

(مقاله پژوهشی)

## تأثیر فرآیندهای انجماد- انجمادزدایی و خشک کردن انجمادی-رهیدراسیون بر پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست فعال

سید مهدی اجاق<sup>۱\*</sup>، شیرین حسنی<sup>۲</sup>، مریم حسنی<sup>۳</sup>

- ۱- دانشیار، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.  
 ۲- دانش آموخته دکتری، فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.  
 ۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۰

### چکیده

در سال‌های اخیر ضایعات حاصل از آبزیان به عنوان منبعی از پپتیدهای زیست فعال مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. لیکن تولید پپتیدهای زیست فعال نیازمند روش‌های محافظتی می‌باشد تا علاوه بر افزایش پایداری فیزیکی، منجر به رهایش کنترل شده و بهینه‌سازی تأثیر آن طی مصرف گردد. لذا، تحقیق حاضر با هدف تولید نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست فعال مستخرج از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با اجزای پپتیدی در محدوده زیر ۳ تا بالای ۳۰ کیلودالتون به منظور افزایش پایداری فیزیکی، با پوشش کیتوزان انجام گرفت. نتایج نشان داد میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها در محدوده ۳۳۳/۹ تا ۵۳۳/۹ نانومتر با پتانسیل زتای ۵۴/۰۳- تا ۴۶/۳۴+ میلی ولت و شاخص پراکندگی (PDI) ۰/۲ تا ۰/۵۴ قرار دارد. مقادیر راندمان نانوپوشانی به طور قابل توجهی موثر از تغییرات غلظت کیتوزان در پوشش بود و حد اکثر راندمان نانوپوشانی (۰/۵۱ ± ۷۲/۵۷٪) در نانولیپوزوم حامل پپتید با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون با پوشش ۱ درصد کیتوزان مشاهده شد. بررسی میزان رهایش پپتید در محیط بیرون تنی حاکی از تأثیر پوشش بر کند نمودن رهایش و افزایش پایداری پپتیدها بود. با ارزیابی پایداری فیزیکی انتشار سریع تر پپتید از لیپوزوم‌ها پس از فرایندهای انجماد/ انجمادزدایی و خشک کردن انجمادی/ رهیدراسیون مشاهده شد. نتایج نگهداری دراز مدت نانولیپوزوم‌ها در دو دمای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد مشخص نمود پوشش کیتوزان با افزودن ضخامت غشا و افزایش دافعه بین ذرات سبب پایداری بیشتر نانولیپوزوم‌ها گردید نتایج تحقیق حاضر نشان داد نانوپوشانی پپتیدهای زیست فعال در حامل لیپوزومی می‌تواند روشی مناسب در جهت کاربرد در صنعت غذا و دارو باشد.

**واژه های کلیدی:** پپتید زیست فعال، نانوپوشانی، پایداری فیزیکی، آلکالاز، رهایش

## ۱- مقدمه

گونه‌های دریایی، نیمی از کل تنوع زیستی جهان را شامل می‌گردند. دریا منبعی بی‌شمار از ترکیبات جدید زیستی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، تحریک کننده سیستم ایمنی و کاهش کلسترول خون می‌باشد که پتانسیل استفاده در صنعت دارو و همچنین تولید فرآورده‌های غذایی فراسودمند در جهت ارتقاء سطح سلامت مصرف کننده را دارا می‌باشند. در حال حاضر ترکیبات زیست فعال به عنوان اجزای طبیعی و یا به عنوان مکمل در مواد غذایی با پتانسیل بهبود سلامت، ارزش تغذیه‌ای فراتر از محصول ارائه می‌دهند (۲۱). اگر این ترکیبات زیستی حاصل از ضایعات آبزیان به نحو مطلوب مورد استفاده قرار گیرند، از یک طرف باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آن‌ها شده و از سوی دیگر به لحاظ داشتن پروتئین‌های با ارزش قابل بازیافت می‌باشند. امروزه مطالعات بسیاری با هدف تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH<sup>1</sup>) برای تولید فرآورده‌ای با خصوصیات امولسیون کننده‌گی، کف کننده‌گی، بهبود ظرفیت نگهداری آب و پایداری فرآورده‌های غذایی متمرکز شده است (۱۵،۴). این پپتیدها معمولا در ساختار کلی پروتئین‌ها غیر فعال هستند و برای دستیابی به خواص زیست فعال باید از ساختار پروتئین جدا شوند. در سال‌های اخیر تحقیقات بیشتری با هدف آزادسازی پپتیدهای زیست فعال از منابع پروتئینی به عنوان ترکیبات فعال فیزیولوژیکی به جهت استفاده در محصولات غذایی و تولید غذاهای فراسودمند انجام گرفته است (۲۰). آنزیم آلکالاز به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد مانند درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان نسبتا کم تحت شرایط متعادل مورد استفاده قرار می‌گیرد. چاکر ابارتی و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی خواص ضد التهابی مواد غذایی حاوی پپتیدها از جمله پروتئین هیدرولیز شده ماهی پرداختند. آن‌ها دریافتند پپتیدهای به دست آمده باعث ایجاد فعالیت‌های بیولوژیکی دیگری همچون

واکنش‌های فیزیولوژیکی ضد میکروبی، فارماکولوژیک و ایمونولوژیک می‌شوند (۲). در کنار خواص متعدد کارکردی، پپتیدهای زیست فعال به علت دارا بودن زنجیره‌های جانبی آب‌گریز دارای طعمی تلخ می‌باشند که اغلب در طول روند کهنگی در محصولات تخمیری و در طول فرآیند آنزیمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده به وجود می‌آید و سبب مقبولیت کمتری از سوی مصرف کنندگان می‌گردد (۱۸). تلخی ناخوشایند پپتیدهای آب‌گریز و همچنین حساسیت بالای و عدم پایداری این ترکیبات، سبب محدودیت استفاده از این ترکیبات در محصولات غذایی می‌گردد. از آنجایی که اغلب اسیدهای آمینه و پپتیدهای زیست فعال در طبیعت آب‌گریز هستند، روش‌های تلخی‌زدایی شامل حذف پپتید آب‌گریز با روش کروماتوگرافی، جذب پپتیدهای تلخ با کربن فعال و استخراج گزینشی با الکل منجر به از دست رفتن فعالیت زیستی آن می‌گردد. لذا در این راستا استفاده از فن‌آوری نانوپوشانی، مانعی بین پپتیدهای زیست فعال حساس و محیط اطراف برقرار می‌کند و در نتیجه طعم و بوی نامطلوب را پوشش داده و سبب افزایش زیست فراهمی می‌شود، همچنین از دیگر دلایل مهم نانوپوشانی اجزای فعال، افزایش پایداری و کاهش تخریب طی فرایند و ممانعت از واکنش‌های نامطلوب با دیگر اجزا در محصولات غذایی، اصلاح ویژگی‌های فیزیکی مواد اولیه به منظور امکان جابجایی آسان‌تر و پراکندگی یکنواخت عامل فعال می‌باشد. یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون پوشانی مواد زیست فعال و غذا-دارو استفاده می‌شود، لیپوزوم‌ها می‌باشند. نانولیپوزوم‌ها ذرات کلوئیدی تشکیل شده از مولکول‌های لیپیدی (عمدتا فسفولیپیدها) هستند که به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه‌ای تجمع می‌یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموژنیزاسیون، سونیکاسیون) به صورت کروی (وزیکول) در می‌آیند. سیستم‌های حامل نانویی، انتقال پپتیدها را از بین موانع

## ۲-۲- تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی

امعا و احشا ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از مزارع پرورش در ۴۰ کیلومتری شهرستان گرگان تهیه و توسط دستگاه چرخ گوشت کاملاً هموژن گردید. به منظور غیرفعال نمودن آنزیم‌های داخلی، نمونه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. امعا و احشا توسط محلول بافر فسفات با نسبت ۲:۱ (وزنی: حجمی) رقیق و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط هموژن 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 پروتئین هیدرولیز شده، عمل هیدرولیز در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ گرم از نمونه در دستگاه انکوباتور متحرک (Comecta, Spain) 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 (Labrotechnich GmbH z206a, GermanyHermle) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در  $g \times 8000$  سانتریفیوژ و مایع رومانند<sup>۲</sup> جمع‌آوری گردید (۱۷).

## ۲-۳- اندازه‌گیری درجه هیدرولیزاسیون (DH%)

میزان هیدرولیز (DH<sup>۳</sup>) در نمونه با تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) طبق روش اویسی پور و همکاران (۲۰۱۳) 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  $g \times 6700$  سانتریفیوژ شد. سپس غلظت پروتئین محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به روش بیوره تعیین گردید (۱۷). درجه هیدرولیز (DH) طبق رابطه ۱ محاسبه گردید

زیستی که سبب اختلال در رسیدن پپتید به مکان مورد نظر می‌شوند بهبود می‌دهند. فسفولیپیدهای دو لایه به طور معمول بین ۳ تا ۶ نانومتر ضخامت دارند و لیپوزوم‌های شکل گرفته از آن‌ها می‌توانند قطری بین ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر داشته باشند (۱۰). استفاده از سیستم‌های پلی‌مری چسبنده مخاطی مانند کیتوزان، مهمترین گام در جهت افزایش تحویل لیپوزومی پپتیدهای زیست فعال به شکل خوراکی می‌باشد. لیپوزوم‌های پایدار شده با سیستم‌های کامپوزیتی دارای پایداری بالا همراه با رهایش تدریجی بوده و در مقایسه با لیپوزوم‌های خالص و یا سیستم‌های بر پایه پلی‌مر کارایی را افزایش می‌دهند. بدین منظور تحقیق حاضر با ۱- هدف استفاده بهینه از ضایعات ماهی حاصل از فیله کردن جهت تولید فرآورده با ارزش افزوده؛ ۲- نانوپوشانی پپتیدهای زیست فعال بدست آمده در سیستم لیپوزومی جهت پوشاندن طعم نامطلوب؛ ۳- افزایش پایداری فیزیکی طی فرآوری و شرایط مختلف نگهداری و ۴- رهایش کنترل شده انجام شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

آنزیم آلکالاز (فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس (شرکت سیگما آلدریج، آمریکا)، ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، آب دیونیزه، کاغذ صافی واتمن ۴۱، فسفولیپید (DPPC)، کلسترول، هیدروکسید سدیم (شرکت مرک، آلمان)، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (درجه داستیلاسیون ۷۵-۸۵٪) و اسید استیک (شرکت سیگما آلدریج، آمریکا) (سرم آلبومین گاوی<sup>۱</sup> (شرکت مرک، آلمان)، تری کلرو استیک اسید (شرکت مرک، آلمان)، بافر فسفات نمکی (شرکت زیست مواد فارمد، ایران). تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

رابطه ۱

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

## ۲-۵-۲- تعیین پتانسیل زتای سطح لیپوزومها

در مطالعه حاضر، پتانسیل زتای سطح لیپوزومها به روش Laser Doppler Micro-electrophoresis توسط دستگاه Zetasizer انجام شد. لیپوزومها توسط بافر فسفات (pH=۷/۴)  $50 \text{ m M}$ ، به میزان ۱۰ برابر رقیق شده و ارزیابی در زاویه - پراکنش  $173^\circ$  و طول موج هلیوم-تنگستن ۶۳۳ نانومتر و در دمای اتاق صورت گرفت.

## ۲-۵-۳- تعیین راندمان درون پوشانی نانولیپوزومها (EE%)

بررسی راندمان درون پوشانی طبق روش لی (۲۰۱۴) با اندکی تغییر انجام گرفت. به طور خلاصه، در این روش راندمان درون پوشانی از طریق محاسبه نسبت FPH کپسوله شده به FPH آزاد با استفاده از کیت سنجش پروتئین<sup>۱</sup> BCA<sup>۱</sup> (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ارزیابی شد. بدین ترتیب میزان پپتید آزاد (غیر کپسوله) اندازه گیری و با اختلاف FPH کل و FPH آزاد، مقادیر FPH کپسوله شده محاسبه گردید (۱۲). این روش بر اساس واکنش احیای  $\text{Cu}^{2+}$  به  $\text{Cu}^{+1}$  توسط پروتئین در محیط قلیایی و تکنیک رنگ سنجی انجام می شود.

## ۲-۵-۴- مطالعه رهایش

برای مطالعه رهایش پپتید در محیط آزمایش ۶ میلی لیتر از نانولیپوزوم حاوی پپتید در فالكونهای ۱۵ میلی لیتری ریخته شده و به آن ۲ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) اضافه شد و نمونه در انکوباتور متحرک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۸۰ دور در دقیقه همزده شد. در فواصل زمانی مشخص ۴۰۰ میکرو لیتر از مایع رومانند برداشته و ۴۰۰ میکرو لیتر PBS جدید (دمای محلول PBS، ۳۷ درجه سانتی گراد) به محلول اولیه اضافه گشت. درصد تجمعی پپتید رها شده به وسیله تقسیم

## ۲-۴- تهیه نانولیپوزومهای حامل پپتیدهای زیست فعال

پروتئین هیدرولیز شده برای رسیدن به پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ و بیش از ۳۰ کیلو دالتون از اولترافیلتراسیون (EMD, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) عبور داده شد. سپس برای تهیه نانولیپوزومهای حامل پپتید، هیدرولیزه پروتئین (۱۰ میلی گرم / میلی لیتر) و فسفولیپید/کلسترول با نسبت (۳۰:۳۰ میلی گرم) معادل (۴:۸ میلی مولار) در آب مقطر هیدراته شده و با گلیسرول تا دمای ۶۰-۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. pH مخلوط توسط هیدروکسید سدیم ۲ مولار و حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد با تکان دادن مداوم به مدت یک ساعت توسط شیکر به ۷/۳ رسانده شد. لیپوزومهای خام، تحت فشار بالا هموزن شده و با نسبتهای متفاوتی (۵/۱۰ درصد وزنی/حجمی) از محلول کیتوزان (محلول کیتوزان با حل شدن کیتوزان در اسید استیک ۱٪ ۷/۷ تهیه می گردد) در دمای اتاق به مدت یک ساعت با دور ۲۰۰ rpm مخلوط گردید. محلول لیپوزومی در دمای ۲۵ درجه با سونیکاتور با پروب ۲۰۰ ups تحت سونیکاسیون قرار گرفت. نانولیپوزومها در دمای محیط تحت گاز نیتروژن قرار گرفته و برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری شد (۱).

## ۲-۵-۰- ارزیابی خصوصیات فیزیکی نانولیپوزومهای حامل پپتید

### ۲-۵-۱- اندازه ذره و تعیین توزیع اندازه ذره ای (PDI)

اندازه ذره ای و توزیع اندازه ذره ای لیپوزومها پس از رقیق کردن نمونه به میزان ۱۰ برابر با بافر به روش تفرق نور پویا (Dynamic light scattering) توسط دستگاه Zetasizer (Nano ZS) انجام گردید.

زمانی معین اندازه ذرات و راندمان درون‌پوشانی مطابق روش‌های ذکر شده در بخش ۲-۵-۱ و ۲-۵-۳ اندازه‌گیری گردید.

### ۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و نمودارهای موجود با Office نسخه ۲۰۱۳ انجام پذیرفت. جهت بررسی اختلاف بین داده‌های حاصله، از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و همچنین جهت تعیین وجود تفاوت معنی دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.05$  استفاده شد. جهت بررسی حاضر برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- درجه هیدرولیزاسیون (DH%)

میانگین درجه هیدرولیز در نمونه‌های مورد آزمایش  $48.3 \pm 0.17$  درصد اندازه‌گیری شد که با نتایج حاصل از درجه هیدرولیز ژلاتین هیدرولیز شده ماهی تن (۴۷/۵۲)٪ (۷) و کلاژن پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (۴۶/۸)٪ (۱۸)، و ماهی مرکب (۵۰)٪ (۶) مشابه بود. درجه هیدرولیز نشان دهنده میزان شکافت پیوندهای پپتیدی طی زمان هیدرولیز می‌باشد و به طور گسترده‌ای به عنوان شاخصی برای تعیین خواص کارکردی پروتئین هیدرولیز شده و تعیین میزان باندهای شکسته شده می‌باشد که در جهت مشخص نمودن خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده به منظور دستیابی به یک سیستم ایده‌آل آنزیمی- پروتئینی بسیار دقیق به کار گرفته می‌شود (۱۷).

#### ۳-۲- ارزیابی خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل

##### پپتید

۳-۲-۱- اندازه ذره و تعیین توزیع اندازه ذره‌ای (PDI) اندازه ذرات یک عامل مهم و اثرگذار بر میزان پایداری، راندمان درون‌پوشانی و رهایش ترکیبات زیست فعال می‌باشد. همان طور که در جدول‌های ۱ و ۲ مشاهده می‌شود میانگین

مقدار تجمعی پپتید رها شده در هر نقطه برداری (Mt) به وزن اولیه پپتید درون‌پوشانی شده در نمونه (M<sub>0</sub>) به دست آمد (۹، ۱۰).

رابطه ۲

$$\text{Cumulative release percentage} = \sum_{t=0}^t \frac{M_t}{M_0} \times 100$$

#### ۲-۶- ارزیابی پایداری فیزیکی

##### ۲-۶-۱- انجماد/ انجمادزایی

حجم ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ساخته شده (نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با و بدون پوشش کیتوزان) به سرعت در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد در غیاب محافظ سرمایی به مدت ۴ هفته فریز شدند. قبل از انجام آزمایشات نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت با ورتکس یخ‌گشایی شدند. اندازه ذرات و راندمان درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها مطابق روش‌های ذکر شده در بخش ۲-۵-۱ و ۲-۵-۳ اندازه‌گیری گردید.

##### ۲-۶-۲- خشک کردن انجمادی/ رهیدراسیون

فرمولاسیون‌های مختلف تهیه شده از سوسپانسیون لیپوزومی (فاقد پوشش و پوشش دهی شده با کیتوزان) ابتدا توسط خشک‌کن انجمادی خشک گردید و سپس با آب مقطر برای تعیین میزان پایداری رهیدراته شد. بدین منظور نمونه‌ها در خشک‌کن انجمادی (مدل FDB-5503، ساخت شرکت Operon، کره) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۷ میلی بار به مدت ۷۲ ساعت خشک گردیدند. نمونه‌های خشک شده در دمای ۴ درجه به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. سپس، ورقه‌های خشک شده با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر رهیدراته شده و تا رسیدن به سوسپانسیون شفاف مخلوط شدند. اندازه ذرات و راندمان درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها مطابق روش‌های ذکر شده در بخش ۲-۵-۱ و ۲-۵-۳ اندازه‌گیری گردید.

##### ۲-۶-۳- نگهداری طولانی مدت (۴ هفته نگهداری)

به منظور بررسی پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید، نمونه‌ها با فرمولاسیون مختلف در دو شرایط دمایی (۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴ هفته نگهداری شدند. در فواصل

ذرات می‌باشد. محدوده شاخص پراکندگی بدست آمده با نتایج لی و همکاران (۲۰۱۵) و رمضان‌زاده و همکاران (۲۰۱۸) و حسینی و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت دارد (۸، ۱۳، ۱۸).

### ۳-۲-۲- پتانسیل زتای سطح نانولیپوزوم‌ها

پتانسیل‌زتا از دیگر ویژگی‌های فیزیکی مهم لیپوزوم‌ها است که عملکرد لیپوزوم را در شرایط بیولوژیک پیش‌بینی می‌کند، نمایانگر بار سطحی و زیکول‌ها است و شاخصی برای پایداری یک سامانه کلوئیدی است (۸). به عبارت دیگر، پتانسیل زتا، اختلاف پتانسیل بین لایه باردار ساکن و بقیه فاز پیوسته است. کاهش اختلاف پتانسیل زتا به زیر مقدار بحرانی، موجب در هم ریختن لایه دو گانه باردار اطراف ذرات و تجمع ذرات می‌شود. در مطالعه حاضر، میانگین پتانسیل زتا از  $-۵۰/۴$  میلی ولت در نمونه نانولیپوزوم حامل پپتید با وزن مولکولی پائین و فاقد پوشش تا  $+۴۶/۳$  در نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با غلظت ۱ درصد کیتوزان متغیر بود، که با تحقیق انجام شده توسط جناب (۲۰۱۲) همسویی دارد. مطالعات پیشین نشان دادند بیشترین پایداری در ذرات با پتانسیل‌زتابیش از  $+۳۰$  میلی‌ولت و یا کمتر از  $-۳۰$  میلی‌ولت می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از تجزیه و تحلیل پتانسیل زتا می‌توان دریافت غلظت کیتوزان، عاملی تاثیرگذار بر مقادیر پتانسیل زتا بود (جدول ۱ و ۲).

اندازه ذرات لیپوزوم‌های تهیه شده با سونیکاسیون میله‌ای در محدوده  $۳۳۳/۹$  تا  $۵۳۳/۹$  نانومتر و دارای شاخص پراکندگی در محدوده  $۰/۲$  تا  $۰/۵۴$  بود که نشان دهنده اندازه ذره‌ی مناسب و یکنواختی توزیع ذرات است و با نتایج راستی و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد (۱۹). نتایج نشان داد نانولیپوزوم‌های حامل پپتید پوشش‌دهی شده با کیتوزان، اندازه‌ای کوچکتر از نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش داشتند. بطوری‌که با افزایش غلظت کیتوزان، اندازه ذرات روندی کاهشی را نشان داد. حسینی و همکاران (۲۰۱۷) اندازه ذرات لیپوزوم‌های تولید شده را  $۱۳۱/۵$  نانومتر گزارش نمودند که همسو با نتایج تحقیق حاضر بود (۱۰). بانگ و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود علت کاهش در اندازه لیپوزوم‌ها را با افزودن مقادیر بالای کیتوزان، به دلیل نیروی انقباض ناشی از مقاومت یونی بین لیپوزوم‌های بارگذاری شده و پوشش‌دهی شده با کیتوزان بیان کردند به‌طوری‌که با افزایش غلظت کیتوزان، نیروی انقباضی رشد یافته و منجر به کاهش بیشتر در اندازه ذرات می‌گردد (۱). طبق مطالعات صورت گرفته، اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها در تحقیق حاضر به منظور به‌کارگیری در صنایع غذایی و دارویی مناسب گزارش می‌شود (۲۳). شاخص پراکندگی، توزیع اندازه ذرات را در محدوده ۰ تا ۱ اندازه‌گیری می‌کند (۱۳). شاخص بس پاشیدگی در نانولیپوزوم‌ها نشان‌دهنده پراکندگی کمتر و همگن بودن اندازه

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف کیتوزان (۰/۵ و ۱ درصد) بر خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با وزن مولکولی  $>۳$  کیلو دالتون

پتانسیل زتا (میلی ولت)	راندمان نانوپوشانی (EE%)	شاخص پراکندگی ذرات	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	
$-۵۰/۴۰ \pm ۱/۵۶$ c	$۴۸/۸۳ \pm ۲/۰۲$ c	$۰/۳۲ \pm ۰/۰۵$ a	$۴۲۷/۲۰ \pm ۵/۵۶$ a	نانولیپوزوم فاقد پوشش نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان (۰/۵ درصد) نانولیپوزوم با پوشش کیتوزان (۱ درصد)
$-۳۰/۲۷ \pm ۲/۵۰$ b	$۶۵/۵۰ \pm ۱/۴۱$ b	$۰/۳۳ \pm ۰/۰۶$ a	$۳۶۴/۵۳ \pm ۸/۴۷$ b	
$۴۶/۳۰ \pm ۶$ a	$۷۲/۵۷ \pm ۰/۵۱$ a	$۰/۲۰ \pm ۰/۰۴$ b	$۳۳۳/۹۰ \pm ۱۱/۶۳$ c	

داده‌ها بصورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار است

حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده معنی‌داری ( $p \leq ۰/۰۵$ ) بین تیمارها می‌باشد.

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف کیتوزان (۰/۵ و ۱ درصد) بر خصوصیات فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل پپتید با وزن مولکولی &lt;math&gt;30&lt;/math&gt; کیلودالتون

میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی ذرات	راندمان نانو پوشانی (EE%)	پتانسیل زتا (میلی ولت)
نانولیپوزوم فاقد پوشش نانولیپوزوم با پوشش	۰/۵۴ ± ۰/۰۴ a	۳۶/۰۷ ± ۱/۸۰ c	-۰۵۴/۰۳ ± ۱ c
کیتوزان (۰/۵ درصد) نانولیپوزوم با پوشش	۰/۴۴ ± ۰/۰۴ a	۴۷/۴۳ ± ۲/۱۴ b	-۳۴/۱۷ ± ۱/۸۵ b
کیتوزان (۱ درصد)	۰/۴۵ ± ۰/۰۸ a	۶۷/۵۷ ± ۱/۳۶ a	۴۱/۷۳ ± ۱/۸۲ a

داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار است

حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده معنی داری ( $P \leq 0/05$ ) بین تیمارها می‌باشد.

### ۳-۲-۳- راندمان درون پوشانی نانولیپوزوم‌ها (EE%)

راندمان درون پوشانی از شاخص‌های مهم جهت‌رزیابی پایداری ترکیبات کپسوله شده و توانایی نانولیپوزوم در جلوگیری از خروج هسته است. مقادیر راندمان نانو پوشانی در لیپوزوم‌های حامل پپتید با غلظت‌های متفاوت کیتوزان در پوشش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تفاوت در مقادیر کیتوزان تأثیر معنی داری ( $P \leq 0/05$ ) بر مقادیر راندمان نانو پوشانی داشت. به طوری که با افزایش درصد کیتوزان مورد استفاده در پوشش نانولیپوزوم‌های حاوی پپتید با دو وزن مولکولی، راندمان نانو پوشانی نیز افزایش داشت (جدول ۱ و ۲). مقادیر کمتر راندمان در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش را می‌توان به آسیب ناشی از عمل اولتراسونیک مرتب دانست. نانو پوشانی پپتید با وزن مولکولی پائین در نانولیپوزوم‌های پوشش دار (۱) درصد کیتوزان)  $72/57 \pm 0/51$  درصد گزارش گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش فراصوت دهی در عین سادگی، میزان درون پوشانی قابل قبولی دارد. راندمان درون پوشانی عاملی تأثیرگذار بر ویژگی‌های نانولیپوزوم مانند پایداری اکسایشی، پایداری فیزیکی، مورفولوژی و میزان رهایش ترکیبات هسته می‌باشد. لیپوزوم‌ها ساختارهای کروی دو لایه‌ای تشکیل شده توسط سورفکتانت‌های، مانند فسفولیپیدها هستند. در پژوهش حاضر، هسته‌های آبی بخش آب دوست و دو لایه فسفولیپید با توجه به خواص

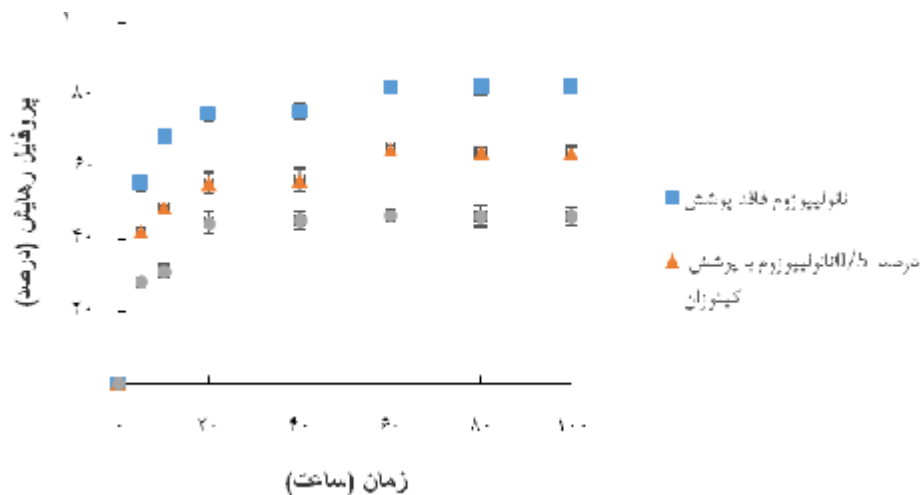
آب‌گریز آن به عنوان ذخیره گاهی برای پپتیدهای زیست فعال می‌باشند. تحقیقات پیشین گزارش کردند که اندازه ذرات و سطح مخصوص لیپوزوم‌ها از جمله عوامل موثر بر راندمان درون پوشانی ترکیبات با ارزش و حساس محصور در سیستم لیپوزومی هستند (۸، ۱۰).

### ۳-۲-۴- الگوی رهایش پپتید از نانولیپوزوم‌ها

مطالعه رهایش پپتید با دو وزن مولکولی از نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش و پوشش دهی شده با کیتوزان با غلظت‌های مختلف در شکل ۱ (الف و ب) نمایش داده شده است. نتایج رهایش پپتید یک فرآیند دو فازی را نشان می‌دهد بدین صورت که در ساعات ابتدایی رهایش به صورت انفجاری و بعد از این زمان، رهایش کندی را ارائه می‌کند. با افزایش غلظت کیتوزان پوشش اثر انفجاری به طور چشمگیری کاهش یافت. رهایش سریع در ساعات ابتدایی آزمایش احتمالاً به دلیل بازجذب سطحی پپتید جذب شده از سطح نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. کوبی و همکاران (۲۰۰۴) رهایش تدریجی ترکیبات هسته پس از گذشت یک ساعت از عمل هضم را به انتشار هسته از طریق لایه‌های پوشش، بخش هیدروکربنی غشا و منافذ موجود در درون غشا نسبت داده اند (۱۱). تمامی لیپوزوم‌های دارای پوشش نسبت به لیپوزوم‌های فاقد پوشش پایدارتر عمل نموده است که احتمالاً علت این پدیده تشکیل یک لایه محافظتی

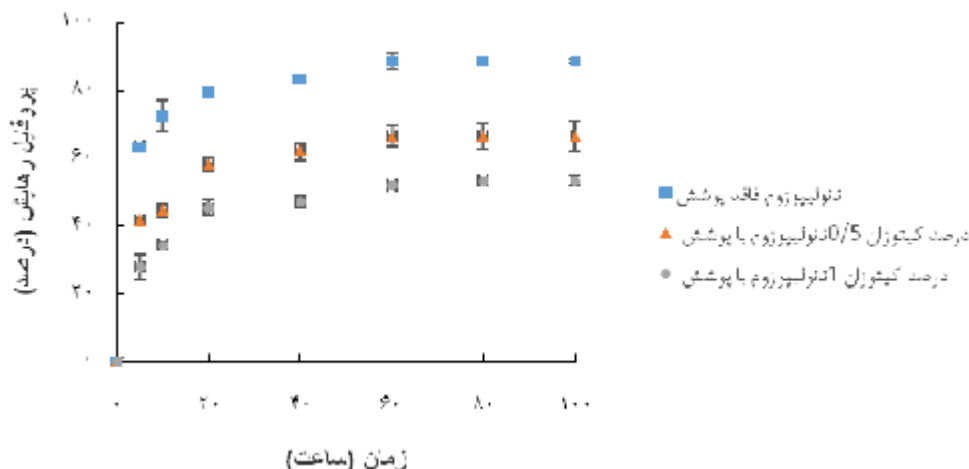
رهایش در مرحله دوم تقریباً محدودتر بود زیرا در این مرحله مولکول‌های سطح پیپتید در محیط رهایش یافته و باید مولکول‌های پیپتید که در لایه های داخلی تر نانوذره هستند از طریق سازوکار انتشار از بستر پلیمر خارج گردند و در این حالت انتشار به عنوان سازوکار غالب خواهد بود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر مشخص گردید نانولیپوزوم‌های حامل پیپتید با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون در هر سه فرمولاسیون رهایش کندتری را نسبت به لیپوزوم‌های حامل پیپتید با وزن مولکولی بالای ۳۰ کیلو دالتون داشتند. مطالعات پیشین دریافته‌اند، عوامل زیادی بر خواص زیست فعال پیپتیدها موثر می‌باشند از جمله می‌توان به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی، ترکیب آمینواسید پیپتیدها و شرایط هیدرولیز شامل دما، زمان و pH اشاره نمود. اما مهم‌ترین عامل موثر، وزن مولکولی می‌باشد (۱۷). نتایج مشابهی با رهایش اولیه ۸۹ درصدی در آلفا توکوفرول کپسوله شده با نانوذرات کیتوزان و در ادامه یک رهایش کندتر توسط لو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شد (۱۴).

قوی با جذب الکترواستاتیک بین کیتوزان و سطح نانولیپوزوم می‌باشد، که بدین وسیله از مواجهه لیپوزوم با محیط خارجی ممانعت به عمل می‌آورد. رهایش انواع ترکیبات زیست فعال از نانوذرات توسط مکانیزم‌های متعددی از جمله فرسایش سطحی، تجزیه، انتشار و واجذبی رخ می‌دهد (۹). بر اساس نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، رهایش سریع در ساعات ابتدایی آزمایش احتمالاً به دلیل جذب پیپتید از سطح نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. رهایش تدریجی ترکیبات هسته به انتشار هسته از طریق لایه‌های پوشش، بخش‌های هیدروکربنی لایه‌ها و منافذ و حفره‌های موجود در سطح مرتبط می‌باشد. الگوی رهایش پیپتید از نانولیپوزوم‌ها نشان داد که نانولیپوزوم‌های تهیه شده با فرمولاسیون ۱٪ کیتوزان در پوشش به ترتیب بیشترین و نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش، کمترین میزان رهایش را داشتند. در مطالعه رهایش بایستی نوع تعاملات بین هسته و ترکیبات دیواره مد نظر قرار گیرند. رهایش اولیه زیاد به انتشار دارو به واسطه تورم سریع و همچنین تا حدی به داروی جذب شده در سطح ذرات نسبت داده می‌شود (۲۴). میزان



(الف)





(ب)

شکل ۱- پروفایل رهایش برون تنی پپتید در نانولیپوزوم های حامل پپتید با (الف) وزن مولکولی >۳ کیلودالتون، (ب) وزن مولکولی <۳۰ کیلودالتون

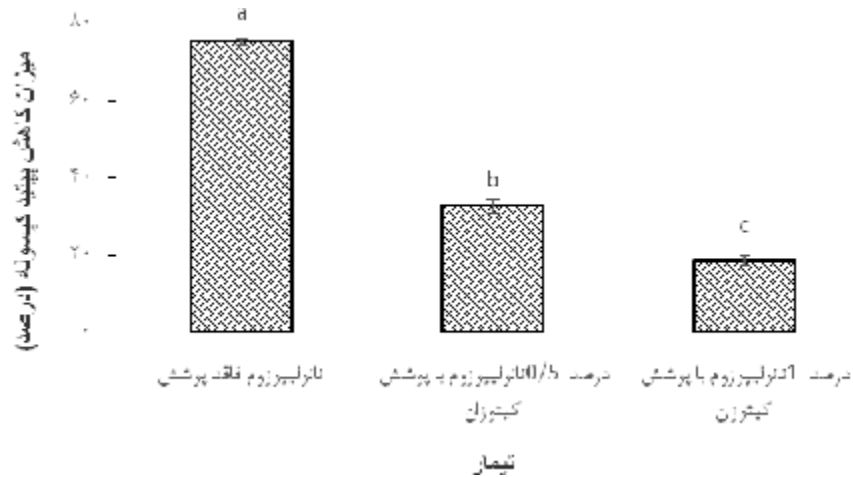
### ۳-۳- پایداری فیزیکی

میزان پایداری فیزیکی لیپوزوم‌های حامل پپتید با وزن مولکولی پایین (پوشش دهی شده با کیتوزان و فاقد پوشش) با سنجش تغییرات در اندازه ذرات و راندمان درون‌پوشانی بعد از فرآیندهای انجماد و انجمادزدایی، خشک کردن انجمادی و رهیدراسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس قابلیت نگهداری بلند مدت نانولیپوزوم‌های حاوی پپتید، تحت دمای ۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته اندازه‌گیری شد.

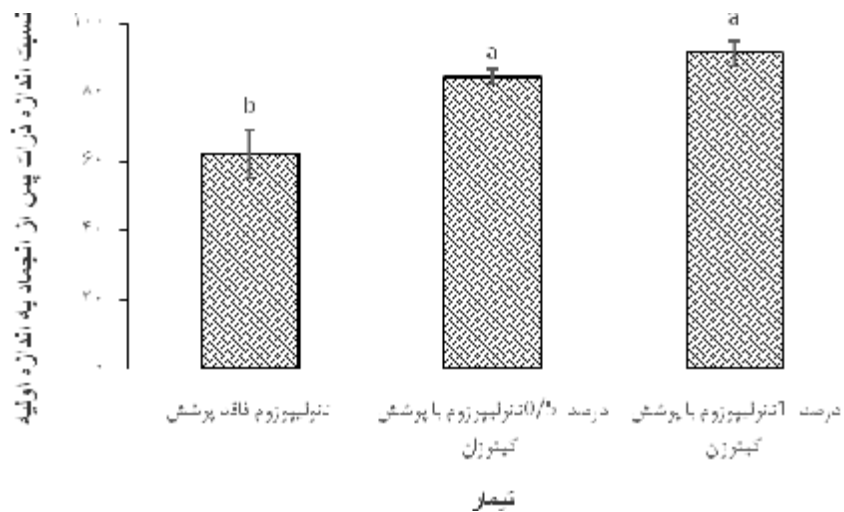
### ۳-۳-۱- انجماد/انجمادزدایی

همان‌طور که در شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌گردد نانولیپوزوم‌های فاقد کیتوزان پس از انجمادزدایی بیشترین افزایش را در

میانگین اندازه ذرات نشان دادند. همچنین کاهش معنی‌دار پپتید درون‌پوشانی شده (بیش از ۸۰٪) در نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش مؤید تجمع بیشتر ذرات نسبت به نانولیپوزوم‌های پوشش دهی شده بود. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، با افزایش غلظت کیتوزان در پوشش نانولیپوزوم‌های حاوی پپتید تا غلظت ۰/۵ درصد میزان تغییرات کمتری در اندازه ذرات را شاهد بودیم و در نمونه‌های با ۱ درصد کیتوزان میانگین قطر اندازه ذرات افزایش یافت. با بررسی نتایج راندمان درون‌پوشانی مشخص گردید نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده پس از انجمادزدایی مقادیر بالاتری از پپتید کپسوله شده را داشتند و با افزایش غلظت کیتوزان میزان پپتید کمتری از حالت کپسوله به غیر کپسوله درآمدند.



شکل ۲- میزان کاهش پپتید کپسوله شده در نانولیپوزوم تحت فرآیند انجماد/ انجمادزدایی



شکل ۳- تغییرات اندازه ذرات نانولیپوزومها تحت فرآیند انجماد/ انجمادزدایی

آن‌ها را بیشتر در معرض انقباض و برخورد قرار می‌دهد (۳). در این حالت تشکیل کریستال‌های یخ ممکن است سبب استرس‌های مکانیکی بر روی لیپوزوم‌ها گردد زیرا، کریستال‌های یخ می‌توانند به درون غشای لیپوزوم‌ها نفوذ کرده و منجر به بی‌ثباتی ذرات و نشت مواد هسته شود. گلیسرول به عنوان محافظت کننده برای به تعویق انداختن مکانیزم‌های تخریب ذکر شده در بالا اضافه گردید. گلیسرول)

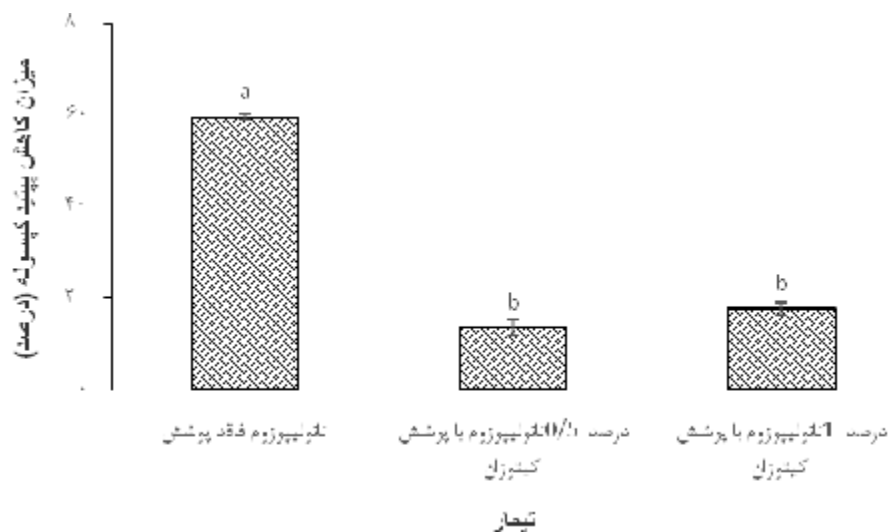
تغییرات شدید در اندازه ذرات و کاهش پپتید کپسوله شده طی دو فرآیند انجماد و انجمادزدایی را می‌توان ناشی از استرس‌های مکانیکی در نتیجه تشکیل یخ و تخریب شیمیایی و فیزیکی لیپوزوم‌ها دانست. طی فرآیند انجماد، کریستال‌های یخ در محلول جامد تشکیل می‌شوند که به نوبه خود لیپوزوم‌ها را به هم نزدیک می‌کند. به تدریج انجماد، تراکم و غلظت لیپوزوم‌ها را در بخش منجمد نشده افزایش داده و بدین ترتیب

سطح لیپوزوم در دسترس باشد، سرعت پوشش دهی بیشتر از تشکیل پل‌های پلیمری بوده و در نتیجه پایداری لیپوزوم‌ها با پوشش دهی و افزایش مقاومت الکترواستاتیک و استریک بین لیپوزوم‌های دارای پوشش کیتوزان بهبود می‌یابد (۲۳).

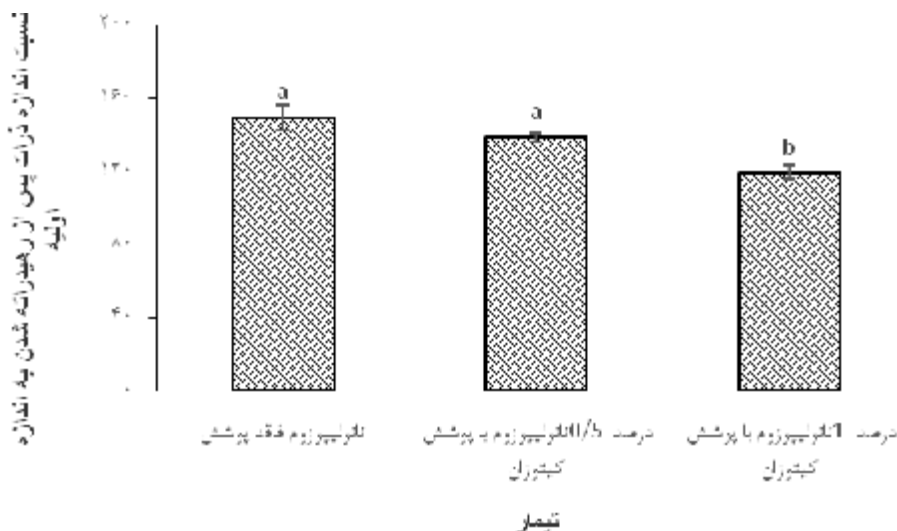
### ۳-۳-۲- خشک کردن انجمادی / رهیدراسیون

نتایج تحقیق نشان داد طی فرآیند خشک کردن انجمادی و رهیدراسیون در تمامی نمونه‌های فاقد پوشش و پوشش دهی شده میانگین قطر اندازه ذرات افزایش یافت به طوری که شدت تغییرات نسبت به اندازه اولیه، در لیپوزوم‌های فاقد پوشش بالاتر بود (شکل ۵). با ارزیابی کارایی درون‌پوشانی مشاهده گردید نانولیپوزوم‌های حامل پپتید پوشش دهی شده با کیتوزان مقادیر بیشتری از پپتید را بصورت کپسوله داشتند و نمونه‌های با پوشش ۰/۵ درصد کیتوزان کمترین میزان خروج پپتید از نانولیپوزوم و در نتیجه پایداری بالاتری را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند (شکل ۴). با توجه به مطالب گفته شده، می‌توان دریافت طی فرآیند خشک کردن و رهیدراسیون نیز گلیسرول به عنوان محافظت کننده در پایداری لیپوزوم‌های فاقد پوشش ناکارآمد بوده است.

$(\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH})$  دارای سه گروه OH می‌باشد که هدف‌هایی برای اتصالات H با اتم‌های اکسیژن موجود در سرهای فسفولیپیدها هستند (۲۲). بنابر این گلیسرول پوشش محافظی بر روی غشای داخلی و خارجی لیپوزوم‌ها تشکیل داده و تا حدودی از لیپوزوم‌ها در مقابل کریستال‌های یخ تشکیل شده محافظت می‌کند. با این وجود، در تحقیق حاضر خروج پپتید پس از انجمادزدایی در نمونه‌های فاقد پوشش بسیار بالا گزارش گردید. اوهتاک و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند افزایش پایداری لیپوزوم پس از انجماد توسط گلیسرول وابسته به غلظت گلیسرول می‌باشد. مطالعات آن‌ها نشان داد در غلظت ۱۵ درصد وزنی/وزنی گلیسرول، خروج هسته ناشی از انجماد لیپوزوم‌های دارای لستین تخم‌مرغ بطور قابل توجهی کاهش یافت (۱۶). مطالعات نشان دادند که بکارگیری گلیسرول در مقادیر کم یا زیاد از حد مطلوب می‌تواند منجر به بی‌ثباتی لیپوزوم‌ها گردد (۱۲). یان و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که سوسپانسیون پایدار لیپوزوم با پوشش کیتوزان تنها در صورتی تشکیل می‌گردد که مقادیر کیتوزان در غلظت مطلوب مورد استفاده قرار گیرد (۲۴). در صورتی که مقادیر مناسب کیتوزان برای پوشش دهی کامل



شکل ۴- میزان کاهش پپتید کپسوله شده در نانولیپوزوم تحت فرآیند خشک کردن انجمادی / رهیدراسیون



شکل ۵- تغییرات اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها تحت فرآیند خشک کردن انجمادی / رهیدراسیون

علاوه، نفوذ در غشای ضخیم برای کریستال‌های یخ طی انجماد نیز سخت‌تر می‌باشد. با توجه به اینکه کیتوزان می‌تواند پیوندهای هیدروژنی بین مولکول‌های آب و پلیمر تشکیل دهد انتظار می‌رود که مکانیسم محافظتی مشابهی مانند مولکول‌های شکر نیز انجام شود. پوشش کیتوزان اتصالات هیدروژنی آب را با گروه‌های سر فسفولیپید جایگزین کرده و به دنبال آن سبب افزایش پایداری لیپوزوم‌های پوشش دهی شده می‌شوند. با این وجود، هنگامی که غلظت کیتوزان از حد مطلوب فراتر رود ثبات لیپوزوم‌ها نیز کاهش می‌یابد. کیتوزان بیش از حد مطلوب منجر به تجمع گسترده شده و سبب افزایش در اندازه ذرات طی فرآیندهای انجماد زدایی و رهیدراسیون می‌شود. بنابر این کیتوزان اضافه نمی‌تواند سبب بهبود توانایی در غلبه بر تنش‌های فیزیکی طی انجماد و یا خشک کردن گردد، زیرا باعث تجمع ذرات ناشی از پدیده تهی سازی (Depletion) می‌شود. فلوکولاسیون تهی سازی مشابه مکانیسم موجود در امولسیون است. هنگامی که یک پلیمر غیر جذب (کیتوزان بیش از اندازه) به سوسپانسیون کلوئیدی اضافه شود، ذرات حضور پلی‌مرهای آزاد متحرک را در نزدیکی سطوح خود محدود می‌کند و باعث از دست دادن آنتروپیکنفورماسیونی

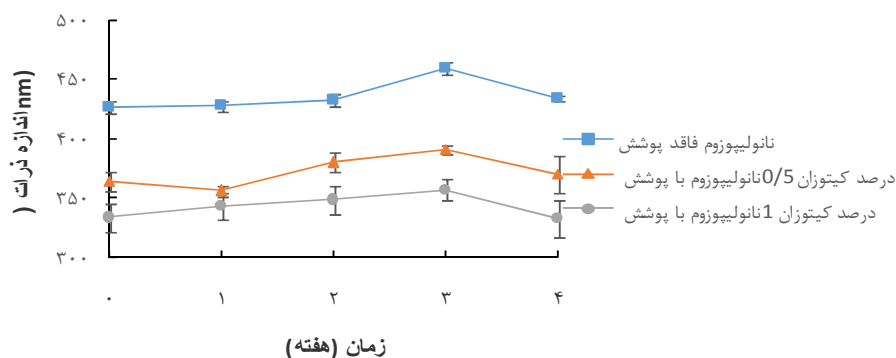
از آن جایی که گلیسرول در دمای اتاق مایع است، محصول نهایی بعد از فرآیند خشک کردن ورقه‌های کیک مانند خشک شده را تشکیل نمی‌دهند. استارک و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند لیپوزوم‌های خشک شده به روش انجمادی دارای ظاهری چرب و چسناک بوده و به طور کامل دوباره معلق نمی‌گردند. بنابراین استفاده مناسب از ترکیبات لیپروتکتانت‌ها که بتوانند مولکول‌ها را طی خشک شدن پایدار نگه دارند هنوز نیاز به بحث دارد. گزارش گردید دی‌ساکاریدهایی مانند سوکروز و ترهالوز مؤثرترین لیپروتکتانت‌ها برای لیپوزوم‌ها هستند (۲۲). بلافاصله پس از خشک شدن، دی‌ساکاریدها دارای تحرک مولکولی بسیار کم و ویسکوزیته بالا هستند و یک مانریکس شیشه‌ای غیر آلی (آمورف) را تشکیل می‌دهند. بدین طریق از تماس مستقیم بین وزیکول‌های لیپوزوم جلوگیری کرده و به بهبود پایداری کمک می‌کند. مشاهدات نشان دادند که غلظت بهینه پوشش کیتوزان پایداری لیپوزوم‌ها را در مقابل استرس‌های شدید فیزیکی طی خشک کردن و رهیدراسیون بهبود می‌بخشد که می‌تواند با مکانیزم‌های مختلفی توجیه گردد. پوشش کیتوزان با ایجاد تعادل سبب پایداری سوسپانسیون شده و از تجمع و انعقاد جلوگیری می‌کند. به

کیتوزان کاهش در مقادیر راندمان ریزپوشانی را نشان دادند و گزارش کردند مقادیر بالای کیتوزان بیش از حد مطلوب منجر به عدم پایداری سیستم و رهایش سریع تر ترکیبات کپسوله شده می‌گردد (۱).

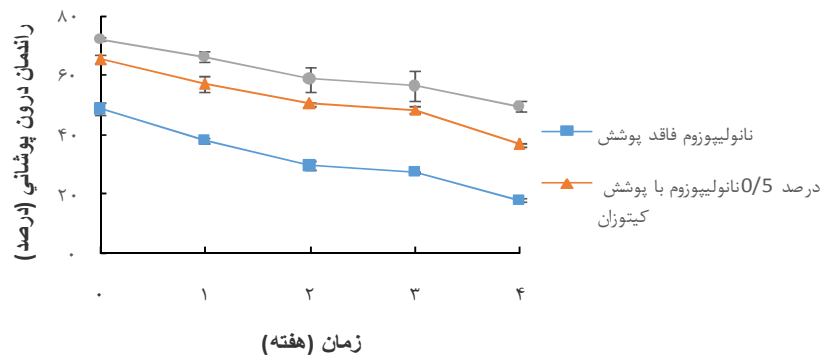
### ۳-۳-۳- نگهداری طولانی مدت (۴ هفته)

پایداری سیستم‌های لیپوزومی، با تغییر در میانگین قطر اندازه ذرات و میزان پیتید کپسوله شده در نانولیپوزوم در دو دمای نگهداری (۴ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد) تعیین شدند. نتایج نشان داد میزان تجمع ذرات و کاهش پیتید کپسوله شده در نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه کمتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود (شکل‌های ۶، ۷، ۸، ۹). بالاتر بودن میزان پایداری در دمای ۴ درجه را می‌توان به نفوذپذیری کمتر لایه‌های پوشش دهنده، مهار تجمع ذرات (تحرک مولکولی پائین) و تأخیر در تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب غیر اشباع در ۲ لایه فسفولیپیدی مرتبط دانست.

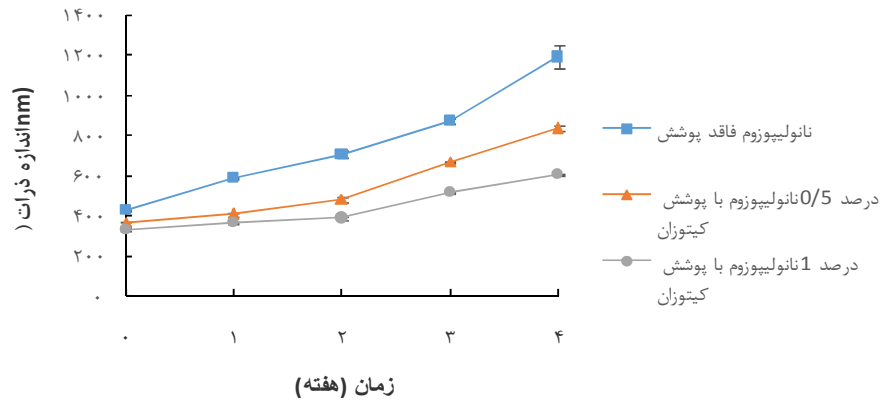
زنجیره‌های پلی‌مری می‌شوند. بنابر این، مناطق تهی در اطراف سطوح ذرات شکل می‌گیرد در حالی که پلی‌مرهای سیال آزاد از سطح به منظور جلوگیری از دست دادن آنتروپی خارج می‌شوند. در نتیجه یک گرادیان فشار اسموتیک به وسیله پلیمر بین سطح کلونید (منطقه تهی) و توده اولیه شکل می‌گیرد. هنگامی که مناطق تهی با یکدیگر همپوشانی دارند حجم بالایی برای پلی‌مرهای آزاد در سیستم موجود می‌باشد که سبب افزایش آنتروپی پلی‌مرهای آزاد می‌شود. بنابر این ذرات توسط نیروی جذب کننده که توسط آنتروپی هدایت می‌شود در نهایت تجمع کرده و متراکم می‌گردند. در مطالعه حاضر کیتوزان بیش از حد مطلوب ممکن است باعث ایجاد یک فشار اسمزی در نتیجه غلظت کمتر کیتوزان نزدیک به سطح در لیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده نسبت به محیط تعلیق گردد. در صورتی که نیروهای دافعه (نیروی الکترواستاتیک و پایداری استریک) بین ذرات پوشش‌دهی شده به اندازه کافی برای تعادل نیروی انتروپیک جذب شبکه قوی نباشند، ذرات فلوکه می‌شوند. بانگ و همکاران (۲۰۱۱) با افزایش غلظت



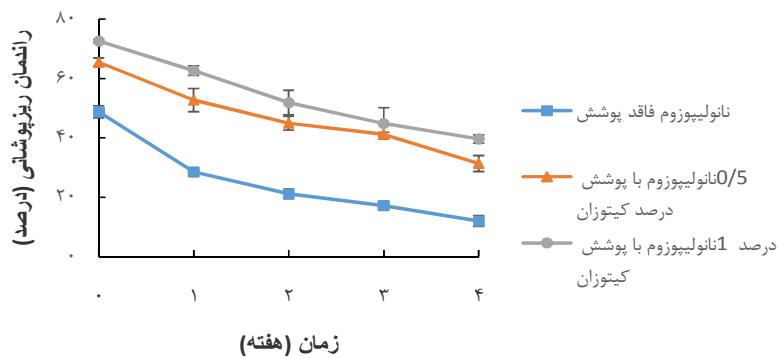
شکل ۶- اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته



شکل ۷- راندمان درون پوشانی نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ هفته



شکل ۸- اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ هفته



شکل ۹- راندمان درون پوشانی نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴ هفته

لیپوزوم‌های فاقد پوشش و پوشش دهی شده با کیتوزان پس از فرایندهای انجماد/ انجمادزایی و خشک کردن انجمادی/ رهیدراسیون نشان دادند پس از فرآیندهای ذکر شده انتشار شدیدتری در پیتید کپسوله شده در نانولیپوزوم در تمامی نمونه‌ها اتفاق افتاد. پوشش کیتوزان با افزودن ضخامت غشا و افزایش دافعه استری بین ذرات و تشکیل فاز شبه هیدراتاسیون مانع از تجمع و برخورد لیپوزوم‌ها شده و سبب پایداری بیشتر لیپوزوم‌ها می‌گردد. نتایج نگهداری دراز مدت نانولیپوزوم‌ها مشخص نمود که نگهداری به مدت ۴ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد شرایط نگهداری مناسب‌تری برای تمامی فرمولاسیون‌ها است و لیپوزوم‌های دارای پوشش توانایی بیشتری در حفظ مواد کپسوله شده داشتند. نتایج تحقیق حاضر اثبات نمود نانوپوشانی در حامل لیپوزومی با پوشش کیتوزان روشی مفید برای استفاده از پیتیدهای زیست فعال آبیان در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند و غذا داروها می‌باشد.

#### ۵- منابع

1. Bang, S.H., Hwang, I.C., Yu, Y.M., Kwon, H.R., Kim, D.H., Park, H. J. 2011. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nano carrier systems. *Journal of Microencapsulation*, 28(7):595-604.
2. Chakrabarti, S., Jahandideh, F., Wu, J. 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. Review article. *Biomedicine Research International*, 1-11.
3. Degner, B. M., Chung, C., Schlegel, V., Hutkins, R., McClements, D. J. 2014. Factors influencing the freeze-thaw stability of emulsion-based foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2): 98-113.
4. 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 horita*. *Food Chemistry*, 135(3):1479-1484.
5. Gibis, M., Zeeb, B., Weiss, J. 2014. Formation, characterization, and stability of

میزان پایداری در لیپوزوم‌های فاقد پوشش نسبت به لیپوزوم-های پوشش دهی شده در هر دو شرایط دمایی نگهداری اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) داشتند. عموماً لیپوزوم‌ها در معرض تجمع و تشکیل وزیکول‌های بزرگتر در طول زمان می‌باشند. دیسپرسیون‌های لیپوزومی تمایل به حرکت به سمت حداقل انرژی و رسیدن به پایداری ترمودینامیکی بیشتر دارد. افزایش پایداری مشاهده شده در پایداری لیپوزوم‌های پوشش دهی شده با کیتوزان می‌تواند با دافعه استریک و الکترواستاتیک توضیح داده شود. نتایج بیانگر این مطلب بود که غشای ضخیم‌تر لیپوزوم منجر به انتشار کندتر پیتید از طریق لایه‌های پوشش شده و در نتیجه پیتید بیشتری به شکل کپسوله در نانولیپوزوم را شاهد بودیم. گیبیس و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمود که پوشش کیتوزان با ایجاد یک مانع باردار به منظور جلوگیری از تماس با پرواکسیدان‌ها مانند فلزات با دو لایه فسفولیپیدی، از تخریب اکسیداتیو فسفولیپیدها ممانعت می‌کند (۵). به علاوه پوشش کیتوزان بر روی لیپوزوم‌ها با دافعه بار یون‌های فلزی و به حداقل رساندن واکنش‌های فلز و چربی، اکسیداسیون لیپید را به تأخیر می‌اندازد.

#### ۴- نتیجه‌گیری

یکی از روش‌های کلیدی به منظور حفظ خصوصیات زیست‌فعالی و پایداری ترکیبات زیست‌فعال مانند پیتیدهای به دست آمده از ضایعات ماهی، درون‌پوشانی آن‌ها در سیستم‌های نانولیپوزومی و استفاده از پوشش‌های پلی‌مری با خصوصیات زیستی به منظور محافظت تا رسیدن به مکان هدف و افزایش پایداری در مقابل آسیب‌های محیطی و فیزیکی می‌باشد. تحقیق حاضر نشان داد، پوشش کیتوزان به طور موفقیت آمیز با سطوح لیپوزوم تعاملات الکترواستاتیک برقرار نموده و وجود اختلاف در سطوح پوشش مورد استفاده در ساختار نانولیپوزوم، تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر اندازه ذرات، پایداری و راندمان درون‌پوشانی خواهد داشت. ارزیابی پایداری فیزیکی

- antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1):552-561.
16. Ohtake, S., Schebor, C., Palecek, S.P., de Pablo, J.J. 2005. Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1713(1): 57-64.
17. Ovissipour, M. R., Abedian, A.M., Motamed Zadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shayari, H. 2013. Products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40(12): 3680-3692.
18. Ramezanzade, L., Hosseini, S. F., Nikkhah, M. 2018. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234(2): 220-229.
19. 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 method. *Food Chemistry*, 135(4): 2761-70.
20. Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients*, 3(9): 765-791.
21. 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.
22. Stark, B., Pabst, G., Prassl, R. 2010. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 41(3-4): 546-55.
23. Wu, J., Zhao, L., Xu, X., Bertrand, N., Choi, W. I., Yameen, B., Shi, J., Shah, V., Mulvale, M. and Maclean, J. L. 2015. Hydrophobic cysteine poly (disulfide)-based redox-hypersensitive nanoparticle platform for cancer theranostics. *Angewandte Chemie*, 54(32): 9350-9355.
24. Yan L., Crayton S.H., Thawani J. P., Amir shaghghi, A., Tsourkas, A., Cheng, Z. pH-responsive drug-delivery platform based on glycol chitosan-coated liposomes, *Small*, 11 (37): 4870-4874
- hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38(6): 28-39.
6. Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3): 976-983.
7. Gómez-Guillén, M.C., López-Caballero, M.E., Alemán, A.López de Lacey, A., Giménez, B., Montero, P. 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*, In: Le Bihan, E., ed. Transworld Research Network: Kerala, India, pp. 89-115.
8. Hasani, S., Ojagh, S. M., Ghorbani, M. 2018. Nanoencapsulation of lemon essential oil in Chitosan-Hicap system. Part 1: Study on its physical and structural characteristics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115(8): 143-151.
9. Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., Ghavi, F. F. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chemistry*, 163(3): 1490-1495.
10. Hosseini, S.F., Ramezanzade, L., Nikkhah, M. 2017. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105 (5): 1455-1463.
11. 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.
12. Li, Z. 2014. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes, Master of Science Thesis, The University of Dalhousie, Halifax, Canada.
13. Li, Z., Paulson, A. T., Gill, T. A. 2015. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19:733-743.
14. Liu, W., Ye, A., Liu, C., Liu, W., Singh, H. 2011. Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Research International*, 48(2): 499-506.
15. Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Karra-Châabouni, M. 2013. ACE inhibitory and



mitoxantrone liposomes. *International Journal of Nanomedicine*, 5(1): 407–416.

25. Zhuang, J., Ping, Q., Song, Y., Qi, J., Cui, Z. 2010. Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of

(Original Research Paper)  
**The Effect of Freezing/thawing and Freeze-drying / Rehydration Processes on the Physical Stability of Nano-Liposomes Containing the Bioactive Peptides**

Seyyed Mahdi Ojagh<sup>1\*</sup>, Shirin Hasani<sup>2</sup>, Maryam Hasani<sup>3</sup>

1-Associate Professor, Department of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2-Ph.D. Graduated of Sea Food Processing, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood, Iran.

Received: 11/03/2019

Accepted: 28/09/2019

**Abstract**

In recent years, the aquatic waste as a source of bioactive peptides has been considered by many researchers. Bioactive peptides require protective methods to increase physical stability and, controlled release and optimize 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 of common carp (*Cyprinus carpio*) with separating fractions of peptide in range of 3 kDa to 30 kDa in chitosan coating (0.5%, 1% w/v) by the alkalase enzyme. The results showed that chitosan coating greatly improved the stability of nano-liposomes. The average particle size was in the range of 333.9- 533.9 nm with a zeta potential of -54.03 to +46.3 and a poly dispersity index (PDI) of 0.2- 0.54 in nano-liposomes. The Encapsulation Efficiency (EE%) values were significantly influenced by changes in the concentration of chitosan and the maximum EE% ( $72.57 \pm 0.51$ ) was observed in the nano-liposome containing peptide with 3 kDa fractions coated with 1% chitosan. Study on the invitro releasing rate of the peptide showed the effect of the coating on the slower release and peptide stability in nano-liposomes. Physical stability evaluation determined a faster release of the peptide from the liposomes after freezing/thawing and freeze-drying / rehydration processes. The results of long-term storage of nano-liposomes at temperatures of 4 and 20 ° C indicated that chitosan coating increased the stability of nano-liposomes by adding membrane thickness and increasing repulsion between the particles. 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 bioactive potential in food and drug industry.

**Keywords:** Bioactive Peptide, Nano-liposome, Chitosan, Physical Stability, Alkalase, Release.

---

\*Corresponding Author: [Mahdi\\_ojagh@yahoo.com](mailto:Mahdi_ojagh@yahoo.com)