

بررسی ویژگی فیزیکی، شیمیایی و آنتی اکسیدانی نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا

یوسف صادقیان امین^۱، علیرضا صادقی‌ماهونک^۲، محمد قربانی^۲، مهران اعلمی^۲، حمید جوشقانی^۴

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@gau.ac.ir

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گلستان

تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۴

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: ریزپوشانی، فرآیند قرار دادن ترکیبات در کپسول‌های کوچک می‌باشد تا محتویات خود را در سرعت کنترل شده و تحت شرایط خاص رها سازند. اخیراً، تمایل به افزودن ترکیبات عملگرها به مواد غذایی رو به افزایش است. این ترکیبات به شرایط محیطی، فرآیند و یا شرایط گوارش حساس هستند. ریزپوشانی یک انتخاب مناسب جهت حفاظت از این ترکیبات در برابر شرایط مذکور می‌باشد. نانولیپوزوم‌ها به علت استفاده از ترکیبات و اجزای خوراکی در فرمولاسیون خود، یکی از رایج‌ترین سیستم‌های رسانش برای ریزپوشانی، حفاظت و رهایش ترکیبات زیست فعال هستند. هدف این تحقیق بررسی ویژگی نانو لیپوزوم‌های بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ویژگی نانو لیپوزوم‌های بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا (با و بدون پوشش دهی با کیتوزان) از نظر اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی، پتانسیل زتا و فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و مهار ABTS) و بازده ریز پوشانی پس از نگهداری در دمای یخچال مورد بررسی قرار گرفت. عملیات هیدرولیز توسط آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که اندازه ذرات در نمونه کنترل با حدود ۲۲ نانومتر به ۴۰ نانومتر در نمونه بدون پوشش کیتوزان و ۷۰ نانومتر در نمونه با پوشش کیتوزان افزایش یافت. همچنین شاخص بس پاشیدگی در نمونه شماره دو (نمونه حاوی پوشش کیتوزان) نسبت به نمونه کنترل بهبود یافته و از توزیع یکنواختی برخوردار شد. پتانسیل زتا از ۹MV- در نمونه کنترل به ۴MV- و ۲۶MV- در نمونه بدون پوشش دهی با کیتوزان و نمونه حاوی پوشش کیتوزان تغییر نمود. بازده ریز پوشانی پس از شش هفته نگهداری در دمای یخچال برای نمونه شماره یک (نمونه بدون پوشش دهی با کیتوزان) ۴۰ درصد و برای نمونه شماره دو (نمونه حاوی پوشش کیتوزان) ۶۵ درصد بدست آمد.

نتیجه‌گیری: ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا و پوشش دهی آن با کیتوزان موجب بهبود ویژگی نانو لیپوزوم‌ها از نظر اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی، پتانسیل زتا و بدنبال آن بهبود پایداری ذرات با کاهش نرخ رهایش در دوره نگهداری و حفظ درصد بیشتری از ترکیبات در ساختار نانو لیپوزوم می‌شود.

واژگان کلیدی: نانو لیپوزوم، ریزپوشانی، پروتئین هیدرولیز شده، دانه کینوا

• مقدمه

های سلامتی بخشی متفاوتی (تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی بدن، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، کاهش کلسترول و فعالیت ضد فشار خون) دارند که تحت تأثیر ترکیب و توالی آمینواسیدی آنهاست (۳، ۴).

پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال هستند و به روش‌های هیدرولیز آنزیمی، تخمیر میکروبی و سنتز شیمیایی تولید می‌شوند (۱)، دارای ۲۰-۲ اسید آمینه هستند و وزن مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (۲). این پپتیدها ویژگی-

نسبتا خالص انجام و بهترین غلظت برای فسفاتیدیل کولین و پپتید برای دستیابی به بالاترین بازده ریزپوشانی به ترتیب ۳/۱ درصد و ۱ mg/ml بود. بازده ریزپوشانی و پتانسیل زتا برای نمونه‌ها حدود ۷۴/۶٪ و ۴۰/۸ mV - به دست آمد. اندازه لیپوزوم‌ها از ۶۶ تا ۲۱۴ نانومتر با میانگین قطر ۹۰ نانومتر و شاخص بس پاشیدگی ۰/۲۵ تعیین شد. فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای ریزپوشانی شده پس از ۸ روز نگهداری در دمای ۵۰ °C حفظ شد (۱۶). نتایج یک مطالعه نشان داد که بعد از ۵۰ روز نگهداری در دمای اتاق بیش از ۵۰ درصد اسید اسکوربیک در لیپوزوم‌ها باقی ماند، در حالی که ۵۰ درصد اسید اسکوربیک ریز پوشانی نشده در ۱۲ روز نگهداری از بین رفت (۱۷). یک بررسی نشان داد که نانو لیپوزوم پپتیدهای بادام زمینی سبب پایداری ذرات به عوامل محیطی شده و از تجمع و تشکیل لخته (توده) پپتیدی ممانعت به عمل می‌آورد (۱۸). پوشش دهی سطح لیپوزوم با کیتوزان می‌تواند پایداری آن را افزایش دهد (۲۲-۱۹). Zhou و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که با افزودن کیتوزان اندازه ذرات افزایش می‌یابد و بازده ریز پوشانی رابطه مستقیم با غلظت کیتوزان داشته و بهبود می‌یابد. نرخ رهايش در حضور کیتوزان افزایش یافته و میزان آن با افزایش غلظت کیتوزان افزایش می‌یابد (۲۳). همچنین در غلظت مناسب کیتوزان اندازه ذرات افزایش و پتانسیل زتا از مقدار منفی به مقدار مثبت افزایش می‌یابد (۲۴، ۲۱). Ramezanzade و همکاران (۲۰۱۷) اثر ریزپوشانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (Rainbow trout) را در ساختار لیپوزوم پوشش‌دهی شده با پلیمرهای زیستی بررسی کردند. در این تحقیق، میانگین اندازه ذرات نانوزیکول‌های لیپوزومی بارگیری شده با پپتیدهای آنتی‌اکسیدان بین ۲۳۴-۱۶۳ نانومتر متغیر بود. همچنین، شاخص بس پاشیدگی (PDI) نانوحامل‌های کم‌تر از ۰/۵ بود. علاوه بر این، پتانسیل زتا از ۳/۹ mV+ در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی نشده به ۴۵/۵ mV+ در نمونه‌های پوشش‌دهی شده تغییر کرد. طیف‌سنجی FTIR حاکی از واکنش‌های الکترواستاتیک و پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های سر فسفولیپیدی و گروه‌های آمین کیتوزان بود. بازده ریزپوشانی در نانولیپوزوم‌های حاوی پپتید آنتی‌اکسیدان (غلظت ۲ mg/ml) پوشش‌دهی شده با ۰/۴٪ (W/V) کیتوزان در بالاترین مقدار ۸۰/۲٪ نسبت به سایر تیمارها بدست آمد. لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده پایداری بیشتری به رهايش ترکیبات پپتیدی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی

طی یک دهه گذشته، با توجه به تحقیقات متعدد، تمايل به توسعه سیستم‌های رسانش کلئیدی بوجود آمده است. دلیل اصلی طراحی و توسعه سیستم‌های رسانش کلئیدی غلبه بر مشکلاتی است که در راه استفاده از ترکیبات زیست فعال مثل حلالیت کم، حساسیت به تخریب شیمیایی، داشتن طعم نامطلوب یا قابلیت دسترسی بیولوژیکی کم می‌باشد. انواع مختلفی از سیستم‌های رسانش کلئیدی تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است که از آن جمله میکرومولسیون‌ها، نانو امولسیون‌ها، نانو ذرات چربی جامد و لیپوزوم‌ها را می‌توان نام برد (۷-۵).

علاقه زیادی به استفاده از لیپوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های تحویل وجود دارد، زیرا آن‌ها می‌توانند از اجزای طبیعی مانند فسفولیپید ساخته شوند. با این حال، اغلب دستیابی به بارگذاری بالا و حفظ عوامل فعال در داخل لیپوزوم‌ها مشکل است و ساختار آن‌ها اغلب بسیار شکننده است. بنابراین ایجاد سیستم‌های تحویل که پایدار بوده و شرایط سخت تولید تجاری محصول را تحمل نماید مشکل می‌باشد (۹، ۸).

نانولیپوزوم به منظور بهبود پایداری، خواص عملکردی، جذب سلولی و رهايش کنترل شده ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). لیپوزوم‌ها می‌توانند هر دو اجزای هیدروفیلی و هیدروفوب را در یک گویچه منفرد حمل کنند و می‌توانند به راحتی از ترکیبات خوراکی تولید شوند (۱۱). این باعث می‌شود که لیپوزوم‌ها بتوانند هر دو نوع آمینو اسیدهای قطبی و غیر قطبی موجود در هیدرولیز شده‌های پروتئین را کپسوله نمایند. انواع مختلفی از ترکیبات زیست فعال آب-دوست شامل مولکول‌های کوچک و یون‌ها (مانند نمک‌ها، قندها و پپتیدها)، پلیمرهای زیستی (مانند پروتئین و پلی-ساکاریدها) و ذرات (مانند قطرات چربی، نانوذرات و پروبیوتیک‌ها)، می‌توانند در فاز آبی داخلی لیپوزوم‌ها گنجانده شوند. به‌طور مثال، انواع مولکول‌های زیست فعال آب‌گریز (مانند ویتامین A، D، E، کاروتنوئیدها و کوآنزیم کیو-۱۰) (Coenzyme Q10) و آب‌دوست (مانند ویتامین ث، آهن و کلسیم) در سیستم‌های رسانش برپایه لیپوزوم، ریزپوشانی شده‌اند (۱۳، ۱۲). ریزپوشانی آنزیم‌ها در لیپوزوم‌ها می‌تواند موجب کاهش از دست رفتن فعالیت آنزیم در شرایط شبیه-سازی شده معده شود (۱۴). همچنین، لیپوزوم‌ها می‌توانند موجب بهبود پایداری انواع ترکیبات فنولی ریزپوشانی شده شوند (۱۵).

در یک بررسی ریزپوشانی پپتیدهای حاصل از کلان‌زئ نوعی ماهی دریایی (bream scales) با استفاده از فسفاتیدیل کولین

واکنش در حمام آب 90°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس محلول تا دمای محیط خنک گردید و در دور 5000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا، به روش انجمادی خشک شد و تا زمان استفاده در دمای 4°C نگهداری گردید (۲۷).

تعیین درجه هیدرولیز: سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ min در دمای 4°C انکوبه شد. سپس، مخلوط در 10000 rpm و به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت با روش بردفورد (۱۹۷۶) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز بر حسب مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی TCA به پروتئین موجود در سوسپانسیون (پس از رقیق سازی با آب مقطر به حجم مساوی) و بر حسب درصد محاسبه شد.

بارگیری پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا در نانولیپوزومها: لیپوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک و بر اساس روش تشریح شده توسط Liu و همکاران (۲۸) با اندکی تغییرات تولید گردید. فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال لیستین سویا و کلسترول به نسبت ۹ به ۱ در 10 ml اتانول مطلق بود. فرآیند تبخیر و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته گرد با استفاده از اواپراتور چرخان با دور 60 rpm در دمای 60°C انجام گرفت. بالن مدور برای اطمینان از حذف کامل حلال، به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در دسیکاتور و در دمای محیط نگهداری شد. سپس فیلم لیپیدی خشک شده با بافر فسفات نمکی ($\text{pH } 7.4$) به مدت ۱ min با استفاده از ورتکس مجدداً هیدراته گردید. سپس 10 mg/ml پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا با درجه هیدرولیز $20/21$ درصد به محلول حاصل افزوده و با استفاده از روتاری در دمای 60°C به مدت ۲ min هم زده و به مدت ۲ min در دمای محیط هم زده و خنک شد. فرآیند هم زدن در ۳ مرتبه تکرار گردید. نهایتاً محلول حاصل برای ۱۰ مرحله و در هر مرحله به مدت ۱ min به صورت متناوب تحت پروب فراصوت (توان 70% و سیکل $0/5$) قرار گرفت. برای جلوگیری از افزایش دما، فرآیند فراصوت در شرایط نگهداری نانولیپوزوم در آب سرد انجام گرفت. در نهایت نانولیپوزوم تولید شده با غلظت لیپید (لیستین و کلسترول) 10 mg/ml تا زمان انجام آزمون ها در یخچال نگهداری شد.

پوشش دهی نانولیپوزومها با کیتوزان: برای تعیین مناسب ترین غلظت کیتوزان با آزمون و خطای اولیه غلظت های مختلف از کیتوزان ($0/1$ ، $0/2$ ، $0/4$ درصد w/v) مورد بررسی

شده با کیتوزان با حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی، از قابلیت بالایی برای غنی سازی و استفاده در تولید انواع محصولات غذایی و دارویی برخوردارند (۲۱). گزارش شده است که بارگیری هیدرولیز شده های پروتئین ژلاتین پوست ماهی به شکل نانو لیپوزوم با و بدون پوشش تأثیری بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS ندارد (۲۵) در یک مطالعه گزارش گردید که کورکومین لیپوزوم شده پایداری بیشتر و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بالاتری از کورکومین غیرلیپوزومی دارد (۲۶).

هدف از این مطالعه ارزیابی ویژگی های نانو لیپوزوم های حاوی هیدرولیز شده های پروتئین دانه کینوا، تأثیر پوشش دهی با کیتوزان بر این ویژگی ها و تعیین پایداری پس از نگهداری در دمای 4°C می باشد.

• مواد و روش ها

مواد مورد استفاده: اتانول، سود، اسید کلریدریک، پتاسیم کلراید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسید فسفریک (مرک، آلمان) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین، فسفولیپید (آلکیل - ال - آلفا - فسفاتیدیل کولین) به دست آمده از لستین گاوی به صورت پودر لیوفیلیزه با درجه خلوص بیشتر از 99% با نام تجاری Lipoid (سیگما، آلمان) تهیه شد. تری کلرواستیک اسید (TCA)، کوماسی بلو (G250)، DPPH، ABTS، پتاسیم پرسولفات، ترلوکس، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، تیوباربتوریک اسید (TBA)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شرکت سیگما خریداری شدند.

روش ها

هیدرولیز پروتئین استخراج شده از دانه کینوا: برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، پروتئین استخراج شده دانه کینوا را در غلظت ۵ درصد وزنی - حجمی در بافر فسفات $0/2\text{ M}$ ($\text{pH}=7/4$) حل نموده و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم زدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط مهیا شد. سپس آنزیم پانکراتین و آلکالاز به طور مجزا در نسبت آنزیم به سوسترا $2/5$ درصد وزنی - وزنی به سوسپانسیون پروتئین افزوده شد. دمای واکنش برای پانکراتین 40°C و برای آلکالاز 50°C و در مقدار pH های به ترتیب $7/4$ و 8 در مقدار بهینه فعالیت هر آنزیم ثابت نگه داشته شدند. زمان واکنش در شرایط هم زدن مداوم با دور 2000 rpm ، 250 دقیقه در نظر گرفته شد. برای غیرفعال کردن فعالیت آنزیم، محیط

اثر نگهداری در دمای یخچال بر پایداری و بازده ریزپوشانی ترکیبات بارگیری شده: برای تعیین اثر نگهداری در دمای یخچال (۴ °C)، از هر نمونه مقدار ۲ml به میکروتیوب منتقل؛ سپس به مدت ۶ هفته در شرایط فوق نگهداری شد. سپس مقدار تغییر در اندازه ذرات و بازده ریزپوشانی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۹).

فعالیت آنتی اکسیدانی: با هدف ارزیابی فعالیت آنتی-اکسیدانی نانولیپوزوم های بارگیری شده با هیدرولیز شده های کینوا در طول فرآیند تولید، ویژگی های آنتی اکسیدانی نانوحامل ها مورد بررسی قرار گرفت. قبل از انجام هر یک از آزمون های آنتی اکسیدانی، هر یک از نمونه های نانولیپوزومی به مدت ۵min جهت رهاش کامل ترکیبات درون پوشانی شده در حمام آب °C ۱۰۰ درجه قرار گرفت (۱۶).

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش Wu و همکاران (۳۰) با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا نمونه ها در آب مقطر (با غلظت ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر) حل شدند. سپس، ۱/۵ml از هر نمونه با ۱/۵ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه عمل ورتکس انجام شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰min سانتیفریوژ و به مدت ۲۰min در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول رویی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I (\%) = [A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}] \times 100$$

در اینجا A_{blank} جذب کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPH مخلوط می شود) A_{sample} جذب نمونه می باشند.

فعالیت مهار رادیکال ABTS: فعالیت مهار رادیکال ABTS نمونه ها با استفاده از روش تشریح شده توسط You و همکاران (۳۱) با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال $ABTS^+$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ و ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۶-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام گرفتند. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با استفاده از (۰/۲M, PHV/۴) PBS تا جذب $0.02 \pm$ در ۰/۷ نانومتر رقیق شد. سپس ۴۰ میکرو لیتر از هر نمونه (با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به ۴ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به شدت هم زده شد و به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب

قرار گرفت. در غلظت ۰/۱ و ۰/۴ کیتوزان ناپایداری سیستم و عدم یکنواختی ذرات و پتانسیل زتا ملاحظه گردید. نتایج مشابهی در تحقیق Liu و همکاران (۲۹) گزارش شده است. از این جهت در این تحقیق، نسبت ۰/۲ درصد کیتوزان که موجب تولید سیستم شفاف و پایدار شد برای انجام آزمون های بعدی انتخاب گردید. کیتوزان در غلظت % (w/v) ۰/۲ در محلول اسیداستیک ۱٪ گلاسیال به مدت ۲۴ ساعت حل و هم زده شد. سپس حجم یکسانی از این محلول کیتوزان به آرامی و به صورت قطره قطره به محلول نانولیپوزوم ضمن هم زدن افزوده شد. نمونه پس از پوشش دهی به یخچال منتقل شد. در پایان آماده سازی سه نمونه مختلف شامل نمونه نانو لیپوزوم فاقد پروتئین هیدرولیز شده، نمونه نانو لیپوزوم بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا و نمونه نانولیپوزوم بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا و حاوی پوشش کیتوزان بدست آمد.

تعیین اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا: برای این منظور، هر یک از نمونه ها نخست با استفاده از بافر فسفات نمکی (PBS) به نسبت ۱:۱۰ رقیق شدند. اندازه ذرات (به صورت Z-average) و شاخص بس پاشیدگی آن ها با طیف سنجی همبستگی فوتونی به وسیله دستگاه زتا سایزر (نانوسایزر ۳۰۰۰، شرکت Malvern، انگلستان در زاویه ۹۰° و دمای °C ۲۵ در داخل سل مخصوص دستگاه با عرض ۰/۰۱ متر اندازه گیری شد. همچنین بار الکتریکی نانولیپوزوم ها (به صورت پتانسیل زتا)، هدایت الکتریکی ویژه و جنبش الکتروفورزی با استفاده از همین دستگاه اندازه گیری شد.

بازده ریزپوشانی: بازده ریزپوشانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آزمیمی پروتئین کینوا با استفاده از روش Liu و همکاران (۲۹) با مقداری اصلاحات انجام گرفت. بدین شکل که برای تعیین مقدار پپتیدهای ریزپوشانی نشده در ساختار لیپوزوم (پروتئین های آزاد)، مقدار ۱ml از نانولیپوزوم تهیه شده با روش سانتیفریوژ با استفاده از فیلتر آمیکون (با وزن مولکولی عبوری ۱۰ کیلودالتون) منتقل و به مدت ۱۰min در دور ۳۵۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. محلول عبور کرده از فیلتر برای تعیین میزان پروتئین های بارگیری نشده یا آزاد به روش بردفورد (۱۹۷۶) مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بازده و کارایی درون پوشانی هیدرولیز شده ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید.

$$\times 100 = \frac{\text{مقدار پروتئین بارگیری نشده} - \text{مقدار پروتئین کل}}{\text{مقدار پروتئین کل}} = \text{کارایی درون پوشانی}$$

افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در ($p < 0.05$) انجام گردید.

• یافته‌ها

اندازه ذرات: با توجه به شکل ۱ و ۲ میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم خالی، بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوا با آنزیم آلکالاز و پانکراتین و همچنین نانوذرات پوشش-دهی شده با کیتوزان را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از افزایش اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها از حدود ۲۲ نانومتر به ترتیب به ۴۰ و ۵۰ نانومتر پس از بارگیری با هیدرولیز شده‌های آلکالاز و پانکراتین بودند.

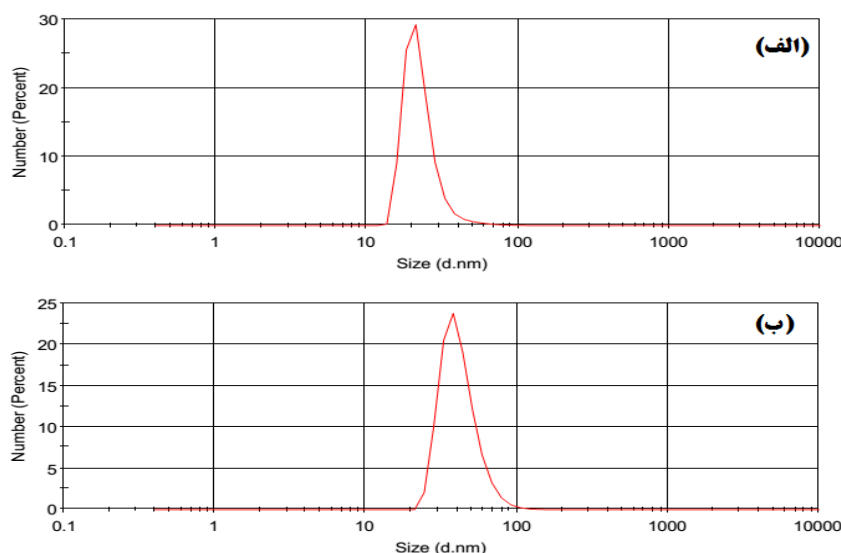
محلول نهایی در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با واکنش ۴۰ میکرو لیتر ترولوکس (میکرومولار ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰) با ۴ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ تهیه شد. درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ نمونه‌ها بر اساس معادله زیر محاسبه گردید. همچنین، فعالیت مهار رادیکال $ABTS^+$ بر اساس منحنی استاندارد ترولوکس، به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (میلی‌مولار TEAC، بیان گردید.

$$AA (\%) = [A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}] \times 100$$

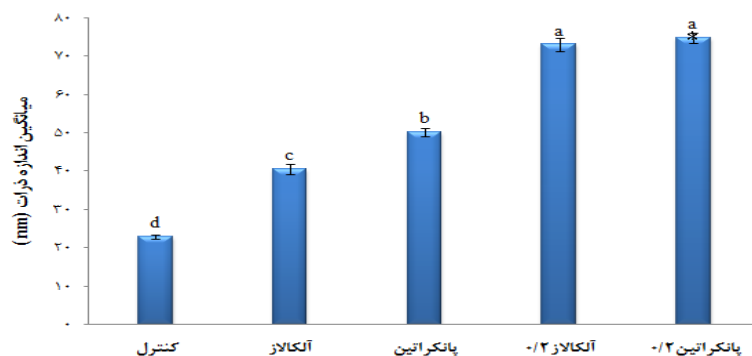
در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه کنترل فاقد ترکیب فعال) و

A_{sample} (جذب نمونه کارزین هیدرولیز شده) هستند.

تجزیه و تحلیل آماری: در این پژوهش، ویژگی نانو لیپوزوم بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا و نانولیپوزوم بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده کینوا حاوی پوشش کیتوزان با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و استفاده از نرم



شکل ۱. نمودار DLS تغییر در اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های کینوا (الف) قبل از پوشش‌دهی و (ب) پس از پوشش‌دهی با کیتوزان

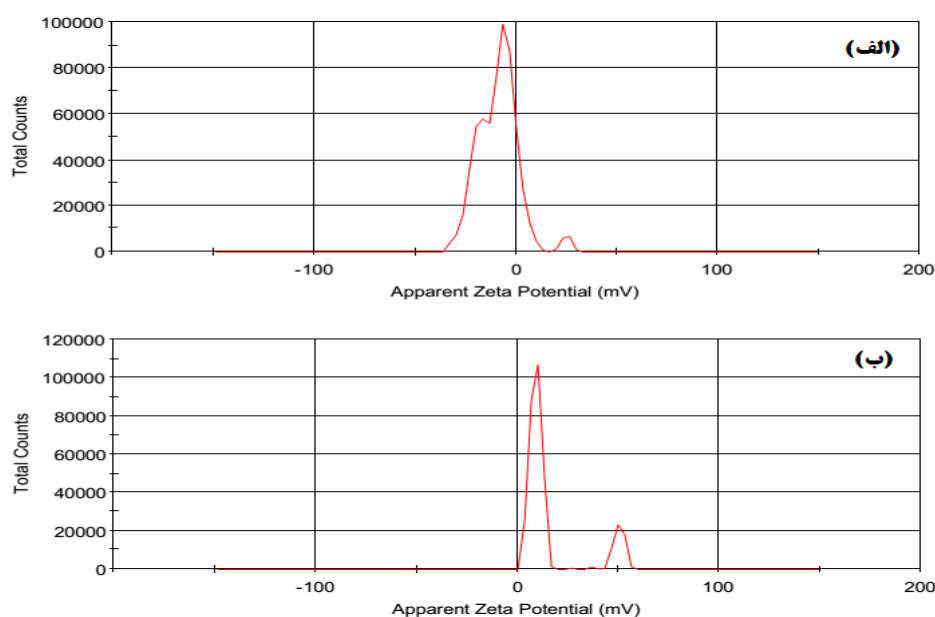


شکل ۲. میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان ۰/۲ درصد و بدون پوشش بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده‌های کینوا

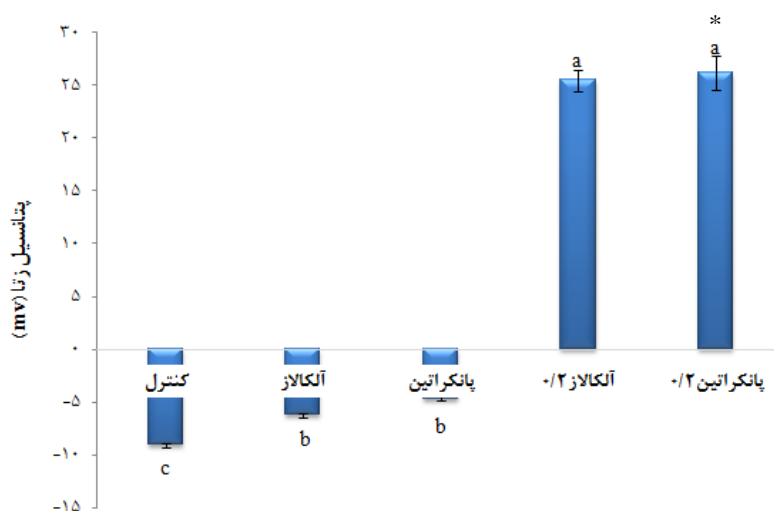
*میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشند.

بارگیری پروتئین هیدرولیز شده کینوآ دارای مقادیر منفی بود. مقدار این شاخص در نانولیپوزوم‌های خالی پس از بارگیری با هیدرولیز شده‌های پانکراتین و آلکالاز از -9 mV به حدود -4 mV به سمت مقادیر مثبت تغییر یافت. همچنین در این تحقیق، مقدار پتانسیل زتای نانوذرات پس از پوشش‌دهی با کیتوزان به سمت مقادیر مثبت تغییر پیدا کرد. به طوری که پتانسیل زتای نانوذرات بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های هر دو آنزیم پس از پوشش‌دهی با کیتوزان از -4 mV به 26 mV افزایش یافت.

شاخص بس‌پاشیدگی: مقدار این شاخص در نانوذرات بین $0/25-0/42$ متغیر بود و پس از پوشش‌دهی نانوذرات به مقدار اندکی بر این شاخص افزوده شد. مقادیر بس‌پاشیدگی نانوذرات در این مطالعه حاکی از تولید سیستم یکنواخت و توزیع اندازه ذرات همگن بود. ارزیابی پتانسیل زتا: نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده اثر بارگیری پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوآ و همچنین پوشش‌دهی نانوذرات با استفاده از کیتوزان بر پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها بود. مقدار پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون



شکل ۳. نمودار DLS تغییر در پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده‌ای دانه کینوآ (الف) قبل از پوشش‌دهی و (ب) پس از پوشش‌دهی با کیتوزان



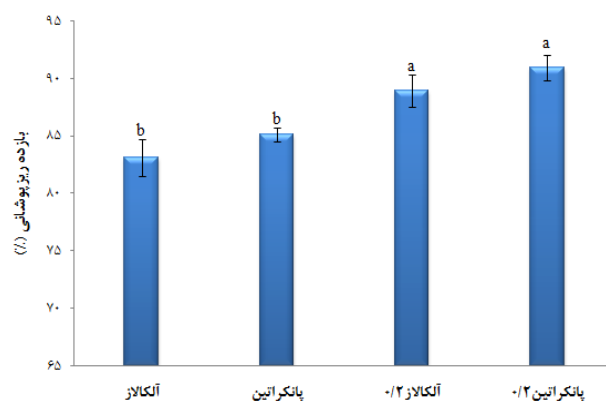
شکل ۴. پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان $0/2$ درصد و بدون پوشش بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های کینوآ *میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشند.

بیش از ۵۰٪ ترکیبات بارگیری شده (بازده اولیه ریزپوشانی) پس از ۶ هفته نگهداری از ساختار نانولیپوزومها خارج شدند. در حالی که پوشش‌دهی نانوذرات به شکل قابل ملاحظه‌ای موجب کاهش نرخ رهایش ترکیبات بارگیری شده و حفظ درصد بیشتری از ترکیبات در ساختار نانولیپوزومها گردید. به‌طور مثال، پوشش‌دهی نانولیپوزومهای بارگیری شده با پیتیدهای حاصل از آلکالاز موجب حفظ حدود ۶۵٪ از بازده اولیه ریزپوشانی پس از نگهداری شد. درحالی‌که این مقدار برای ذرات فاقد پوشش به حدود ۴۰٪ رسید.

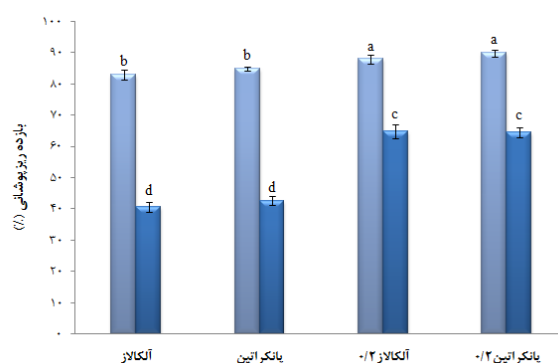
اثر نگهداری در دمای یخچال بر اندازه ذرات نانولیپوزومها: نتایج تحقیق حاضر نشان از تغییر قابل ملاحظه در مقدار این شاخص پس از ۶ هفته نگهداری بود. در بین نمونه‌های تولید شده، کم‌ترین تغییر در اندازه ذرات و بیشترین پایداری مربوط به نمونه نانولیپوزوم بارگیری نشده با ماده فعال بود. این نتایج نشان دهنده اثر ماده فعال و واکنش تخریبی آن در سیستم است که منجر به ناپایداری ساختار لیپوزومی و تغییرات گسترده در اندازه ذرات می‌شود. میانگین اندازه ذرات در نانولیپوزومهای فاقد پوشش بارگیری شده پس از ۶ هفته نگهداری به حدود ۴ تا ۵ برابر اندازه اولیه افزایش یافت. اما پوشش‌دهی نانوذرات به شکل قابل توجهی موجب بهبود پایداری سیستم در طول زمان نگهداری شد. به‌طور مثال، میانگین اندازه ذرات نانولیپوزومهای بارگیری شده با هیدرولیزشده پانکراتین و پوشش‌دهی شده با کیتوزان از ۷۴ نانومتر به ۱۰۲ نانومتر پس از ۶ هفته تغییر کرد. این در حالی بود که اندازه ذرات در نانولیپوزومهای فاقد پوشش بارگیری شده با هیدرولیزشده پانکراتین از ۵۰ نانومتر به حدود ۲۱۱ نانومتر پس از نگهداری افزایش یافت.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: در این تحقیق اثر ریزپوشانی و فرآیند پوشش‌دهی با کیتوزان بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS پروتئین‌های هیدرولیز شده کینوآ بررسی شد. مطابق با شکل ۸ در فعالیت مهار رادیکال DPPH تنها تفاوت معنادار بین نمونه‌های فاقد پوشش و دارای پوشش در پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز مشاهده گردید. بین نمونه‌های فاقد پوشش بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز یا پانکراتین، بین نمونه‌های با پوشش بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز یا پانکراتین، و بین نمونه‌های فاقد پوشش و با پوشش بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده پانکراتین تفاوت معناداری مشاهده نشد.

بازده ریزپوشانی: در این تحقیق، اثر نوع پیتیدهای بارگیری شده درون نانولیپوزومها و پوشش‌دهی نانوذرات بر بازده ریزپوشانی ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که مقدار این شاخص بین ۹۰-۸۳٪ متغیر بود. بدین شکل که تفاوتی در بازده ریزپوشانی بین نوع هیدرولیزشده‌ها وجود نداشت اما پوشش‌دهی نانوذرات با کیتوزان با ممانعت از خروج ترکیبات از غشای لیپوزومی در مراحل اولیه نگهداری منجر به افزایش این مقدار شد.

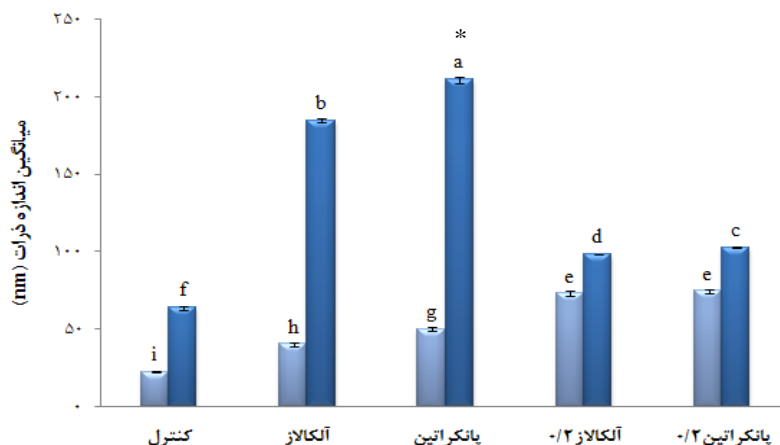


شکل ۵. بازده ریزپوشانی نانولیپوزومهای پوشش‌دهی با کیتوزان ۰/۲ درصد و فاقد پوشش بارگیری شده با هیدرولیزشده‌های کینوآ *میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ می‌باشند.



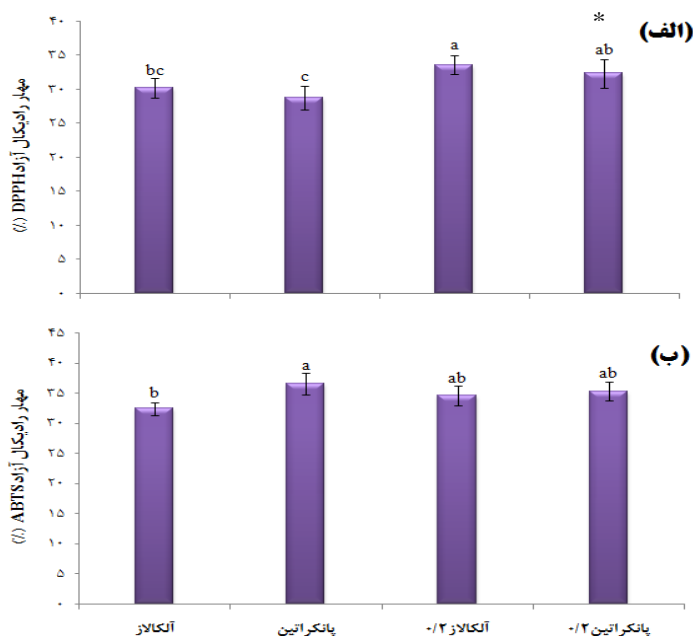
شکل ۶. تغییر بازده ریزپوشانی نانولیپوزومهای پوشش‌دهی با کیتوزان ۰/۲ درصد و فاقد پوشش بارگیری شده با هیدرولیزشده‌های کینوآ پس از ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال *میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ می‌باشند.

اثر نگهداری در دمای یخچال بر حفظ بازده ریزپوشانی ترکیبات بارگیری شده: در این تحقیق، اثر نگهداری نانولیپوزومها بر رهایش ترکیبات بارگیری شده پس از ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال بررسی شد. همچنین، تأثیر فرآیند پوشش‌دهی نانوذرات با کیتوزان بر تغییر در رهایش ترکیبات و بازده ریزپوشانی ارزیابی گردید. نتایج حاکی از این بودند که



شکل ۷. تغییر اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی با کیتوزان ۰/۲ درصد و فاقد پوشش بارگیری شده با هیدرولیزشده‌های کینوآ پس از ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال

* میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشند.



شکل ۸. ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (الف) و مهار رادیکال آزاد ABTS (ب)

در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی با کیتوزان ۰/۲ درصد و فاقد پوشش بارگیری شده با هیدرولیزشده‌های مختلف * میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ می‌باشند.

• بحث

از حدود ۴۰ نانومتر به ۷۳ نانومتر پس از پوشش‌دهی افزایش یافت. این یافته به علت ایجاد لایه‌ای از کیتوزان بر غشای خارجی لیپوزوم‌ها و افزایش ضخامت و اندازه‌ها آنها است. شاخص بس پاشیدگی به‌عنوان شاخص دیگری از یکنواختی سیستم کلوئیدی شناخته می‌شود. مقادیر بالای این شاخص نشان‌دهنده توزیع اندازه ذرات گسترده و حاکی از وجود ذرات و توده‌های درشت و غیریکنواخت در سیستم است (۳۳). ریزپوشانی پپتیدهای حاصل از کلاژن نوعی ماهی

تفاوت در اندازه نانولیپوزوم‌های بارگیری شده را می‌توان به اثر احتمالی درجه هیدرولیز پپتیدها و تولید پپتیدهای با وزن مولکولی و اندازه کمتر در نمونه‌های حاصل از فعالیت آلکالاز نسبت به پانکراتین نسبت داد. از سوی دیگر، پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان نیز موجب افزایش اندازه ذرات شد. Henriksen و همکاران (۳۲) علت این امر را پیوست موفقیت آمیز کیتوزان به سطح لیپوزوم دانستند. به‌طورمثال، اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با هیدرولیزشده‌های آلکالاز

دهی نانوذرات با کیتوزان با ممانعت از خروج ترکیبات از غشای لیپوزومی در مراحل اولیه نگهداری منجر به افزایش این مقدار شد. Liu و همکاران (۲۰۱۵) سیستم‌های رسانش خوراکی بر پایه لیپوزوم پوشش‌دهی شده با کیتوزان (در غلظت‌های w/v ۰ تا ۰/۶٪) با استفاده از فسفولیپیدهای غشای گلوبول چربی شیر (در غلظت‌های w/v ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۱۰٪) برای ریزپوشانی پتیدی‌های با خاصیت ضد دیابت حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین ماهی سالمون (در غلظت ثابت ۱۰ mg/ml) طراحی کردند. حداکثر بازده ریزپوشانی (۷۱/۳٪) و بالاترین پایداری فیزیکی در نمونه‌های حاصل از ۰/۱۰٪ فسفولیپید غشای گلوبول چربی شیر و ۰/۴٪ کیتوزان حاصل شد. Zavareze و همکاران (۳۴) ریزپوشانی پتیدی‌های آنتی‌اکسیدان حاصل از هیدرولیز عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر سفید را انجام دادند. در تحقیق انجام شده توسط آن‌ها بازده ریزپوشانی حدود ۸۰٪ به دست آمد. همچنین، مشابه نتایج این تحقیق، بازده ریزپوشانی در نانولیپوزوم‌های حاوی پتید آنتی-اکسیدان حاصل از هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (غلظت ۲ mg/ml) پوشش‌دهی شده با (W/V) ۰/۴ کیتوزان در بالاترین مقدار (۰/۸۰٪) نسبت به تیمارهای فاقد پوشش بدست آمد (۲۵).

حفظ بازده ریزپوشانی، پایداری بیشتر و رهایش کمتر نانولیپوزوم‌ها در دمای پایین را می‌توان به نفوذپذیری کم‌تر غشا در دمای پائین، کاهش توده‌ای شدن در نتیجه تحرک مولکولی کمتر (Low molecular mobility) و تاخیر در فرآیند اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها نسبت داد (۳۵). در تحقیق دیگری، اثر نگهداری طولانی‌مدت بر رهایش و بازده ریزپوشانی پروتئین‌های زیست فعال هیدرولیز شده سالمون در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان بررسی شد. در طول نگهداری لیپوزوم‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۴°C، مقدار از دست رفتن هیدرولیز شده پس از ۴ هفته نگهداری به حدود ۸۷٪ رسید. پوشش‌دهی لیپوزوم با کیتوزان منجر به کاهش و دست رفتن ماده فعال به حدود ۱۱٪ در طول نگهداری شد (۲۹).

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات (یکنواخت یا غیریکنواخت) سیستم‌های کلئیدی اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات آن‌ها دارند. ثابت ماندن این دو پارامتر در طول یک دوره زمانی طولانی نشان‌دهنده پایداری آن سیستم است (۳۶). افزایش اندازه ذرات و تشکیل توده‌های بزرگ در نانولیپوزوم‌ها را می‌توان به خنثی شدن بار سطحی، توده‌ای شدن و تشکیل پل بین ذرات مجاور نسبت داد. فرآیند

دریایی (Bream scales) با استفاده از نانوحامل‌های لیپوزومی (با استفاده از فسفاتیدیل کولین نسبتاً خالص) انجام گرفت. اندازه ذرات لیپوزوم‌ها از ۶۶ تا ۲۱۴ نانومتر با میانگین قطر ۹۰ نانومتر و شاخص بس‌پاشیدگی ۰/۲۵ (که نشان‌دهنده شاخص بس‌پاشیدگی پائین در لیپوزوم است) تعیین شد (۱۶). Zavareze و همکاران (۳۴) هیدرولیز و تولید پتیدی‌های آنتی-اکسیدان حاصل از عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر سفید را با آنزیم فلوورزایم انجام دادند. پتیدی‌های آنتی-اکسیدان حاصل در فسفاتیدیل کولین به‌عنوان ماده دیواره کپسول در ساختار لیپوزوم، ریزپوشانی شدند. اندازه ذرات در نمونه شاهد (فاقد هیدرولیز شده) و نمونه حاوی هیدرولیز شده عضله و محصولات جانبی آن به ترتیب ۲۰۸، ۲۶۶ و ۲۶۳ نانومتر به دست آمد که نشان‌دهنده افزایش اندازه ذرات در نتیجه بارگیری ماده فعال در ساختار لیپوزوم است. همچنین، شاخص بس‌پاشیدگی برای این نانوحامل‌ها به ترتیب محدود ۰/۲۲۸، ۰/۲۹۸ و ۰/۱۹۷ حاصل شد.

پتانسیل زتا تعیین کننده خصوصیات الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها است که نمایانگر بار کلی ذره در یک محیط مایع و شاخص مفیدی از بار سطحی ذرات و نیروهای دافعه کلئیدی میان آن‌ها و پایداری فیزیکی سیستم‌های نانوحامل است. علت تغییر مقادیر پتانسیل زتا را می‌توان به قرار گرفتن بخشی از هیدرولیز شده‌ها در سطح وزیکول‌ها نسبت داد. این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب فسفولیپیدی و واکنش بین فسفولیپید و پتیدی‌های به‌دام افتاده، تعیین کننده بار سطحی لیپوزوم‌هاست. اگرچه پتانسیل زتا تحت تأثیر دیگر عوامل مانند ترکیب ذرات، محیط پراکنش، pH و قدرت یونی در محلول قرار گیرد (۳۴). همچنین کیتوزان به عنوان یک پلی ساکارید کاتیونی می‌تواند پتانسیل زتا را در جهت مثبت تغییر دهد. افزایش مقدار پتانسیل زتای ذرات پس از پوشش‌دهی از طریق افزایش دافعه بین ذرات منجر به کاهش ناپایداری فیزیکی و همچنین از طریق ایجاد یک لایه و پوشش در اطراف ذرات منجر به کاهش نرخ رهایش و از دست رفتن ترکیبات بارگیری می‌شود (۳۴، ۲۵). در تحقیقات دیگری، مقدار پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی پتیدی‌های حاصل از کلژن ماهی (۴۰/۸ mV-) و پتیدی‌های زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از ۳/۹+ در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی نشده به ۴۵/۵+ mV در نمونه‌های پوشش‌دهی شده را گزارش شده است (۲۵، ۱۶).

بر اساس نتایج حاصله (شکل ۵) تفاوتی در بازده ریزپوشانی بین نوع هیدرولیز شده‌ها وجود نداشت اما پوشش-

بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های آلکالاز و پانکراتین تفاوت معنادار مشاهده شد و در سایر موارد تفاوت معناداری مشاهده نگردید. تفاوت مقدار این شاخص بین نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در فعالیت اولیه هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین نسبت داد. مشابه با یافته‌های این تحقیق، Ramezanzade و همکاران (۲۵) گزارش نمودند که تفاوتی بین درصد بازدارندگی هیدرولیز شده آزاد با نمونه‌های بارگیری شده در ساختار نانولیپوزوم‌ها وجود نداشت.

اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا حاکی از اثر پوشش‌دهی نانولیپوزوم با کیتوزان بر بهبود پایداری نانولیپوزوم‌های تولیدی بود. همچنین، ارزیابی پایداری نانولیپوزوم‌ها و بازده ریزپوشانی در طول ۶ هفته نگهداری در دمای یخچال حاکی از اثر پوشش‌دهی ذرات بر افزایش پایداری فیزیکی (کاهش تغییر در اندازه ذرات) و کاهش سرعت رهایش ترکیبات بارگیری شده (حفظ بازده ریزپوشانی اولیه) در طول نگهداری بود.

چسبیدن ذرات به یکدیگر در نتیجه واکنش جاذب بین ذراتی با سطوح با بار نسبتا منفی و مثبت رخ می‌دهد (۳۷). در دمای محیط لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، آگومریزه می‌شوند و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه ذرات و توزیع ناهمگونی ذرات را در پی خواهد داشت. Lee و Ko (۳۸)، بر روی پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی رتینول تحت شرایط تاریکی، نور فرابنفش و در دماهای 50°C ، 37°C ، 25°C و 4°C تحقیقاتی انجام دادند. نتایج نشان داد که نانولیپوزوم‌ها در دماهای بالاتر سریع‌تر تجزیه شدند و بیشترین حفاظت نانولیپوزوم حاوی رتینول در دمای 4°C و تحت شرایط تاریکی به دست آمد.

تفاوت معنی‌دار مشاهده شده در فعالیت آنتی‌اکسیدانی موید اثر مثبت پوشش‌دهی نانوذرات با کیتوزان بر حفظ مقدار بیشتری از ترکیبات بارگیری شده درون ساختار وزیکولی نسبت به انواع بدون پوشش تا زمان انجام آزمایش است. تفاوت مقدار این شاخص بین نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با هیدرولیز شده‌های مختلف را می‌توان به تفاوت در فعالیت اولیه هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین نسبت داد. در فعالیت مهار رادیکال ABTS بین نمونه‌های فاقد پوشش

• References

- Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 2010; 31(10):1949-56.
- Park PJ, Jung WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *J Amer Oil Chem Soc* 2001; 78(6):651-6.
- Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* 2004;52(21):6646-52.
- Jia J, Ma H, Zhao W, Wang Z, Tian W, Luo L, He R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chem* 2010; 119(1):336-42.
- Aditya NP, Espinosa YG, Norton IT. Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: food application; *Biotechnol Adv* 2017; 35:450-57.
- Oh JK, Drumright R, Siegwart DJ, Matyjaszewski K. The development of icrogels/nanogels for drug delivery; applications. *Prog Polym Sci* 2008; 33:448-77.
- Fathi M, Martín A, McClements D.J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Tren Food Sci. & Tech* 2014; 39: 18-39.
- Weilin Liu, Ai-qian Ye, Chengmei Liu, Wei Liu, Harjinder Singh. Structure and integrity of liposomes prepared from milk or soybean derived. *Food Res Inter* 2012; 48 499-506.
- Filipović G, Skalko-Basnet, and Jalsenjok. Developed chitosan-coated liposomes, which exhibited a greater ability to protect against degradation by digestive enzymes in vitro; *J Microencap.* 2001;18(1):3-12.
- Borel T, Sabliov C.M. Nano delivery of Bioactive Components for Food Applications: Types of Delivery Systems, Properties, and Their Effect on ADME Profiles and Toxicity of Nanoparticles. *Annul. Rev. Food Sci. Technol* 2014; 5:197-213.
- Mufamadi M.S, Pillay V, Choonara Y.E., Du Toit L.C. A review on Composite liposomal technologies for specialized drug delivery; *J Drug Deliv Volume* 2011; Article ID 939851, 19 pages.
- Xia S, Xu S, Zhang X. Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes. *J Agric Food Chem.* 2006; 54: 6358-6366.
- Tan C, Xia S, Xue J, Xie J, Feng B, Zhang X. Liposomes as vehicles for lutein: preparation, stability, liposomal membrane dynamics, and structure. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 8175-8184.
- Hsieh Y F, Chen T L, Wang Y T, Chang J H, Chang H M. Properties of liposomes prepared with various lipids. *J Food Sci* 2002; 67: 2808-2813.
- Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols—a review. *Tren Food Sci. & Tech* 2010; 21: 510-523.
- 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 Chem* 2014; 156: 144-150.
17. Kirby C J. 1991. Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients. *Food Sci Technol Today* 1991; 5: 74-78.
 18. Kui-Jie Gong, †a, b Ai-Min Shi, †a Hong-Zhi Liu, a Li Liu, a Hui Hu, a Ying Yang, a. Preparation of nanoliposome loaded with peanut peptide fraction: stability and bioavailability. *Food Funct* 2016,7, 2034-2042.
 19. Karewicz A, Bielska D, Loboda A, Gzyl-Malcher B, Bednar J, Jozkowicz A, et al. Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. *Coll & Surf B: Bio Interf* 2016; 109 Supplement C: 307-316.
 20. Liu W, Liu J, Liu W, Li T, Liu C. Improved physical and in vitro digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self-assembly alginate-chitosan-coated nanoliposomes. *J Agric Food Chem* 2013; 61(17), 4133-4144.
 21. Li Z, Paulson AT, Gill TA. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *J Funct Foods* 2015; 19: 733-743.
 22. Liu W, Liu W, Ye A, Peng S, Wei F, Liu C, et al. Environmental stress stability of microencapsules based on liposomes decorated with chitosan and sodium alginate. *Food Chem* 2016; 196, 396-404.
 23. Zhou F, Xu T, Zhao Y, Song H, Zhang L, Wu X, Lu B. Chitosan-coated liposomes as delivery systems for improving the stability and oral bioavailability of acteoside. *Food Hydrocoll* 2018; 83, 17-24.
 24. Guo J, Ping Q, Jiang G, Huang L, Tong Y. Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. *Internat J Pharma* 2003; 260, 167-173.
 25. Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chem* 2017; 234: 220-229.
 26. Chen X, Zou L, Niu J, et al . The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant activity of Curcumin Nanoliposomes. *Molecules* 2015; 20,14293-14311
 27. Chen L, Chen J, Ren J, Zhao M. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll* 2011; 25(5):887-97.
 28. Liu W L, Ye A, Liu CM, Liu W, Singh H. Structure and integrity of liposomes prepared from milk or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Res Internat* 2012; 48(2), 499-506.
 29. Liu W, Ye A, Liu W, Liu C, Han J, Singh H, Behavior of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chem* 2015; 175: 16-24.
 30. Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberaustriasicus*). *Food Res Internat* 2003; 36: 949-957.
 31. You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates; *Innov Food Sci Emer Technol* 2009;10: 235-240.
 32. Henriksen I, Srnstad G, Karlsen K. Interactions between liposomes and chitosan; *Internat J Pharma* 1994; 101(3), 227-236.
 33. Romero-Pérez A, García-García E, Zavaleta-Mancera A, Ramírez-Bribiesca JE, Revilla-Vázquez A, Hernández-Calva, L M, et al. Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Vet Res Commun* 2010; 34: 71-79.
 34. da Rosa Zavareze E, Telles AC, El Halal SLM, da Rocha M, Colussi R, de Assis LM, et al. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Sci Technol* 2014; 59: 841-848.
 35. Gibis M, Zeeb B, Weiss J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocoll* 2014; 38: 28-39.
 36. Niu M, Lu Y, Hovgaard L, Wu W. Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, in vitro characterization, and improved protection against enzymatic degradation. *Intern J Nanomed* 2011; 6: 1155.
 37. Mun S, Decker EA, McClements D J. Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers; *Langmuir. ACS J Sur Collo* 2005; 21: 6228-6234.
 38. Ko S, Lee S. C. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *Afri J Biotech* 2010; 9(37), 6158-6161.

Investigation of the Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Nanoliposomes Loaded with Quinoa Seed Hydrolyzed Proteins

Sadeghian Amin ^{Y1}, Sadeghi Mahoonak AR^{2*}, Ghorbani M³, Alami M³, Joshaghani H⁴

1- Ph.D. Student, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2- *Corresponding author: Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: Sadeghiaz@gau.ac.ir

3- Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Associate Professor, School of Para medicine Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran.

Received 7 May, 2019

Accepted 26 Aug, 2019

Background and Objectives: Encapsulation is a process; by which, a susceptible compound is surrounded with a membrane or matrix that is able to release its contents at a controlled speed under certain conditions. In recent years, popularity of adding bioactive compounds to food products has increased. These compounds are usually sensitive to environmental, processing and/or gastrointestinal conditions. Therefore, encapsulation is an appropriate option to protect these compounds against harsh conditions. Nanoliposomes are made from edible compounds and therefore are common for encapsulation, protection and controlled release of bioactive compounds in foods. The objective of this study was to investigate properties of nanoliposomes loaded with quinoa seed protein hydrolysates.

Materials & Methods: In this study, nanoliposomes loaded with quinoa seed protein hydrolysates (without and with chitosan coating) were assessed for their particle size, zeta potential and antioxidant activity using DPPH radical scavenging and ABTS radical inhibition activity. Furthermore, effects of six weeks of storage in refrigerator conditions were assessed on the stability and properties of nanoliposomes. Hydrolysis was carried out using alcalase and pancreatin enzymes.

Results: Results showed that particle size increased from nearly 22 nm in control sample to 40 and 70 nm in samples with and without chitosan coating, respectively. Moreover, disintegration index in the sample with chitosan coating (No. 2) was improved, compared to control sample with further uniform distributions. Zeta potential changed from -9 MV in control sample to -4 and 26 MV in samples without and with chitosan coating, respectively. Microencapsulation efficiency over six weeks of storage at refrigerator temperature was 40% in sample No. 1 (sample without chitosan coating) and 65% in sample No. 2 (sample with chitosan coating).

Conclusion: Encapsulation of hydrolyzed quinoa proteins using nanoliposome and its coating with chitosan improve various characteristics of nanoliposomes such as particle size, decomposition index and zeta potential, improving particle stability by decreasing its release rate during storage and causing high storage ability of the active compounds in nanoliposome structures.

Keywords: Nanoliposome, Encapsulation, Hydrolyzed protein, Quinoa seed