیپوزوم‌های حامل پپتید در نمونه‌های با پوشش کیتوزان و فاقد پوشش بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال در حامل لیپوزومی می‌تواند رویکردی مفید در جهت کاربرد مستقیم پپتیدها با قابلیت آنتی‌اکسیدانی در فرآورده‌های غذایی باشد.

### مقدمه

ضدباکتری، ضداکسیداسیونی، ضدسرطان، کاهش فشارخون بالا، تحریک‌کنندهٔ سیستم ایمنی و کاهش کلسترول خون در تولید محصولات غذایی فراسودمند برای ارتقاء سطح سلامت مصرف‌کننده و بهبود ماندگاری

منابع دریایی با تولید حجم بالایی از ضایعات و تولیدات جانبی منبع غنی و ارزشمند از ترکیبات زیست‌فعال ساختاری هستند که می‌توانند به جهت دارابودن اثرات

محصولات غذایی و یا در صنعت دارو مورد استفاده قرار گیرند. اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، از یک سو باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر به لحاظ داشتن پروتئین های باارزش قابل بازیافت می باشند. امروزه مطالعه های بسیاری با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH<sup>۱</sup>) برای تولید فراورده های باارزش افزوده بالا متمرکز شده است (Galla, Pamidighantam, Akula, & Karakala, 2012; Nasri et al., 2013).

هیدرولیز آنزیمی مؤثرترین و مرسوم ترین روش هیدرولیز پروتئین است که از طریق افزودن آنزیم های متعدد مانند آلکالاز، پاپاین، پپسین، تریپسین، آلفا-کیموتریپسین، پانکراتین، فلاورزایم، پروناز، نیتراز، پروتامکس، بروملاین، پروتاز N، پروتاز A، ترمولایزین و والیداز به منظور بازیابی پپتیدهای زیست فعال قوی می باشد (Chalamaiah, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012). تحقیق های زیادی در خصوص هیدرولیز آنزیمی قسمت های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم های تجاری انجام گرفته است. با توجه به مطالعه های آنزیم های با منشأ میکروبی نسبت به سایر آنزیم ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می توان به پایداری بیشتر در حرارت و pH های بالا و همچنین خصوصیات مناسب پروتئولیتیکی<sup>۲</sup> اشاره نمود (Diniz & Martin, 1996). آنزیم آلکالاز با داشتن هزینه نسبتاً پایین در میان سایر آنزیم ها، قابلیت بسیار بالایی در هضم منابع پروتئینی از خود نشان داده است. پروتئین هیدرولیزه ماهی در طیف وسیعی از pH های مختلف دارای حلالیت مناسبی می باشد و معمولاً حرارت زیادی را بدون ایجاد رسوب تحمل می کند. به علاوه، سبب بهبود خواص بافت، امولسیون کنندگی، کف کنندگی، ظرفیت نگهداری آب و پایداری فراورده های غذایی می گردند (Taheri, Sabeena Farvin, Jacobsen, & Baron, 2014). پپتیدهای مشتق شده از پروتئین های ماهی با استفاده از تکنیک هیدرولیز آنزیمی، فعالیت های آنتی اکسیدانی قابل توجهی را در سیستم های مختلف اکسیداتیو از خود نشان می دهند (Lassoued et al., 2015; Nalinanon, Benjakul, Kishimura, & Shahidi, 2011; Razali, Amin, & Sarbon, 2015; Vignesh,

اغلب پپتیدهای آنتی اکسیدانی که تاکنون شناسایی شده اند کوتاه زنجیره و حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب<sup>۳</sup> در توالی خود هستند. آنها به طور قابل ملاحظه ای به تخلیه رادیکال های آزاد کمک می کنند؛ زیرا زنجیره های جانبی فنولی آنها به عنوان اهداکنندگان الکترونی قوی عمل می کنند؛ به این ترتیب امکان خاتمه واکنش زنجیره ای رادیکال آزاد را فراهم می آورند (Picot et al., 2010). Centenaro و همکاران (۲۰۱۴) پیشنهاد کردند که وجود آمینواسیدهای گوگرددار و هیدروفوب بیشتر باعث افزایش حلالیت و فعالیت آنتی اکسیدانی می گردد. برای تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی FPH، دو یا چند سیستم رادیکال برای تجزیه و تحلیل مورد نیاز است (Centenaro et al., 2014). در تحقیق حاضر از روش های اندازه گیری مهار رادیکال آزاد دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH<sup>۴</sup>) و ۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS<sup>۵</sup>)) برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال استخراج شده و نانولیپوزوم های حامل پپتید استفاده شد.

Jahandideh, Chakrabarti و Wu (۲۰۱۴) به بررسی خواص ضدالتهابی مواد غذایی حاوی پپتیدها از جمله پروتئین هیدرولیز شده ماهی پرداختند. آنها دریافتند پپتیدهای به دست آمده باعث ایجاد فعالیت های بیولوژیک دیگری همچون واکنش های فیزیولوژیکی ضد میکروبی، فارماکولوژیک و ایمنولوژیک می شوند (Danquah & Agyei, 2012). پپتیدهای زیست فعال بایستی در طول هضم و جذب، قبل از ورود به جریان خون برای اعمال اثرات فیزیولوژیک خود، فعال باقی بمانند (Segura-Campos, Chel-Guerrero, Betancur-Ancona, & Hernandez-Escalante, 2011). پپتیدهای زیست فعال ممکن است در شرایط اسیدی معده و در حضور آنزیم های پروتئولیتیک معده و روده، دناتوره شده و به پپتیدهای کوچک تجزیه شوند. تلخی ناخوشایند پپتیدهای آب گریز و همچنین موانع ذکر شده سبب محدودیت استفاده از این ترکیبات در محصولات غذایی می گردد (Segura-Campos et al., 2011). امروزه انواع روش های خوراکی مانند افزودن انواع با دارنده های پروتئاز و سایر اصلاحات شیمیایی برای

<sup>3</sup> Hydrophobic Amino Acids

<sup>4</sup> Diphenyl-1-picrylhydrazyl

<sup>5</sup> 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)

<sup>1</sup> Fish Protein Hydrolysate

<sup>2</sup> Proteolytically

بالین وجود، سیستم‌های تحویل مبتنی بر لیپید، به دلیل کم ثباتی، در محیط اسیدی نمک‌های صفراوی و لیپاز معده مناسب نمی‌باشند (Page & Cudmore, 2001). استفاده از سیستم‌های پلیمری چسبنده مخاطی مانند کیتوزان، مهم‌ترین گام در جهت افزایش تحویل لیپوزومی پپتیدهای زیست‌فعال به شکل خوراکی می‌باشد. به طوری که ثبات حامل لیپوزومی و راندمان جذب در دستگاه گوارش می‌تواند تا حدود زیادی توسط یک لایه پوشش کیتوزانی افزایش یابد که می‌توان به اتصال کیتوزان و لیپوزوم از طریق واکنش‌های الکترواستاتیک بین گروه‌های کاتیونی کیتوزان و گروه‌های فسفولیپید آنیونی نسبت داد. لذا باتوجه به میزان زیاد ضایعات ماهی در کشور و همچنین وجود پتانسیل بالقوه تولید فرآورده‌هایی با ارزش افزوده از این مواد، هدف از این پژوهش، بررسی امکان تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال با خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای غلبه بر چالش‌های موجود در مسیر استفاده از این ترکیبات ارزشمند در صنایع غذایی و دارویی، مورد توجه قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

برای هیدرولیز آنزیمی امعاوحشا ماهی کپور معمولی<sup>۵</sup> از آنزیم آلکالاز (فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) گرفته شده از باکتری *Bacillus licheniformis*<sup>۶</sup> استفاده شد. آنزیم آلکالاز از شرکت سیگما آلدردیج خریداری و تا انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. هیدروکسید سدیم، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (درجه داستیلاسیون ۷۵-۸۵ درصد)، سرم آلبومین گاوی<sup>۷</sup>، معرف DPPH و ABTS، اسید آسکوربیک، پپسین و اسید هیدروکلریک از شرکت مرک آلمان خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

#### تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی

امعاوحشا ماهی کپور معمولی از سد و شمشگیر واقع در ۴۰ کیلومتری شهرستان گرگان تهیه و توسط دستگاه چرخ‌گوشت کاملاً مخلوط گردید. سپس به منظور غیرفعال نمودن آنزیم‌های داخلی، نمونه در دمای ۸۵ درجه

محافظت از پپتیدهای بیولوژیک در برابر تخریب اسیدی و آنزیمی دستگاه گوارش، بازدهی بالای جذب در مخاط اپیتلیوم<sup>۱</sup> و همچنین بهبود زیست‌پذیری پپتیدهای فعال خوراکی طراحی شده‌اند (Rekha & Sharma, 2011). بالین وجود بازدارنده‌های آنزیمی اثرات جانبی زیان‌آوری را در درازمدت ایجاد می‌کنند. هنگامی که فعالیت آنزیم روده مهار گردد و عمل هضم به تأخیر افتد، در نتیجه مکانیسم بازخورد، آنزیم‌ها توسط پانکراس بیش‌ازپیش تولید خواهد شد که منجر به هیپرتروفی پانکراس<sup>۲</sup> و هیپرپلازی<sup>۳</sup> می‌شود (Rekha & Sharma, 2011).

لذا در این راستا استفاده از تکنیک ریزپوشانی، روشی عملی برای محافظت از پپتیدهای زیست‌فعال در برابر هضم با استفاده از پوشش و تشکیل کپسول است. درون‌پوشانی، تکنولوژی به‌دام‌انداختن مواد جامد، مایع یا گازی در کپسول‌هایی که محتویات خود را در سرعت‌های کنترل‌شده و تحت شرایط ویژه آزاد می‌کنند، می‌باشد که شامل مراحل تشکیل دیواره اطراف ترکیب زیست‌فعال، اطمینان از عدم نشت این ترکیبات به بیرون و عدم پوشش ترکیبات نامطلوب در کپسول است. یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست‌فعال و غذا دارو استفاده می‌شود، لیپوزوم‌ها می‌باشند. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به‌ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب، ساختارهای کروی دولایه‌ای را ایجاد می‌کنند (Ghorbanzade, Jafari, Akhavan, & Hadavi, 2017). این ترکیبات به دلیل خاصیت دوگانه‌دوست<sup>۴</sup>، توانایی کپسوله‌کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل را دارند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند اما نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، به علت اندازه ذرات کوچک‌تر، ناحیه سطحی بیشتری را فراهم کرده و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی، رهایش کنترل‌شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله‌شده به نواحی هدف می‌شوند. همچنین دارای پایداری کلوئیدی بالاتر بوده و کدورت کمتری ایجاد می‌کنند (Rasti, Jinap, Mozafari, & Yazid, 2012).

<sup>1</sup> Epithelium

<sup>2</sup> Pancreatic Hypertrophy

<sup>3</sup> Hyperplasia

<sup>4</sup> Amphiphilic

<sup>5</sup> Cyprinus Carpio

<sup>6</sup> *Bacillus Licheniformis*

<sup>7</sup> Bovine Serum Albumin

تهیه نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال پروتئین هیدرولیز شده برای رسیدن به پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون از اولترافیلتراسیون (EMD، Millipore، Merck KGaA، Darmstadt، ساخت آلمان) عبور داده شد. سپس برای تهیه نانولیپوزوم‌های حامل پپتید، هیدرولیز پروتئین (۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و فسفولیپید/کلسترول در آب مقطر هیدراته شده و با گلیسرول تا دمای ۶۰-۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. pH مخلوط توسط هیدروکسید سدیم ۲ مولار و حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد با تکان دادن مداوم به مدت ۱ ساعت توسط شیکر به ۷/۳ رسانده شد. لیپوزوم‌های خام، تحت فشار بالا هموژن شده و با نسبت‌های متفاوتی (۰/۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد وزنی/حجمی) از محلول کیتوزان (محلول کیتوزان با حل شدن کیتوزان در اسید استیک ۱ درصد (وزنی/وزنی) تهیه می‌گردد) در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه مخلوط گردید. محلول لیپوزومی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سونیکاتور با پروب ۲۰۰ یو.بی.اس تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزوم‌ها در دمای محیط تحت گاز نیتروژن قرار گرفته و برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد (Rasti et al., 2012).

ارزیابی خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید اندازه ذره و تعیین توزیع اندازه ذره‌ای (PDI<sup>۴</sup>) اندازه ذره‌ای و توزیع اندازه ذره‌ای لیپوزوم‌ها پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا<sup>۵</sup> توسط دستگاه زتاسایزر (Malven، Nano ZS، ساخت انگلستان) انجام گردید.

تعیین پتانسیل زتای سطح لیپوزوم‌ها در مطالعه حاضر، اندازه‌گیری پتانسیل زتای سطح لیپوزوم‌ها توسط دستگاه زتاسایزر انجام شد. لیپوزوم‌ها توسط بافر فسفات (pH=۷/۴، ۵۰ میلی‌مولار) به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و ارزیابی در زاویه پراکنش ۱۷۳ درجه سانتی‌گراد و طول موج هلیوم-تنگستن ۶۳۳ نانومتر و در دمای اتاق صورت گرفت.

سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. امعاوحشا توسط محلول بافر فسفات با نسبت ۲:۱ (وزنی:حجمی) رقیق و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط مخلوط شدند. سپس برای رسیدن به pH بهینه برای فعالیت آنزیم با هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال مخلوط به pH برابر ۸/۵ رسانده شد. برای تهیه FPH، عمل هیدرولیز در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ گرم از نمونه در دستگاه انکوباتور متحرک (Comecta، ساخت اسپانیا) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آنزیم آلکالاز (۲/۴ واحد آنسون به ازای ۱ میلی‌لیتر آنزیم) به نمونه‌ها به نسبت ۱ درصد وزن مخلوط اضافه گردید. در انتهای آزمایش با هدف قطع واکنش‌های آنزیمی، نمونه‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. نمونه‌ها بعد از رسیدن به دمای اتاق توسط سانتریفیوژ (Hermle، Labrotechnich GmbH z206a، ساخت آلمان) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در ۸۰۰۰×g سانتریفیوژ و مایع روماند<sup>۱</sup> جمع‌آوری گردید (Ovissipour et al., 2009).

#### اندازه‌گیری درجه هیدرولیزاسیون (DH درصد)

میزان هیدرولیز (DH<sup>۲</sup>) در نمونه با تری‌کلرواستیک اسید (TCA<sup>۳</sup>) ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) طبق روش Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور محلول پروتئینی با حجم یکسان با محلول TCA کاملاً مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۶۷۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس غلظت پروتئین محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به روش بیورت تعیین گردید. درجه هیدرولیز (DH) طبق رابطه (۱) محاسبه گردید.

رابطه (۱)

$$DH (\%) = \frac{\text{نیتروژن محلول در نمونه } - 10\% \text{ TCA}}{\text{نیتروژن کل نمونه}}$$

در رابطه (۱)، میزان هیدرولیز (DH) در نمونه‌های مورد آزمایش ۴۳/۵±۰/۲۱ درصد اندازه‌گیری شد.

<sup>۱</sup> supernatant

<sup>۲</sup> Degree of Hydrolysis

<sup>۳</sup> Trichloroacetic Acid

<sup>۴</sup> Particle Dispersity Index

<sup>۵</sup> Dynamic Light Scattering

با غلظت متفاوت کیتوزان در محیط‌های شبیه‌سازی شده Agrawal, Harde, ) SIF و SGF انکوباسیون شدند (Thanki, & Jain, 2013). برای آماده‌سازی محیط معده ۱۰۰ میلی‌گرم پپسین در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۰/۳۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم کلرید سدیم به محلول اضافه گردید. حجم نهایی محلول توسط آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. pH نهایی محلول با استفاده از اسید هیدروکلریک غلیظ به ۱/۲ تنظیم گردید. آماده‌کردن محیط روده با حل نمودن ۳۴۰ میلی‌گرم از پتاسیم فسفات مونوبازیک<sup>۵</sup> در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر انجام گرفت. سپس ۴ میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۲ مولار و ۵۰۰ میلی‌گرم پانکراتین به محلول تهیه‌شده افزوده شد. حجم نهایی محلول به ۵۰ میلی‌لیتر و PH نهایی به ۶/۸ رسانده شد. برای انجام آزمایش ۲۰ میکرولیتر از نمونه نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش و پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان تا رسیدن به حجم ۱ میلی‌لیتر رقیق‌شده و در تیوب‌های میکروسانتریفیوژ با هر دو محلول شبیه‌سازی‌شده توسط ترمومیکسر (مدل 300.16 RO, Gerhardt, ساخت آلمان) به‌طور مداوم انکوبه شدند. مدت زمانی انکوباسیون برای محیط SGF، ۴ ساعت و محیط SIF، ۲ ساعت در نظر گرفته شد. در فواصل زمانی موردنظر در هر دو محیط مقادیر FPH براساس روش اندازه‌گیری پروتئین با کیت BCA اندازه‌گیری گردید.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید

#### فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

ظرفیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در نمونه‌ها طبق روش Taheri و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد. قبل از انجام آزمایش نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌منظور رهايش پپتيدها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱۶ میلی‌مولار (محلول در اتانول ۹۵ درصد) مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تاریک قرار داده شدند و در انتها میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نمونه شاهد نیز به روش مشابه تهیه و

#### تعیین راندمان ریزپوشانی نانولیپوزوم‌ها (EE<sup>۱</sup> درصد)

بررسی راندمان ریزپوشانی طبق روش Li (۲۰۱۴) با اندکی تغییر انجام گرفت. به‌طور خلاصه، در این روش راندمان ریزپوشانی از طریق محاسبه نسبت FPH کپسوله‌شده به FPH آزاد با استفاده از کیت سنجش پروتئین (BCA<sup>۲</sup>) (MA, Waltham, Thermo Scientific) ساخت آمریکا) ارزیابی شد. بدین ترتیب میزان پپتید آزاد (غیرکپسوله) اندازه‌گیری و با اختلاف FPH کل و FPH آزاد، مقادیر FPH کپسوله‌شده محاسبه گردید. این روش براساس واکنش احیای Cu<sup>2+</sup> به Cu<sup>1+</sup> توسط پروتئین در محیط قلیایی و تکنیک رنگ‌سنجی انجام می‌شود. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان به مدت ۱۰ دقیقه با ۸۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری گردید (Channarong, 2011, Chaicumpa, Sinchaipanid, & Mitrevej). درخصوص نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش نیز، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۴۰۰۰۰۰ دور بر دقیقه، سانتریفیوژ (Hitachi, CP100WX, ساخت ژاپن)، سپس مایع رویی جمع‌آوری گردید (Liu, Liu, 2015, Zhu, Gan, & Le).

در ادامه ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رومانند با استفاده از اولترافیلتراسیون فیلتر و بدین ترتیب FPH کپسوله‌نشده و کیتوزان آزاد جدا گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه با معرف BCA به نسبت ۲۰:۱ مخلوط‌شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قبل از قرائت میزان جذب در ۵۶۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل UV-VIS 6800, Jenway, کشور آلمان) قرار داده شد. لیپوزوم‌های خام تهیه‌شده (فاقد FPH) سانتریفیوژ و فیلتر شدند و به‌عنوان شاهد در اسپکتروفتومتر مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر FPH که توسط عمل سانتریفیوژ و شست‌وشو حذف نگردیدند، کاملاً در داخل نانولیپوزوم‌ها کپسوله شده بودند.

#### رهايش FPH در محیط‌های شبیه‌سازی‌شده معده (SGF<sup>۳</sup>) و روده (SIF<sup>۴</sup>)

به‌منظور ارزیابی پایداری و اثرات محافظتی پوشش کیتوزان، نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش و پوشش‌دهی‌شده

<sup>1</sup> Encapsulation Efficiency

<sup>2</sup> Bicinchoninic Acid

<sup>3</sup> Simulated Gastric Fluid

<sup>4</sup> Simulated Intestinal Fluid

<sup>5</sup> Potassium Phosphate Monobasic

## نتایج و بحث

### ارزیابی خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید اندازه ذره و تعیین توزیع اندازه ذره (PDI)

اندازه ذرات یک عامل مهم و اثرگذار بر میزان پایداری، راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات زیست‌فعال می‌باشد. همان‌طور که در جدول (۱) مشاهده می‌شود میانگین اندازه ذرات لیپوزوم‌های تهیه‌شده با سونیکاسیون میله‌ای حدود ۳۳۴/۵ تا ۴۵۹/۱ نانومتر و دارای شاخص پراکندگی در محدوده ۰/۳۸۷ تا ۰/۴۸۴ بود که نشان‌دهنده اندازه ذره مناسب و یکنواختی توزیع ذرات است و با نتایج Rasti و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد. نتایج نشان داد نانولیپوزوم‌های حامل پپتید پوشش‌دهی شده با کیتوزان، اندازه‌های کوچک‌تر از نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش داشتند. به‌طوری‌که با افزایش غلظت کیتوزان، اندازه ذرات روندی کاهشی را نشان داد (جدول ۱). Da Boelter, Da Silva, Brandelli و Silveira (۲۰۱۴) میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های فسفاتیدیل کولین حاوی پپتیدهای ضد میکروبی را ۱۵۰ نانومتر و همچنین Hosseini, Ramezanzade و Nikkhah (۲۰۱۷) نیز اندازه ذرات لیپوزوم‌های تولیدشده را ۱۳۱/۵ نانومتر گزارش نمودند که همسو با نتایج تحقیق حاضر بود. Bang و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود علت کاهش در اندازه لیپوزوم‌ها را با افزودن مقادیر بالای کیتوزان، به‌دلیل نیروی انقباض ناشی از مقاومت یونی بین لیپوزوم‌های بارگذاری‌شده و پوشش‌دهی‌شده با کیتوزان بیان کردند به‌طوری‌که با افزایش غلظت کیتوزان، نیروی انقباضی رشدیافته و منجر به کاهش بیشتر در اندازه ذرات می‌گردد (Bang et al., 2011). طبق مطالعه‌های صورت‌گرفته، اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها در تحقیق حاضر به‌منظور به‌کارگیری در صنایع غذایی و دارویی مناسب گزارش می‌شود (Wu et al., 2015). با توجه به اثرات اندازه ذرات بر میزان پایداری و همچنین ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصورشده در هسته، این شاخص بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق نتایج مرتبط با اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها با کارهای مشابه انجام‌شده توسط Duan, Zhang و Zhuang (۲۰۱۲) و همچنین Ghorbanzade و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت و اندک تفاوت مشاهده در نتایج می‌تواند به‌دلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین ترکیبات شرکت‌کننده در دیسپرسیون باشد.

اتانول ۹۵ درصد جایگزین نمونه قرار گرفت. منحنی استاندارد با استفاده از BHT در محدوده صفر تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آماده شد. در آزمون حاضر اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد با رابطه (۲) محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} = \text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (درصد)}$$

### فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS

قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS براساس روش Wang, Chi, Li, Zhang و Luo (۲۰۱۲) با اندکی اصلاحات اندازه‌گیری شد. در ابتدا نانولیپوزوم‌ها به مدت ۵ دقیقه به‌منظور رهایش پپتیدها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) مخلوط‌شده و در تاریکی به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید. محلول رادیکال ABTS در بافر فسفات پتاسیم نمکی (pH=۷/۴) تا رسیدن به جذب  $0.2 \pm 0.7$  در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۹۸۰ میلی‌لیتر از محلول ABTS با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مخلوط و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر قرائت گردید. محلول ABTS همراه با آب مقطر به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته می‌شود. توانایی مهارکنندگی رادیکال ABTS نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی حاضر برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و لون به ترتیب نرمال بودن و همگنی داده‌ها ارزیابی گردید. تمام تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و نمودارهای موجود با Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام پذیرفت. جهت بررسی اختلاف بین داده‌های حاصله، از تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و همچنین جهت تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح ( $P \leq 0.05$ ) استفاده شد.

## پتانسیل زتای سطح لیپوزوم‌ها

پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی سیستم‌های کلونیدی است. چون نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک است. کاهش اختلاف پتانسیل زتا به زیر مقدار بحرانی، موجب در هم ریختن لایه دوگانه باردار اطراف ذرات و تجمع ذرات می‌شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمامی لیپوزوم‌های حاوی پپتید دارای پتانسیل زتای بالا هستند که بیانگر نقش نیروی دافعه الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزوم‌ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. وقتی بار کلی روی ذرات افزایش می‌یابد، ذرات همدیگر را دفع کرده و بر توده‌ای شدن غلبه می‌کنند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهم در پایداری نانولیپوزوم‌ها هستند، مفید است (Mozafari et al., 2006). در مطالعه حاضر، میانگین پتانسیل زتا از  $-51/7$  میلی‌ولت در نمونه نانولیپوزوم فاقد پوشش تا  $+50$  میلی‌ولت در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با غلظت  $0/5$  درصد کیتوزان متغیر بود. ذراتی که پتانسیل زتای آنها از  $+30$  میلی‌ولت بیشتر یا از  $-30$  میلی‌ولت کمتر باشد، دارای بیشترین پایداری هستند. همان‌طور که در نتایج بدان اشاره گردید غلظت کیتوزان، عاملی تأثیرگذار بر مقادیر پتانسیل زتا بود (جدول ۱). به‌طوری که توانایی پلی‌الکتریک بار برای جذب به سطح لیپوزوم با بار مخالف و ایجاد تغییرات در میزان پتانسیل زتا به خوبی مشهود بود. باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل پتانسیل زتا می‌توان دریافت لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده پایدار، زمانی تشکیل می‌گردند که مقادیر کیتوزان نزدیک به غلظت بهینه باشند.

## راندمان ریزپوشانی نانولیپوزوم‌ها (EE درصد)

راندمان ریزپوشانی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین پایداری ترکیبات کپسوله‌شده می‌باشد، زیرا نشانگر توانایی نانولیپوزوم در جلوگیری از خروج هسته درونی است. راندمان ریزپوشانی در نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با در نظر گرفتن غلظت‌های متفاوت کیتوزان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تفاوت در مقادیر کیتوزان تأثیر معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) بر مقادیر راندمان ریزپوشانی داشت. به‌طوری که با افزایش درصد کیتوزان مورد استفاده در پوشش نانولیپوزوم‌ها، راندمان ریزپوشانی نیز افزایش داشت (جدول ۱). راندمان ریزپوشانی کمتر در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش را می‌توان به آسیب ناشی از عمل اولتراسانتریفیوژ دانست. ریزپوشانی پپتید در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دار ( $0/5$  درصد کیتوزان)  $86 \pm 2/65$  درصد گزارش گردید. به‌عبارت دیگر تنها کمتر از ۱۵ درصد از روغن ماهی به‌صورت غیرکپسوله وجود داشت که با نتایج هادیان، سحری، مقیمی، برزگر و عباسی (۱۳۹۲) مطابقت داشت. به‌طوری که تحقیق‌ها نشان داد روش فراصوت در عین سادگی، میزان درون‌پوشانی قابل‌قبولی دارد. ترکیبات زیست‌فعال، بسته به ویژگی‌های خاص خود نظیر حلالیت و قطبیت می‌توانند با لیپوزوم‌ها برهمکنش نمایند. به‌طوری که ممکن است در فاز آبی یا لیپیدی کپسوله‌شده و یا جذب قسمت سطحی لیپوزوم گردند. دانستن ویژگی‌های لیپوزوم جهت بهبود فرمولاسیون با کارایی کپسولاسیون مناسب، ضروری است. راندمان ریزپوشانی عاملی مؤثر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم مانند پایداری اکسیداتیو، پایداری فیزیکی، مورفولوژی و میزان رهایش می‌باشد. به‌طور کلی این دیدگاه وجود دارد که پایداری ترکیبات با افزایش راندمان، افزایش می‌یابد و برای دستیابی به شرایط بهینه باید راندمان ریزپوشانی را افزایش داد (Drusch et al., 2012).

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف کیتوزان ( $0/05$ ،  $0/01$  و  $0/5$  درصد) بر خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید

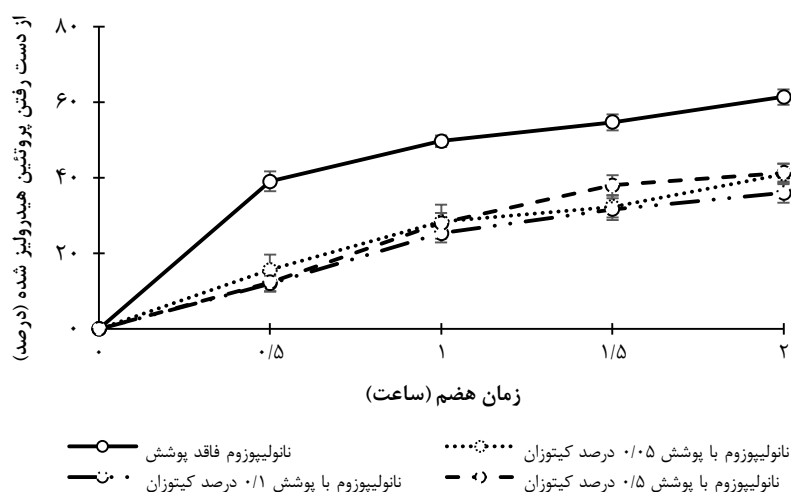
پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی ذرات	راندمان ریزپوشانی (EE درصد)
$-51/67 \pm 6/51$	$459/10 \pm 0/46$	$0/44 \pm 0/01$	$57/33 \pm 6/11$
$-32/00 \pm 2/00$	$429/30 \pm 2/08$	$0/39 \pm 0/00$	$60/00 \pm 6/24$
$30/67 \pm 1/15$	$384/90 \pm 4/36$	$0/48 \pm 0/00$	$75/00 \pm 3/61$
$50/33 \pm 2/52$	$334/50 \pm 4/14$	$0/42 \pm 0/01$	$86/00 \pm 2/65$

داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است.

انتشار هسته از طریق لایه‌های پوشش، بخش هیدروکربنی غشا و منافذ موجود در درون غشا نسبت داده‌اند. به‌طور کلی لیپوزوم‌های فاقد پوشش در محیط‌های اسیدی نسبتاً پایدار هستند (Li, 2014). با این وجود در pHهای کمتر از ۶/۵، محیط اسیدی می‌تواند سبب هیدرولیز فسفولیپیدهای اشباع‌شده و منجر به بی‌ثباتی لیپوزوم‌ها گردد (Grit, Underberg, & Crommelin, 1993). عدم پایداری در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش در محیط SIF عمدتاً به دلیل وجود پانکراتین، مخلوط پروتئولیتیک حاوی آنزیم لیپاز، فسفولیپاز و استراز کلسترول می‌باشد (Liu, 2013). بنابراین لیپوزوم‌ها طی عمل هیدرولیز، تخریب‌شده و سبب تراوش FPH کپسوله‌شده از منافذ و حفره‌های شکل‌گرفته در دو لایه لیپیدی گردد. همان‌طور که در شکل (۱) و (۲) مشاهده می‌شود لیپوزوم‌های دارای پوشش در هر دو محیط SGF و SIF نسبت به لیپوزوم‌های فاقد پوشش پایدارتر عمل نموده است که احتمالاً علت این پدیده تشکیل یک لایه محافظتی قوی با جذب الکترواستاتیک بین کیتوزان و سطح نانولیپوزوم می‌باشد، که بدین‌وسیله از مواجهه لیپوزوم با محیط خارجی ممانعت به‌عمل می‌آورد. در خصوص افزایش انتشار پپتید در نانولیپوزوم‌های با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان در محیط شبیه‌سازی‌شده روده، قابل ذکر است از آنجایی که کیتوزان، یک ماده بازی ضعیف است، با بالا رفتن pH به ۶/۸ در محیط SIF بار منفی خود را از دست می‌دهد.

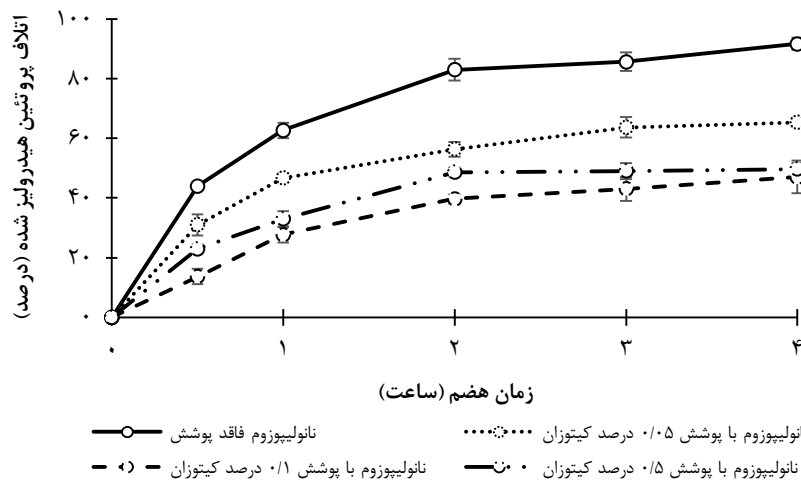
### بررسی رهایش FPH در محیط‌های شبیه‌سازی‌شده معده (SGF) و روده (SIF)

باتوجه به آنکه زمان تخلیه معده برای یک وعده غذایی استاندارد تقریباً ۱۱۲ دقیقه است (Cann et al., 1983)، درحالی‌که میانگین زمان انتقال در روده کوچک حدود ۲ الی ۴ ساعت به‌طول می‌انجامد (Davis, Hardy, & Fara, 1986). بنابراین بررسی رهایش پپتیدها در محیط شبیه‌سازی‌شده معده (SGF) در مدت زمان ۲ ساعت و در محیط شبیه‌سازی‌شده روده‌ای (SIF) به مدت ۴ ساعت طراحی شده است. شکل‌های (۱) و (۲) اثرات سطوح متفاوت پوشش کیتوزان را بر میزان انتشار در دو محیط در فواصل مختلف زمانی نشان می‌دهد. باتوجه به نتایج می‌توان بیان نمود میزان انتشار در تمامی تیمارها در هر دو محیط با گذشت زمان هضم، روندی مشابه داشت. نتایج نشان داد در محیط شبیه‌سازی‌شده معده، رهایش FPH در هر فاصله زمانی با افزایش سطح کیتوزان، کاهش معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) داشت. درصد تجمع رهایش FPH در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش طی ۲ ساعت عمل هضم در محیط معده، ۶۱/۳۳ درصد، درحالی‌که در نانولیپوزوم‌های با پوشش ۰/۱ درصد CH، ۳۶ درصد محاسبه گردید. رهایش سریع در ۳۰ دقیقه ابتدایی آزمایش احتمالاً به دلیل بازجذب سطحی FPH جذب‌شده از سطح نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. (Shimanouchi, Kuboi, Yoshimoto و Umakoshi (۲۰۰۴) رهایش تدریجی ترکیبات هسته پس از گذشت ۱ ساعت از عمل هضم را به



شکل ۱- پروفایل رهایش پپتید در نانولیپوزوم‌های با پوشش کیتوزان (۰/۵، ۰/۱، ۰/۵ درصد) در محیط شبیه‌سازی‌شده معده





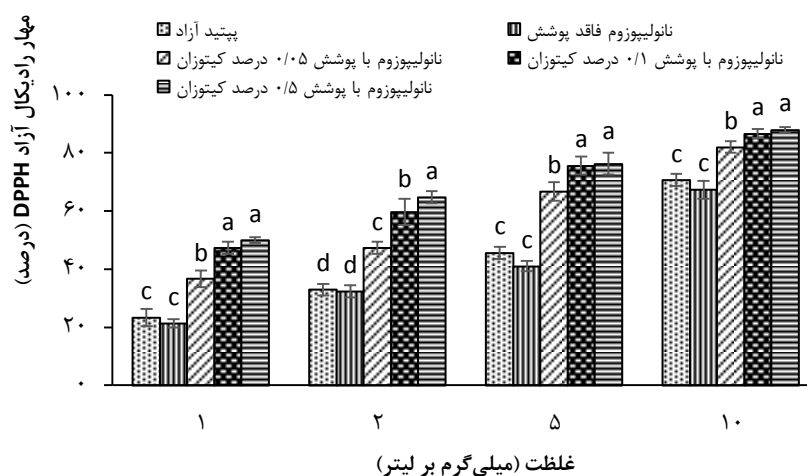
شکل ۲- پروفایل رهايش پپتيد در نانولیپوزوم‌های با پوشش کیتوزان (۰/۵، ۰/۱ و ۰/۵ درصد) در محیط شبیه‌سازی شده روده

پپتیدهای آزاد و نانولیپوزوم‌های حامل پپتید وجود نداشت ( $P \geq 0.05$ ). در واقع نتایج حاکی از این است که پپتید به‌وسیلهٔ مواد لیپیدی به‌طور کامل کپسوله شده است. بدون آنکه از فعالیت بیولوژیکی آن کاسته شود. مطالعه‌های پیشین بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات هیدرولیز شدهٔ ماهی مرتبط با بعضی از اسیدهای آمینه مانند تیروزین، متیونین، هیستیدین، لیزین، گلیسین و تریپتوفان می‌باشد (Nasri et al., 2013; Taheri et al., 2014; Wang et al., 2012). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت که می‌تواند به‌دلیل خصوصیات آنتی‌اکسیدانی کیتوزان موجود در پوشش نانولیپوزوم‌ها باشد (Li, 2014).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید

#### فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

نتایج تحقیق حاضر به‌وضوح نشان داد پروتئین هیدرولیز شدهٔ به‌دست‌آمده از امعاواحشای ماهی کپور معمولی، فعالیت ضد اکسیدانی مناسبی در برابر آزمون‌های حذف رادیکال آزاد از خود نشان داد (شکل ۳) که همسو با نتایج Hosseini و همکاران (۲۰۱۷) بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH به میزان قابل توجهی مرتبط با مقادیر بالای اسیدهای آمینهٔ هیدروفوب می‌باشد که حلالیت در لیپیدها را افزایش داده و بدین ترتیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند (Mosquera et al., 2014). با توجه به نتایج، اختلاف معنی‌داری بین توانایی مهار رادیکال آزاد در

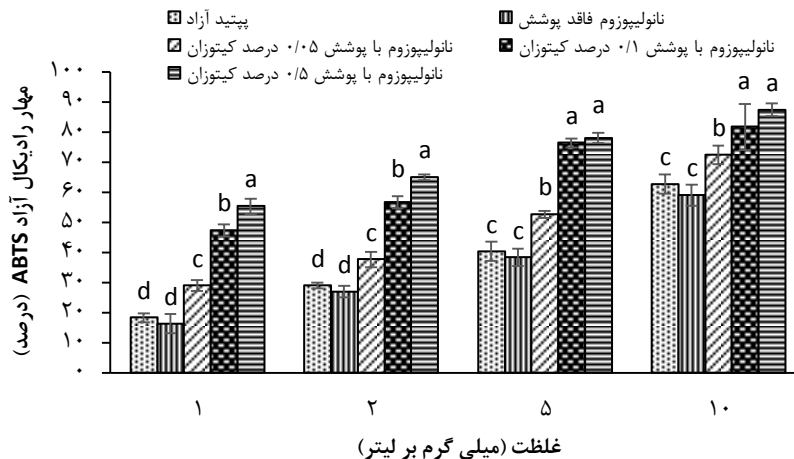


شکل ۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نانولیپوزوم‌های حاوی پپتید در غلظت‌های مختلف

### فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS

نتایج تحقیق اخیر حاکی از وجود رابطه‌ای قوی بین سطوح کیتوزان و اثرات مهار رادیکال آزاد بود (شکل ۴). به طوری که با افزایش غلظت کیتوزان مورد استفاده در پوشش نانولیپوزوم‌ها، فعالیت مهارکنندگی نیز روندی افزایشی داشت. اگرچه در تیمار پیتید آزاد و نانولیپوزوم

فاقد پوشش، اختلاف قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده نگردید و با نتایج Hosseini و همکاران (۲۰۱۷) همخوانی داشت. بنابراین نه تنها فرایند ریزپوشانی تأثیر منفی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی لیپوزوم‌های حاوی پیتید نداشت، بلکه به دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کیتوزان موجود در پوشش سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد گردید.



شکل ۴- فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS نانولیپوزوم‌های حامل پیتید در غلظت‌های مختلف

### نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد، پوشش کیتوزان به طور موفقیت‌آمیز با سطوح لیپوزوم تعاملات الکترواستاتیکی برقرار نموده و وجود اختلاف در سطوح پوشش مورد استفاده در ساختار نانولیپوزوم، تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر اندازه ذرات، پایداری و راندمان ریزپوشانی خواهد داشت. این نتایج نشان داد پروتئین هیدرولیزشده کپور معمولی، حاوی پپتیدهایی است که به عنوان مهارکننده رادیکال آزاد DPPH و اهداکننده هیدروژن عمل کرده و از این طریق رادیکال آزاد را به مولکول‌های پایدار تبدیل می‌کنند. ریزپوشانی پپتیدها در لیپوزوم سبب غلبه بر تخریب

پروتئولیتیک و واکنش با سایر عناصر موجود در غذا می‌گردد که در استفاده مستقیم نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست‌فعال در غذا حائز اهمیت می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در راستای بخشی از فرصت مطالعاتی در مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی انجام شده است. بدین‌وسیله از مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی برای کمک‌های مالی و معنوی و نیز از کمک‌های بی‌دریغ کارشناسان آزمایشگاه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### منابع

هادیان، ز.، سحری، م.، مقیمی، ح.، برزگر، م.، و عباسی، س. (۱۳۹۲). تهیه و ارزیابی ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی ایکوزاپنتانویک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، ۸(۱)، ۲۱۹-۲۳۰.

Agrawal, A. K., Harde, H., Thanki, K., & Jain, S. (2013). Improved stability and antidiabetic potential of insulin containing folic acid functionalized polymer stabilized multilayered liposomes following oral administration. *Biomacromolecules*, 15(1), 350-360. doi:<https://doi.org/10.1021/bm401580k>

- Bang, S., Hwang, I., Yu, Y., Kwon, H., Kim, D., & Park, H. J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, 28(7), 595-604. doi:<https://doi.org/10.3109/02652048.2011.557748>
- Cann, P., Read, N., Cammack, J., Childs, H., Holden, S., Kashman, R., . . . Swallow, K. (1983). Psychological stress and the passage of a standard meal through the stomach and small intestine in man. *Gut*, 24(3), 236-240.
- Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L., & Prentice, C. (2014). Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 2877-2893. doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0732-6>
- Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *BioMed Research International*, 2014, 11. [in Press]. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/608979>
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Channarong, S., Chaicumpa, W., Sinchaipanid, N., & Mitrevej, A. (2011). Development and evaluation of chitosan-coated liposomes for oral DNA vaccine: the improvement of Peyer's patch targeting using a polyplex-loaded liposomes. *Aaps Pharmscitech*, 12(1), 192-200. doi:<https://doi.org/10.1208/s12249-010-9559-9>
- Da Silva, I. M., Boelter, J. F., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2014). Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of nanoparticle research*, 16(7), 2479. [in Press]. doi:<https://doi.org/10.1007/s11051-014-2479-y>
- Danquah, M., & Agyei, D. (2012). Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA biotechnology*, 1(2), 1-7. doi:<https://doi.org/10.13172/2052-0069-1-2-294>
- Davis, S., Hardy, J., & Fara, J. (1986). Transit of pharmaceutical dosage forms through the small intestine. *Gut*, 27(8), 886-892. doi:<http://dx.doi.org/10.1136/gut.27.8.886>
- Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science & Technology*, 31(5), 419-426. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00351.x>
- Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M., Rätzke, K., Zaporojtchenko, V., & Schwarz, K. (2012). New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocolloids*, 27(2), 332-338. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.001>
- Galla, N. R., Pamidighantam, P. R., Akula, S., & 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.098>
- Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022>
- Grit, M., Underberg, W. J. M., & Crommelin, D. J. A. (1993). Hydrolysis of Saturated Soybean Phosphatidylcholine in Aqueous Liposome Dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(4), 362-366. doi:<https://doi.org/10.1002/jps.2600820405>
- Hadian, Z., Sahari, M., Moghimi, H., Barzegar, M., & Abbasi, S. (2013). Preparation and characterization of nanoliposomes containing docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids by extrusion and probe sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(1), 219-230 (in persian).
- Hosseini, S. F., Ramezanzade, L., & Nikkhab, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1455-1463. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.141>

- Kuboi, R., Shimanouchi, T., Yoshimoto, M., & Umakoshi, H. (2004). Detection of protein conformation under stress conditions using liposomes as sensor materials. *Sensors and Materials*, 16(5), 241-254 .
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M.-C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics*, 128, 8-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.06.016>
- Li, Z. (2014). *Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes*. (Master's thesis), Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia. Retrieved from <https://dalspace.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/54045/Li-Zhiyu-MSc-FOSC-Aug-2014.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., & Singh, H. (2013). Stability during in vitro digestion of lactoferrin-loaded liposomes prepared from milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2061-2070. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6072>
- Liu, Y., Liu, D., Zhu, L., Gan, Q., & Le, X. (2015). Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Research International*, 74, 97-105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.024>
- Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I. M., Boelter, J. F., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, 156, 144-150. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011>
- Mozafari, M., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.2576>
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4), 1354-1362. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089>
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., . . . Karra-Châabouni, M. (2013). ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1), 552-561. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.001>
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), 238-242. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>
- Page, D. T & ,Cudmore, S. (2001). Innovations in oral gene delivery: challenges and potentials. *Drug Discovery Today*, 6(2), 92-101. doi:[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(00\)01600-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(00)01600-7)
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Peron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., . . . Bourseau, P. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1819-1826. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.4020>
- Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., & Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, 135(4), 2761-2770. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.016>
- Razali, A., Amin, A., & Sarbon, N. (2015). Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*, 22(2), 651-660 .
- Rekha, M. R., & Sharma, C. P. (2011). Chapter 8 - Nanoparticle Mediated Oral Delivery of Peptides and Proteins: Challenges and Perspectives. In C. Van Der Walle (Ed.), *Peptide and Protein Delivery* (pp. 165-194). Boston :Academic Press.

- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Hernandez-Escalante, V. M. (2011). Bioavailability of Bioactive Peptides. *Food Reviews International*, 27(3), 213-226. doi:<https://doi.org/10.1080/87559129.2011.563395>
- Taheri, A., Sabeena Farvin, K. H., Jacobsen, C., & Baron, C. P. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chemistry*, 142, 318-326. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.113>
- Vignesh, R., Haq, M. B., Devanathan, K., & Srinivasan, M. (2011). Pharmacological potential of Fish extracts. *Archives of Applied Sciences Research*, 3(5), 52-58 .
- Wang, B., Li, Z.-R., Chi, C.-F., Zhang, Q.-H., & Luo, H.-Y. (2012). Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. *Peptides*, 36(2), 240-250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.05.013>
- Wu, J., Zhao, L., Xu, X., Bertrand, N., Choi, W. I., Yameen, B., . . . MacLean, J. L. (2015). Hydrophobic cysteine poly (disulfide)-based redox-hypersensitive nanoparticle platform for cancer theranostics. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(32), 9218-9223. doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201503863>
- Zhang, Y., Duan, X & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>

## The Production and Evaluation of Nanoliposomes Containing Bioactive Peptides Derived from Fish Wastes Using the Alkalase Enzyme

Shirin Hasani<sup>1</sup>, Mostafa Shahidi Noghabi<sup>2\*</sup>, Seyed Mehdi Ojagh<sup>3</sup>

- 1- Ph.D. Student of Sea Food Processing, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
- \* Corresponding author (m.shahidi@rifst.ac.ir)
- 3- Associate Professor, Department of Sea Food Processing, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

### Abstract

In recent years, several studies have focused on the production of bioactive peptides from fish waste due to its beneficial effects on human health. Bioactive peptides with low molecular weight require protective methods to increase gastrointestinal stability and active absorption, controlled release and optimized efficacy during oral delivery. The aim of this study was to develop an oral phospholipid nanoliposomal system incorporated with bioactive peptides derived from fish protein hydrolysate (FPH) of common carp (*Cyprinus carpio*) in chitosan coating (0.05, 0.1, 0.5% w/v) by the alkalase enzyme. The results showed that chitosan coating greatly improved the stability of nanoliposomes. The average particle size was in the range of 339-459 nm with a zeta potential of -51.7 to +50 and a poly dispersity index (PDI) of 388- 0.487 in nanoliposomes. The Encapsulation Efficiency (EE%) values were significantly influenced by changes in the concentration of chitosan and the maximum EE% (86± 2.65) was observed in the nanoliposome coated with 0.5% chitosan. Studying the releasing rate of the peptide in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) showed the effect of coating on the stability of peptides in simulated biological environments. Also, the evaluation of antioxidant activity by DPPH and ABTS tests showed that there was a high activity of radical scavenging activity in nanoliposomes in chitosan-coated and non-coated samples. The results of this study showed that encapsulation of bioactive peptide in the liposomal system could be a useful approach for direct application of peptides with antioxidant potential in food products.

**Keywords:** Antioxidant Activity, Bioactive Peptide, Chitosan, Nanoliposome, Release