



اثر دما و زمان نگهداری بر فعالیت زیستی و پایداری فیزیکوشیمیایی نانوزیکول‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده زنبور

عسل

عاطفه مقصدلو*^۱، علیرضا صادقی ماهونک^۲، حسین محب‌الدینی^۳

۱- پژوهشگر پسادکتر، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران و ۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی گلستان، گرگان.

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۱

کلمات کلیدی:

نانوزیکول‌ها،

پروتئین هیدرولیز شده،

گرده زنبور عسل،

فعالیت زیستی،

پایداری

DOI: 10.22034/FSCT.20.142. 31
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.3.3

* مسئول مکاتبات:

Atefe.maqsoudlou@gmail.com

در این پژوهش، اثر دما و زمان نگهداری بر فعالیت زیستی و پایداری فیزیکوشیمیایی نانوزیکول‌های (لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها) حاوی پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده زنبور عسل حاصل از آنزیم آلکالاز و پپسین ارزیابی شد. از کیتوزان ۰/۲ درصد برای پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها استفاده گردید. قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن، قدرت مهار آنزیم مبدل آنژیوتنژین (ACE)، اندازه ذرات، شاخص بس‌پاشیدگی، پتانسیل زتا، بازده ریزپوشانی و میزان رهایش پروتئین‌های هیدرولیز شده از نانوزیکول‌ها در مدت ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. نتایج DLS نشان داد اندازه نانوزیکول‌ها با بارگیری با پروتئین هیدرولیز شده و پوشش‌دهی با کیتوزان افزایش معنی‌دار یافت ($P < 0.05$). نانولیپوزوم‌های حاوی پوشش کیتوزان بیشترین مقدار PDI (۰/۳۸۹) را داشتند. پتانسیل‌زتای نانوزیکول‌ها با پوشش‌دهی با کیتوزان، به بیشترین مقدار (۲۴/۳۲ میلی‌ولت) رسید. نانولیپوزوم‌های حاوی پوشش کیتوزان بیشترین بازده ریزپوشانی (۹۳/۰۸ درصد) را داشتند. بعد از ۲۸ روز اندازه نانوزیکول‌های با پوشش و بدون پوشش، ۲ تا ۲۶ برابر افزایش یافتند. میزان بازده ریزپوشانی نانولیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های بدون پوشش به ترتیب کمترین و بیشترین کاهش را نشان دادند ($P < 0.05$). مقادیر فاکتورهای اندازه‌گیری شده در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به طور معنی‌داری کمتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود ($P < 0.05$). با بارگذاری پروتئین‌های هیدرولیز شده در نانوزیکول‌ها و پوشش‌دهی آنها با کیتوزان از کاهش فعالیت ضداکسایشی‌شان در طول مدت ۲۸ روز نگهداری جلوگیری شد. میزان فعالیت مهار ACE در نانولیپوزوم‌ها به طور معنی‌داری کمتر از نانولیپوزوم‌ها بود ($P < 0.05$). بعد از گذشت ۲۸ روز در فعالیت مهار ACE هیدرولیز شده‌های بارگذاری شده در نانولیپوزوم‌های بدون پوشش کیتوزان کاهش جزئی مشاهده گردید. این یافته‌ها برای طراحی و توسعه غذاهای سلامتی‌بخش حاوی پروتئین هیدرولیز شده از اهمیت بالایی برخوردار است.

۱- مقدمه

بیشتری نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نشان دادند [۵]. حسنی و همکاران (۲۰۱۹)، اعلام کردند کیتوزان تا حد زیادی سبب پایداری فیزیکوشیمیایی و فعالیت زیستی و همچنین حفظ حداکثر بازده ریزپوشانی در نانولیپوزوم حامل پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور توسط آنزیم آلکالاز گردید [۶]. فولمر کورئا و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند میانگین اندازه ذرات، فعالیت ضداکسایشی و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با وی پروتئین گوسفندی هیدرولیز شده بعد از ۳۰ روز در مقدار بهینه خود حفظ شدند [۷]. پول و یگانه (۲۰۲۲) گزارش کردند میانگین اندازه ذرات و شاخص پراکنندگی ذرات نانولیپوزوم حاوی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز ضایعات میگو به ترتیب از ۲۲۸/۹ تا ۴۳۶/۷ نانومتر و ۰/۳۸۹ تا ۰/۴۵۳ متغیر بود. بازده ریزپوشانی و فعالیت ضداکسایشی با افزودن کیتوزان به سطح نانولیپوزوم‌ها بهبود یافت [۸]. یوسفی و همکاران (۲۰۲۱)، پروتئین‌های سویا را در نانوحامل‌های لیپوزومی بارگذاری کردند. فرآیند ریزپوشانی به کمک اولتراسوند منجر به کاهش فعالیت ضداکسایشی پپتیدهای به دام افتاده و افت پایداری فیزیکوشیمیایی نانوزیکول‌ها نگردید [۹]. علیرغم پژوهش‌های انجام شده در مورد ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال، تا کنون در مورد ریزپوشانی پروتئین‌گرده زنبورعسل، به جز میکروانکپسولاسیون آن با مالتودکسترین و وی پروتئین و بررسی ساختار و پایداری آن [۱۰] پژوهش دیگری انجام نشده است. بنابراین در این پژوهش، اثر دما و زمان نگهداری بر ویژگی ضداکسایشی و بازدارندگی ACE و پایداری فیزیکوشیمیایی نانوزیکول‌های (لیپوزوم و نیوزوم) حاوی پروتئین هیدرولیز شده ی‌گرده گل با آنزیم آلکالاز و پپسین مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

در این تحقیق نمونه‌های گرده زنبور عسل از یک زنبورستان واقع در منطقه طبیعی حفاظت‌شده استان اردبیل تحت نظارت موسسه تحقیقات علوم دامی ایران تهیه شد. نمونه‌های گرده زنبور عسل

پپتیدهای زیست‌فعال ترکیباتی سلامتی بخش، ایمن، با وزن مولکولی کم، فعالیت بالا و جذب آسان هستند. از ویژگی‌های این پپتیدها می‌توان به قابلیت اتصال به مواد معدنی، ضد میکروبی، ضد اکسایشی، ضد لخته‌شدن خون، کاهش کلسترول خون، ضد فشار خون، ضد آلرژی‌زایی و بهبود زیست دسترسی و ضد سرطانی اشاره کرد [۱]. گرده گل که توسط زنبور عسل جمع آوری می‌شود، با دارا بودن مقدار ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین، به عنوان یک منبع مهم پروتئینی به منظور تولید پپتیدهای زیست-فعال در نظر گرفته می‌شود [۲]. برخی از ترکیبات زیست‌فعال ممکن است در حین انتقال از سیستم گوارشی و تحت تاثیر شرایط اسیدی یا آنزیم‌های موجود دچار تخریب شیمیایی شوند، بنابراین طراحی سامانه‌های رسانش با قابلیت حفظ، بهبود پایداری و رهایش هدفمند این ترکیبات ضروری است [۳]. لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها به علت استفاده از ترکیبات و اجزای خوراکی در فرمولاسیون تولید خود، یکی از رایج‌ترین سامانه‌های رسانش برای ریزپوشانی، حفاظت و رهایش ترکیبات زیست‌فعال هستند [۴]. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های^۱ کروی هستند که در آنها مولکول‌های فسفولیپید به صورت صفحاتی منظم می‌شوند و با پیوستن دم آب‌گریز فسفولیپیدها به همدیگر، یک غشای دولایه-ای تشکیل می‌دهند که به طور هم‌زمان قابلیت حمل هر دو نوع مواد آب‌دوست (در داخل وزیکول) و مواد آب‌گریز (در داخل غشای دولایه‌ای) را دارند. نیوزوم‌ها وزیکول‌های سورفکتانت-های غیریونی با ساختارهای میکروسکوپی لایه لایه هستند که از هیدراتاسیون سورفکتانت‌های غیریونی با کسترویل یا بدون کسترویل در محیط آبی تهیه می‌شوند و از سیستم‌های مهم دارو رسانی می‌باشند [۴]. پژوهش‌های زیادی در زمینه ریزپوشانی پپتیدهای زیست‌فعال، و بررسی پایداری آنها انجام شده است. سرابندی و همکاران (۲۰۱۹)، کازئین هیدرولیز شده با آلکالاز و پانکراتین را با استفاده از نانولیپوزوم ریزپوشانی کردند. میانگین اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی، بازده ریزپوشانی و پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها در محدوده‌ی مناسبی بود. نمونه‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد پایداری و بازده ریزپوشانی

1 -Vesicles

سانتیگراد قرار گرفتند. سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۶۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوبات حاصل با ۲۰ میلی لیتر آب مقطر شستشو و توسط خشک‌کن انجمادی خشک شدند [۱۱].

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده‌ی گل

هیدرولیز پروتئین گرده گل طبق روش مقصودلو و همکاران (۲۰۱۸) و مقصودلو و همکاران (۲۰۱۹) انجام پذیرفت. بر این اساس، پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده گل، با استفاده از آلکالاز ۱/۵ درصد و مدت زمان هیدرولیز آنزیمی ۴ ساعت (در pH ۸ و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد) و پپسین ۲ درصد و مدت زمان هیدرولیز آنزیمی ۲/۵ ساعت (در pH ۳ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) در انکوباتور شیکردار تهیه شد. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف گردید. سپس در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۴۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی انجام شد و رومانده پس از جمع‌آوری با خشک‌کن انجمادی خشک گردید [۱۱ و ۱۲].

۲-۲-۱- تعیین درجه هیدرولیز

میزان درجه هیدرولیز بر اساس روش هوپل و مریت (۱۹۹۴) اندازه گیری شد. سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده گرده گل و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴ مولار) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس، مخلوط با دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین موجود در رومانده حاوی تری کلرواستیک اسید با روش بردفورد تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از معادله ۲-۱ تعیین شد [۴۳]:

$$\text{پروتئین} / (\text{رومانده} + \text{TCA}) \text{ پروتئین} = \text{درجه هیدرولیز (درصد)}$$

$$(\text{معادله ۲-۱}) \times 100 \text{ (سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده)}$$

۲-۲-۲- آزمون حلالیت

برای تعیین حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده ۲۰۰ میلی‌گرم پروتئین هیدرولیز شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و pH

طی ۳۰ روز مختلف توسط زنبورداران محلی از ماه خرداد تا شهریور ۱۳۹۹ جمع‌آوری شد.

۱-۱- دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH)^۱، پتاسیم فری سیانید^۲، اسید تری کلرواستیک^۳ (TCA)، کلرید آهن^۴، HHL و آنزیم مبدل آنژیوتانسین^۵ (ACE)، از ریه خرگوش) از شرکت سیگما (سنت لوئیس، MO) خریداری شده است.

آنزیم آلکالاز (پروتئاز سرینی از *Bacillus licheniformis*)، آنزیم پپسین و پانکراتین، لسیتین سویا، توئین ۸۰، اسپن ۶۰، کلسترول و کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط ۱۹۰ تا ۳۱۰ کیلو دالتون) و درجه داستیلایسیون بالای ۷۵ درصد) از شرکت سیگما خریداری شد. تمامی مواد ذکر شده و مواد شیمیایی دیگر مورد استفاده در این پژوهش دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بودند.

۲-۱- تولید ایزوله پروتئین گرده گل

ابتدا مقادیر پروتئین، رطوبت و خاکستر گرده گل بر اساس روش استاندارد AOAC اندازه گیری شدند [۴۲]. برای تعیین پروتئین کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با به کارگیری کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابترم، ۳۰-FX118) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آون ۱۱۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت به دست آمد. بر این اساس گرده‌ی مورد استفاده حاوی ۵/۸ درصد رطوبت، ۲۱/۲ درصد پروتئین و ۲/۸ درصد خاکستر بود. گرده‌ی گل بر اساس روش مقصودلو و همکاران (۲۰۱۸)، با استفاده از هگزان (با نسبت ۱ به ۳) به مدت ۲۴ ساعت در شیکر اوربیتالی چربی زدایی گردید. پودر چربی‌گیری شده به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر مخلوط شده و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با سدیم هیدروکسید انرمال pH به ۱۰/۵ رسانده شد و یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد مخلوط شدند. سپس در ۴ درجه سانتیگراد با دور ۶۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رومانده حاصل جداسازی شده و با اسیدکلریدریک ۱ نرمال pH به ۳/۴ رسانده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه

- 1- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- 2- Potassium ferricyanide
- 3- Trichloroacetic acid
- 4- N-hippuryl-L-histidyl-L-leucine hydrate
- 5- Angiotensin-converting enzyme

هیدراتاسیون فیلم نازک با ۱۰ میلی لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده انجام شد. سپس کاهش اندازه و تولید نانوزیکولهای یکنواخت با استفاده از فراصوت پروبی (UP200H Hielscher, Germany) در ۱۰ چرخه (۱ دقیقه روشن و ۱ دقیقه خاموش) با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و در حمام یخ انجام شد. بمنظور پوشش-دهی لیپوزوم از کیتوزان استفاده شد. کیتوزان در غلظت (۰/۲ درصد W/V) در محلول ۰/۰۱ اسیداستیک تهیه شد و به آرامی و بصورت قطره‌ای همراه با هم زدن (۳۰۰ دور در دقیقه)، به محلول نانولیپوزوم اضافه گردید [۵ و ۱۳]. در نهایت تیمارهای آماده شده برای ارزیابی در این پژوهش به شرح زیر نامگذاری شدند (جدول ۱):

مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال روی ۱ تا ۱۲ تنظیم شد. محلول در ۱۰۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ - شد. سپس مقدار پروتئین موجود در محلول رویی با استفاده از روش بردفورد تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین محلول بر پروتئین کل نمونه تعیین گردید [۵].

۳-۲ آماده سازی نانوزیکولها

تولید نانولیپوزومها و نانونیوزومها با استفاده از روش هیدراتاسیون فیلم نازک طبق روش سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) و دیسکاوا و همکاران (۲۰۱۸) با کمی تغییرات انجام شد. بمنظور تولید نانولیپوزومها، انحلال کامل ۰/۰۹ گرم لسیتین، ۰/۰۱ گرم کلسترول و ۰/۰۲ گرم توئین ۸۰ در ۱۰ میلی لیتر اتانول خالص به مدت ۳۰ دقیقه با همزن مغناطیسی انجام شد. بمنظور تولید نیوزوم، ۵۰ میلی گرم توئین ۸۰ و ۵۰ میلی گرم سورفاکتانت اسپن ۶۰ مخلوط شده و در ۱۰ میلی لیتر اتانول خالص حل شدند. فرآیند تبخیر حلال و تشکیل لایه نازک با استفاده از اواپراتور چرخشی در ۶۰ درجه سانتی گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه انجام گردید. سپس بالن ته گرد به مدت ۱۶ ساعت در دسیکاتور به منظور حذف کامل حلال قرار گرفت.

Table1. Nanovesicle samples

مخفف	نام تیمار
N-PBS	۱ نیوزوم فاقد پروتئین هیدرولیز شده
N-HP	۲ نیوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پپسین
N-AH	۳ نیوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز
L-PBS	۴ لیپوزوم فاقد پروتئین هیدرولیز شده
L-HP	۵ لیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پپسین
L-AH	۶ لیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز
CH-L-HP	۷ لیپوزوم پوشش داده شده با کیتوزان ۰/۲ درصد حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پپسین
CH-L-AH	۸ لیپوزوم پوشش داده شده با کیتوزان ۰/۲ درصد حاوی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز

۲-۴ تعیین اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا

پس از رقیق سازی نمونه (با نسبت ۱:۱۰۰ با آب مقطر)، میانگین اندازه ذرات، شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا (بار سطحی را در سطح مشترک قطرات پراکنده در محلول آبی) نانولیپوزومها و نانونیوزومهای تولیدی، با استفاده از دستگاه^۱ DLS (پراکندگی نور دینامیک) مدل (Horiba SZ-100 V2.20, UK) اندازه گیری شد. Z-average به عنوان قطر هیدرودینامیک وزیکولها ارائه گردید. کلیه آزمایشها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انجام شد [۵].

۲-۵ تعیین بازده ریزپوشانی

بازده ریز پوشانی بر اساس روش سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) محاسبه گردید. ۲ میلی لیتر از نمونه های نانو ریزپوشانی شده به یک فیلتر آمیکون با وزن مولکولی ۳۰ کیلو دالتون (molecular weight cutoff = 30 kDa, Millipore, UK) منتقل گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۵۰۰g سانتریفیوژ شد. غلظت پروتئین موجود در محلول عبور داده شده از فیلتر (پپتیدهای آزاد و یا ریزپوشانی نشده) طبق روش برادفورد تعیین گردید. از پروتئین بویین سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. معادله خط استاندارد به صورت زیر به دست آمد: (معادله ۲-۲)

$$Y = 0.1216X + 0.4353 \quad R^2 = 0.97$$

(معادله ۲-۲)

در نهایت بازده ریزپوشانی از طریق نسبت غلظت پروتئین بارگذاری شده درون نانولیپوزومها و نانونیوزومها به کل پروتئین موجود محاسبه شد [۵].

۲-۶ اثر شرایط نگهداری برویژگی های نانوذرات

۲-۶-۱ اثر نگهداری در دمای اتاق و دمای ۴ درجه سانتیگراد بر اندازه ذرات و بازده ریزپوشانی و میزان رهایش

به منظور انجام این آزمون، بر اساس روش سرابندی و همکاران (۲۰۱۹)، ۲ میلی لیتر از هر نمونه به درون ویال شیشه ای منتقل گردید و در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتیگراد به ترتیب در ۴ درجه سانتیگراد و محیط به مدت ۲۸ روز نگهداری شدند و سپس اندازه ذرات و بازده ریزپوشانی بر اساس روش های ذکر شده در بالا اندازه گیری شد. میزان رهایش پپتیدها پس از طی ۱، ۳، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بر اساس روش برادفورد تعیین گردید و به صورت درصد گزارش گردید [۵، ۱۴].

۲-۶-۲ اثر نگهداری بر ویژگی ضد اکسایشی نانوذرات حامل پروتئین های هیدرولیز شده

به منظور تعیین ویژگی های ضد اکسایشی نانولیپوزومها و نانونیوزومهای حامل پروتئین های هیدرولیز شده و همچنین پروتئین هیدرولیز شده به تنهایی، در روز صفر و روز بیست و هشتم نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد، هر نمونه در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا رهایش کامل اتفاق بیفتد. سپس ویژگی ضد اکسایشی اندازه گیری شد [۱۴].

۲-۶-۲-۱ ویژگی مهار رادیکال آزاد DPPH

پس از مخلوط کردن نمونه های نانولیپوزومی و نانونیوزومی حامل پروتئین های هیدرولیز شده و همچنین پروتئین هیدرولیز شده، با اتانول ۹۹/۵ درصد و محلول DPPH اتانولی با غلظت ۰/۰۲ درصد، مخلوط بهم زده شده و ۶۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شد. کاهش میزان رادیکال DPPH در ۵۱۷ نانومتر بررسی گردید و میزان مهار این رادیکال بر اساس معادله ۲-۳ به صورت درصد بیان شد [۱۲]:

$$100 \times (\text{جذب کنترل} / \text{جذب نمونه}) \quad (\text{معادله ۲-۳})$$

DPPH جذب کنترل)) = درصد مهار رادیکال

(معادله ۲-۴) $100 \times$ (جذب کنترل به ازای دقیقه / جذب نمونه به ازای دقیقه - جذب کنترل به ازای دقیقه) = درصد بازدارندگی

که در نمونه‌ی کنترل تمام مراحل مانند نمونه اصلی انجام شد، اما به جای نمونه اصلی، آب مقطر استفاده شد. همچنین در این آزمایش از BHT^1 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۲-۶-۲-۲ قدرت احیا کنندگی یون آهن

۳- نتایج و بحث

۳-۱-۳ درجه هیدرولیز و حلالیت پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده

گل

میزان درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده گل توسط آنزیم آلکالاز و پپسین به ترتیب $6/5 \pm 56/34$ درصد $2/4 \pm 37/14$ درصد محاسبه شد. بالاتر بودن درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز نسبت به پپسین دو دلیل اصلی داشت؛ بالاتر بودن مدت زمان هیدرولیز آنزیمی آلکالاز و همچنین عملکرد غیراختصاصی آنزیم آلکالاز نسبت به آنزیم پپسین در شکستن پیوندهای پپتیدی. افزایش زمان فرآیند موجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد. در نتیجه شکست بیشتر باندهای پپتیدی، طول زنجیره پپتیدها کوچکتر، توزیع وزن مولکولی آنها کاهش و مقدار اسیدهای آمینه آزاد افزایش می‌یابد [۵]. آلکالاز به عنوان یک پروتئاز سرینی، در جایگاه فعال خود دارای اسیدی آمینه‌های آسپاراژین، هیستیدین و سرین می‌باشد. غیر اختصاصی عمل کردن آنزیم آلکالاز در حمله به باندهای آمیدی باعث افزایش بازدهی آن در پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهایی با طول زنجیره‌های مختلف می‌گردد. از طرفی جایگاه فعال آنزیم پپسین حاوی گروه تیول (SH) است و آنزیم پپسین تنها باندهای مجاور اسید آمینه‌ی تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین را می‌شکند و زنجیرهای پپتیدی محدودتری تولید می‌گردد [۱۱ و ۱۲].

همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، پروتئین هیدرولیز نشده گرده گل بیشترین افت حلالیت را در pH های اسیدی (در حدود ۳-۵) نشان داد. نتایج حاکی از رسوب پرتئین‌ها و پپتیدهای اولیه با وزن مولکولی بالا در نقطه ایزوالکتریک است. اما با افزایش pH محیط به ۶، به طور قابل توجهی بر میزان حلالیت ایزوله پروتئینی افزوده شد ($P < 0.05$). در pH های بالاتر از آن نیز حلالیت در بالاترین حد باقی ماند. مظلومی و همکاران (۲۰۲۰) و سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) نیز به نتایج

جهت اندازه گیری قدرت نانولیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌های حامل پروتئین‌های هیدرولیز شده و پروتئین هیدرولیز شده، در احیای آهن III از روش مقصودلو و همکاران (۲۰۱۹) استفاده شد. برای این منظور ۱ میلی لیتر از هر کدام از نمونه‌ها $2/5$ میلی لیتر بافر فسفات $0/2$ مولار (pH ۶/۶) و $2/5$ از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید. مخلوط در 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شد، سپس $2/5$ میلی لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد (وزنی - حجمی) به آن اضافه شد. مخلوط در $g \times 1650 \times 10$ برای 10 دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت $2/5$ میلی لیتر از محلول سوپرناتانت با $2/5$ میلی لیتر آب مقطر و $0/5$ میلی لیتر از محلول $0/1$ درصد وزنی (وزنی - حجمی) کلرید آهن مخلوط شد. بعد از 10 دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در 700 نانومتر قرائت شد. افزایش جذب مخلوط، بیانگر افزایش قدرت احیا کنندگی آن بود [۱۲].

۲-۶-۳ بررسی ویژگی مهار ACE

این آزمون بر طبق روش شرح داده شده توسط جامدار و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد [۱۵]. در این روش ۱ میلی لیتر از ترکیب N-(۳-فوریل)آکریلویل (L-فنیل آلانیل-گلیسیل-گلیسین^۲ (حل شده در 50 میکرولیتر بافر Tris-HCl, pH ۷/۵) با 20 میکرولیتر از ترکیب ACE و 200 میکرولیتر از نمونه‌های نانولیپوزومی و نانو نیوزومی حامل پروتئین‌های هیدرولیز شده و پروتئین هیدرولیز شده مخلوط با بافر Tris-HCl، به طور مناسب با یکدیگر مخلوط شده و شدت کاهش جذب در طول موج 345 نانو متر به مدت 2 دقیقه در دمای اتاق گزارش شد. درصد بازدارندگی آنزیم ACE، از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید: (معادله ۲-۴)

1- Butylated hydroxytoluene

2- N-[3-(2-Furyl) acryloyl]- L-phenylalanyl-glycyl-glycine

همکاران، ۲۰۱۹)؛ پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از نوعی ماهی رنگین کمان^۱ (رمضان زاده و همکاران، ۲۰۱۷)، پروتئین آب پنیر (موهان و همکاران، ۲۰۱۶) نوعی داروی پروتئینی (بارانی و همکاران، ۲۰۲۰) نیز گزارش شده است [۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸]. از طرفی پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان بطور معنی‌داری سبب افزایش اندازه ذرات گردید. سطح این تغییرات تحت تأثیر نوع پروتئین هیدرولیز شده قرار گرفت. برای نمونه همانطور که در جدول ۲ مشخص است، پوشش کیتوزان ۲ درصد برای نانولیپوزوم حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز و پپسین، به طور معنی‌داری اندازه ذرات را به ترتیب از ۹۰/۴۹ و ۸۰/۷۱ نانومتر به ۱۷۹/۷۹ نانومتر و ۱۶۰/۳۴ نانومتر افزایش داد ($P < 0.05$). افزایش اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها در نتیجه حضور لایه کیتوزان بروی غشای تک لایه لیپیدی بوده است. این نتیجه با نتایج بارانی و همکاران (۲۰۲۰) و مظلومی و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۱۸، ۱۴]. گارسیا مونرکو و همکاران (۲۰۲۰) نیز اعلام کردند استفاده از ترکیباتی مانند پلی‌اتیلن گلیکول و کیتوزان برای پوشش‌دهی نانوزیکول‌ها باعث افزایش پایداری سیستم و افزایش اندازه آنها شد [۱۹]. اما در این زمینه حسنی و همکاران (۲۰۱۹) و بنگ و همکاران (۲۰۱۱)، اعلام کردند نانولیپوزوم‌های حامل پپتید پوشش‌دهی شده با کیتوزان، اندازه کوچکتری نسبت به نانولیپوزوم‌های فاقد پوشش داشتند. آنها علت کاهش اندازه ذرات نانولیپوزومی با افزایش غلظت پوشش کیتوزان را نیروی انقباض ناشی از کشش یونی بین ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم و کیتوزان بیان کردند [۶ و ۲۰]. نانوزیکول‌های حامل پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی با پپسین نسبت به نانوزیکول‌های حامل پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز، اندازه ذرات کوچکتری داشتند (جدول ۲). به دلیل تفاوت در شرایط هیدرولیز و همچنین نوع آمینواسیدهای موجود در جایگاه فعال آنزیم‌های پپسین و آلکالاز، توزیع وزن مولکولی در هیدرولیز شده‌ها متفاوت بود [۱۲]. بر این اساس علت کوچکتر بودن نانوذرات بارگذاری شده با پپتید-های حاصل از پپسین را شاید بتوان به جای‌گیری آسان‌تر پپتیدهای با اندازه یکنواخت‌تر در ساختار نانولیپوزوم و

مشابهی دست یافتند [۱۴ و ۵]. حلالیت هیدرولیز شده‌ها در نقطه ایزوالکتریک به شکل قابل توجهی افزایش یافت. دلیل این مسئله این است که، با افزایش انجام عمل هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی پپتیدها و تولید آمینواسیدها و افزایش گروه‌های باردار، حساسیت به pH کم شده و حلالیت در محدوده وسیعی از pH حفظ می‌شود. همچنین، هیدرولیز آنزیمی با شکست توده‌های پروتئینی نامحلول، تولید پپتیدهای کوچک‌تر، افزایش دسترسی گروه‌های هیدروفیل و تسهیل واکنش آمینواسیدهای هیدروفیل با محیط آبی موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌شود [۲، ۵ و ۱۱].

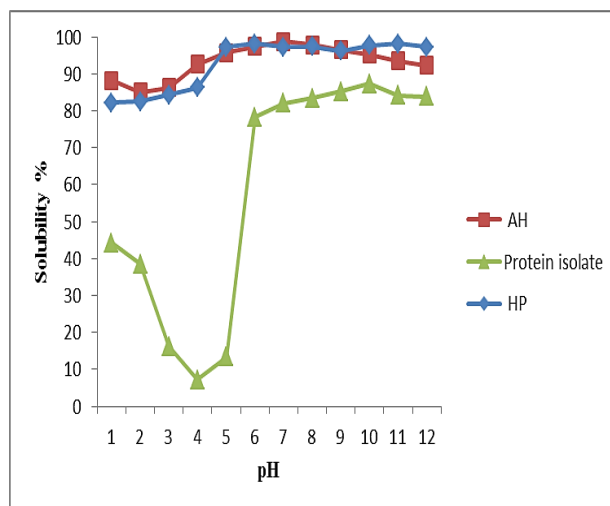


Fig. 1. Solubility of protein hydrolyzates in different pH

۳-۲ تعیین اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا

در این پژوهش، تأثیر نوع پروتئین هیدرولیز شده بر میانگین اندازه ذرات و شاخص بس‌پاشیدگی نانولیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که اندازه نانولیپوزوم‌ها پس از بارگیری با پروتئین هیدرولیز شده افزایش معنی‌داری یافت و تحت تأثیر نوع پروتئین هیدرولیز شده قرار گرفت. در مورد نانولیپوزوم‌های بدون پوشش کیتوزان نیز، افزایش اندازه با بارگیری توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در پژوهش‌های پیشین، افزایش در اندازه ذرات نانوحامل‌ها پس از بارگیری با کازئین (سرابندی و

درصد حاوی پروتئین‌های هیدرولیز شده با آلکالاز؛ شاخص بس پاشیدگی بطور معنی‌داری از ۰/۲۸۵ به ۰/۳۸۹ افزایش یافت ($P < 0.05$) که با نتایج سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [۵]. این تغییرات نشان دهنده بی‌ثباتی و توزیع اندازه ذرات ناهمگن و غیریکنواخت به دلیل تجمع و چسبندگی ذرات به یکدیگر، پس از بارگذاری شدن نانوزیکول‌ها و همچنین پوشش‌دهی آنها است [۱۴]. در پژوهش لی و همکاران (۲۰۱۵) بی‌ثباتی مشابهی در نانولیپوزوم‌های بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز‌شده حاصل از ماهی قزل‌آلا پس از پوشش‌دهی با غلظت‌های مختلف کیتوزان مشاهده گردید [۲۷]. اما گارسیا مونریکا و همکاران (۲۰۲۰) که برای پوشش‌دهی نانوزیکول‌ها از پلی‌اتیلن‌گلایکول استفاده کرده بودند، اعلام داشتند استفاده از این پوشش باعث کاهش شاخص بس پاشیدگی گردید [۱۹].

تعیین پتانسیل زتا روش معمول برای تعیین خصوصیات الکترواستاتیک لیپوزوم و نیوزوم است و شاخص مفیدی از بار سطحی ذرات و نیروهای دافعه کلئیدی میان آنها و پایداری فیزیکی سیستم‌های نانوحامل می‌باشد. مقادیر بالای پتانسیل زتا با افزایش واکنش‌های دافعه و کاهش بهم چسبیدن ذرات لیپوزومی و نیوزومی موجب پایداری بیشتر آنها می‌شود [۲۸]. همانطور که در جدول ۴-۱ قابل مشاهده است، پتانسیل زتای نانونیوزوم‌ها پس از بارگذاری با پروتئین‌های هیدرولیز‌شده با پیسین به طور معنی‌داری از ۱۷/۷۸- میلی‌ولت به ۱۳/۸- میلی‌ولت تغییر پیدا کرد ($P < 0.05$). مطالعات قبلی طیف وسیعی از مقادیر پتانسیل زتا را برای نانوذرات لیپوزومی و نیوزومی حامل پپتید با مقادیر خیلی کم از جمله ۵/۵- میلی‌ولت (رزا زوارز و همکاران، ۲۰۱۴) و مقادیر بالا از جمله ۴۰/۸- میلی‌ولت (ماسکوئرا و همکاران، ۲۰۱۴) گزارش کردند [۲۳ و ۲۹]. این طیف گسترده از پتانسیل زتا را می‌توان به تفاوت در نوع، ترکیب و خلوص مواد مورد استفاده (به ویژه فسفولیپید در مورد لیپوزوم)، و همچنین تفاوت در شرایط محلول (مانند pH و قدرت یونی) نسبت داد. بطور کلی مشخص شده است که استفاده از سورفاکتانت‌های غیریونی در ساختار نانوزیکول‌ها، به دلیل ماهیت دو قطبی گروه‌های اتوکسی موجود در آنها باعث منفی شدن پتانسیل زتا می‌گردند [۲۶]. در پژوهش حاضر، مقدار

نانونیوزوم و بهبود نظم لایه وزیکولی نسبت به پپتیدهای درشت-تر و با وزن مولکولی بالاتر نسبت داد [۲۱].

از طرفی موهان و همکاران (۲۰۱۶) بیان داشتند که اندازه نانولیپوزوم‌ها با گروه آمین آزاد پپتیدها و برهمکنش بین گروه‌های عاملی هیدروکسیل پپتیدها همبستگی مثبت دارد [۱۷]. بر این اساس به دلیل شکستن تعداد بیشتری از باندهای پپتیدی توسط آلکالاز نسبت به پیسین، در محلول پپتیدی به دست آمده با آنزیم آلکالاز، گروه‌های آمینی زیادتری وجود دارد که منجر به اندازه بزرگتر نانوزیکول‌های بارگذاری شده با آن گردیده است [۲۲]. شاخص بس پاشیدگی در این پژوهش در نانوذرات نیز بین ۰/۳۸۹-۰/۲۵۸ به دست آمد (جدول ۴-۱). مقدار کم این شاخص بر یکنواختی و همگن بودن اندازه ذرات در سامانه دلالت دارد [۲۳]. میزان شاخص بس پاشیدگی تا حد زیادی به مقدار سورفاکتانت‌ها و نسبت آنها بستگی دارد. به عنوان مثال توئین ۸۰ با دارا بودن HLB^۱ بالا، میل ترکیبی بیشتری به فاز آبی دارد؛ به طوری که تشکیل وزیکول‌های همگن را با مشکل مواجه می‌کند [۲۲]. بنابراین با به کارگیری اسپن ۶۰ در کنار توئین ۸۰ در پژوهش حاضر، تا حد زیادی تعادل برقرار گردید که با نتایج تاوانو و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت [۲۴]. علاوه بر این اکبری و همکاران (۲۰۲۲) و رستم کلایی و همکاران (۲۰۱۹) نیز بیان داشتند، با استفاده از مخلوط‌های دوتایی سورفاکتانت‌ها (توئین و اسپن) که مقدار HLB را تنظیم می‌کند، می‌توان خواص وزیکول‌های بارگذاری شده را برای دستیابی به مقدار بهینه از نظر اندازه، شاخص بس پاشیدگی، بازده ریزپوشانی و پایداری کنترل کرد [۲۵ و ۲۶]. شاخص بس پاشیدگی در مورد نانونیوزوم‌ها، بعد از بارگذاری با پروتئین‌های هیدرولیز شده، به طور معنی‌داری از ۰/۲۵۸ به ۰/۲۷۹ و ۰/۲۸۱ (به ترتیب برای N-AH و N-HP) تغییر یافت ($P < 0.05$). به طور مشابه موهان و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند نانوذرات بارگذاری شده با پپتیدها شاخص بس پاشیدگی بالاتری نسبت به نانوذرات فاقد پروتئین هیدرولیز‌شده داشتند [۱۷]. این مسئله بیانگر این است که نانوذرات نسبت به نانوذرات بارگذاری شده به طور یکنواخت‌تری پخش شده بودند. با پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با کیتوزان ۰/۲

نانوزیکولها مرتبط است. نانوزیکولهایی که در فرمول آنها توئین ۸۰ به کار رفته شده، به دلیل وجود گروه آبدوست بزرگتر و ایجاد پیوندهای هیدروژنی بیشتری در گروه‌های عاملی پپتیدها، پتانسیل زتای پایینی دارند [۳۰]. افزایش اندازه ذرات در طول ۲۸ روز نگهداری که در شکل ۴-۲ قابل مشاهده است، نشان‌دهنده کاهش پایداری نانوپراکنش‌ها و ادغام و چسبیدن ذرات به یکدیگر است. در پژوهش حاضر مشخص شد اندازه نانوذرات لیپوزومی کوچکتر از نانوذرات نیوزومی بود. به طور مشابه رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) نیز اعلام کردند بعد از یک ماه نگهداری نانونیوزومها و نانونیوزومها در دمای یخچال، اندازه ذرات نانولیپوزومی نسبت به نانونیوزومها کمتر افزایش یافت [۳۱].

پتانسیل زتا مربوط به نانولیپوزوم ۹/۰۷- میلی ولت بود. این موضوع بدین صورت قابل توضیح است که گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا رانده می‌شود و بنابراین بار منفی افزایش و باعث دفع الکترواستاتیک ذرات می‌شود [۲۲]. در تحقیق مشابهی، میزان پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های شاهد و بارگیری شده با پروتئین هیدرولیز شده عضله و محصولات جانبی ماهی کروکر به ترتیب $-5/8$ ، $-2/2$ و $-5/5$ میلی‌ولت گزارش شد [۲۳]. پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌ها پس از بارگیری با پروتئین هیدرولیز شده به دست آمده از آنزیم‌های آلکالاز و پپسین از ۹/۰۷- میلی‌ولت به ترتیب به $-10/11$ میلی‌ولت و $4/52$ میلی‌ولت تغییر یافت ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب فسفولیپیدی و واکنش بین فسفولیپید و پپتیدهای به‌دام افتاده، بر بار سطحی لیپوزوم‌ها تاثیرگذار است. اگرچه پتانسیل زتا تحت تاثیر دیگر عوامل مانند ترکیب ذرات، محیط پراکنش، pH و قدرت یونی در محلول قرار گیرد [۲۲]. پس از پوشش‌دهی نانولیپوزوم‌ها با غلظت ۰/۲ درصد کیتوزان، پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های آلکالاز و پپسین به ترتیب از $-10/11$ میلی‌ولت به $20/21$ میلی‌ولت و از $4/52$ میلی‌ولت به $24/32$ میلی‌ولت تغییر یافت ($P < 0.05$). در این زمینه حسنی و همکاران (۲۰۱۹) پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای حاصل از آلکالاز فاقد پوشش کیتوزان و دارای پوشش کیتوزان ۰/۵ درصد را به ترتیب $-51/7$ و $+50$ میلی‌ولت گزارش کردند [۶]. حسینی و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که پتانسیل زتا ± 30 میلی‌ولت موجب پایداری نانوپراکنش‌ها از طریق دافعه الکترواستاتیک می‌شود. این مقدار از پتانسیل زتا امکان ممانعت از تشکیل توده و ادغام ذرات را فراهم می‌سازد [۲۲]. هرچند مقادیر پتانسیل زتا در پژوهش حاضر، با این مقدار فاصله دارد که احتمالاً به حضور توئین ۸۰ در فرمول

Table 2. Mean size, PDI, zeta potential, and microencapsulation efficiency of nanovesicles loaded with hydrolyzed pollen proteins

Encapsulation Efficiency (%)	Zeta-potential(mV)	PDI	Size (Z-average) (nm)	Samples				
-----	-17.87 ± 1.27	g	0.258 ± 0.02	c	119 ± 2.14	e	N-PBS	
79.1 ± 1.81	e	-13.8 ± 0.98	f	0.281 ± 0.01	b	126 ± 3.32	d	N-HP
75.3 ± 1.59	f	-17.1 ± 1.12	g	0.279 ± 0.01	b	187.5 ± 2.98	a	N-AH
-----	-9.07 ± 0.85	d	0.278 ± 0.02	b	73.116 ± 3.11	e	L-PBS	
84.6 ± 1.32	c	4.52 ± 1.19	c	0.271 ± 0.01	b	80.71 ± 4.51	f	L-HP
81.16 ± 1.83	d	-10.11 ± 0.95	e	0.285 ± 0.03	b	90.49 ± 3.24	f	L-AH
93.08 ± 2.24	a	24.32 ± 1.59	a	0.277 ± 0.01	b	160.34 ± 4.31	c	CH-L-HP
90.02 ± 1.13	b	20.21 ± 1.15	b	0.389 ± 0.02	a	179.79 ± 5.12	b	CH-L-AH

The data are shown as mean ± standard deviation. Different letters in each column show the significant difference at the level of 0.05 in Duncan's tests.

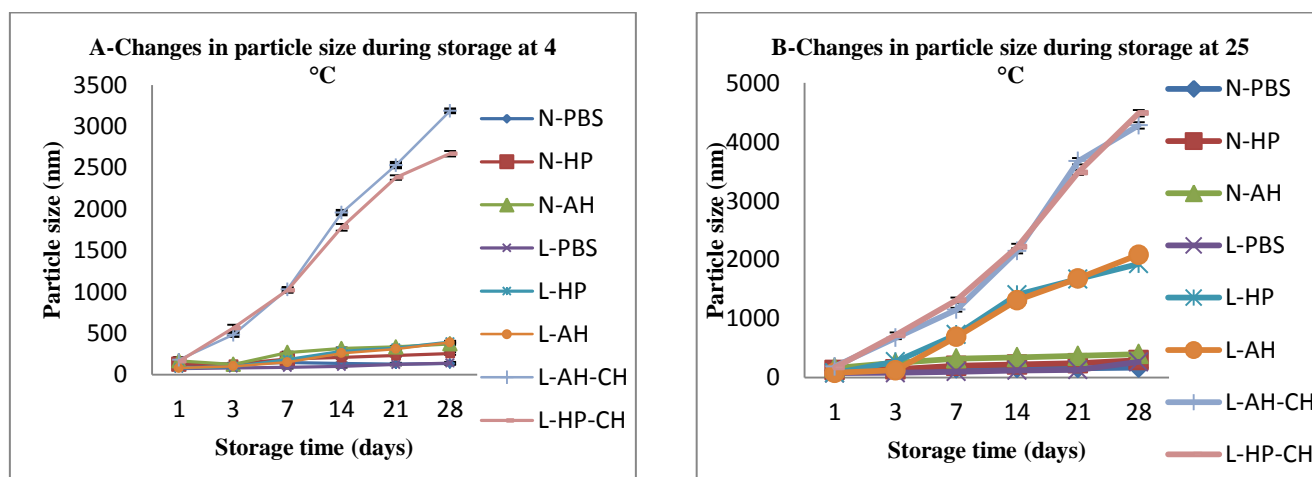


Fig 2. Changes in particle size of nanoliposomes and nanoniosomes during 28 days of storage at A) 4 °C and B) 25 °C

مانند نیوزومها و لیپوزومهای فرموله شده با لسیتین سویا، توئین ۸۰، اسپن ۶۰ و کلسترول، به منظور ریزپوشانی ترکیب ضد اکسایشی استفاده شد. فرمولاسیون بهینه با حداکثر بازده کپسولاسیون (۷۲-۷۵ درصد) نانوزیکولهایی بودند که با لسیتین و توئین ۸۰ در حضور و عدم حضور کلسترول فرموله شده بودند [۲۲]. تاوانو و همکاران (۲۰۱۱)، نیز نشان دادند که نسبت مناسب توئین ۸۰ و اسپن ۶۰ برای رهایش مناسب ترکیبات آنتی اکسیدان از نیوزومهای فرموله شده با این ترکیبات لازم است [۲۴]. در نانولپوزومهای پوشش دهی نشده نیز، نانولپوزومهای حاوی پروتئین هیدرولیز تولید شده با آنزیم پیپسین، بازده ریزپوشانی بالاتری (۸۴/۶ درصد) نسبت به پروتئین

۳-۳ تعیین بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی از اصلی ترین شاخص کارایی ساختار نانوحاملها برای حفظ و نگهداری ترکیبات فعال محسوب می شود. در این پژوهش، تأثیر نوع پروتئین هیدرولیز شده و پوشش کیتوزان بر بازده ریزپوشانی نانولپوزومها و نانونیوزومها مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). بازده ریزپوشانی نانونیوزومهای بارگیری شده با پپتیدهای حاصل از پیپسین (۷۹/۱ درصد) بیشتر از بازده ریزپوشانی نانونیوزومهای بارگیری شده با پپتیدهای حاصل از آلکالاز (۷۵/۳ درصد) بود ($P < 0.05$). به طور مشابه در پژوهشی که حسینی و همکاران (۲۰۲۰) انجام دادند، از نانوزیکولهایی

اسپن ۶۰ منجر به کاهش بازده ریزپوشانی آنها در مقایسه با نانوزیکول‌های حاوی توپین ۸۰ می‌گردد [۳۵]. علاوه بر این با حضور کلسترول زنجیره‌های لیپیدی سفت شده و کلسترول مانع از گسیخته شدن غشای لیپوزومی توسط ترکیبات فعال و افزایش بازده ریزپوشانی می‌شود [۲۲].

۳-۴- اثر شرایط نگهداری بر ویژگی‌های نانوذرات

۳-۴-۱- اثر شرایط نگهداری بر اندازه ذرات

در این پژوهش، تأثیر نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد و محیط بر پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌های بارگذاری شده با پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و پپسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که اندازه نانونیوزوم‌های بارگذاری شده با پپتیدها، بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد تقریباً ۲ برابر شد (شکل 2A). روند این تغییرات در شرایط نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تقریباً مشابه تغییرات در شرایط ۴ درجه سانتیگراد بود و اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل 2B). میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها و بارگذاری شده با پپتیدهای حاصل از پپسین و آلکالاز، بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد به ترتیب ۲ و ۵ برابر شد. اما همانطور که در شکل 2B قابل مشاهده است، اندازه نانولیپوزوم‌های فاقد پروتئین هیدرولیز شده و بارگذاری شده با پپتیدهای حاصل از پپسین و آلکالاز، بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به ترتیب ۳/۵ و ۲۴/۶۵ برابر شد که با نتایج رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) و سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) همسو بود [۵ و ۳۱]. دلایل این نتایج را می‌توان به تأثیر پپتیدهای بارگذاری شده بر کاهش پتانسیل زتا، خشی سازی بار سطح و بی‌ثباتی ذرات نسبت داد. اندازه کوچکتر و احتمالاً انرژی سطحی بالاتر نانوذرات لیپوزوم تمایل بیشتر آنها به کاهش انرژی اضافی از طریق تجمع می‌تواند علت افزایش بیشتر اندازه نانولیپوزوم‌ها نسبت به نانونیوزوم باشد [۳۶]. میانگین اندازه نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان که حاوی پپتیدهای هیدرولیز شده با آلکالاز و پپسین بودند، بعد از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد به ترتیب ۱۷/۵ و ۱۶/۵ برابر شد. همانطور که در شکل 2B مشخص

هیدرولیز تولید شده با آنزیم آلکالاز (۸۱/۱۶ درصد) داشت ($P < 0.05$). این تفاوت می‌تواند ناشی از جای‌گیری بهتر پپتیدهای با وزن مولکولی کوچکتر و یکنواخت‌تر در ساختار نانولیپوزوم‌ها و نانونیوزوم‌ها باشد [۱۲]. مقادیر بازده ریزپوشانی حاصل از این تحقیق بیش از نتایج گزارش شده توسط ویر و همکاران (۲۰۰۴) بود که ریزپوشانی نایسین را در ساختار نانولیپوزوم به روش هیدراسیون فیلم نازک انجام و بازده ریزپوشانی حدود ۵۴ درصد گزارش کردند [۳۲]. بازده ریزپوشانی با طول زنجیره آسپل موجود در توپین ۸۰ به کار رفته در ساختار نانوزیکول‌ها مرتبط است. گروه‌های انتهایی آبگریز توپین ۸۰ باعث محصور کردن پپتیدهای آبگریز و گروه پلی‌اکسی اتیلن قطبی در سر دیگر توپین ۸۰ پیوندهای هیدروژنی با گروه‌های عاملی پپتیدها ایجاد کرده و بازده ریزپوشانی را افزایش داده است [۳۲]. از عوامل موثر دیگر بر کارایی درون‌پوشانی لیپوزوم‌ها می‌توان به ماهیت ماده فعال (لیپوفیل یا هیدروفیل بودن آن)؛ ماهیت فسفولیپید (از نظر نوع و آرایش اسیدهای چرب)؛ نسبت فسفولیپید به ماده فعال؛ روش تولید نانولیپوزوم؛ غلظت و نوع پایدارکننده مانند کلسترول و شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی اشاره کرد [۳۱]. علاوه بر این، پوشش نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان ۰/۲ درصد منجر به افزایش توانایی وزیکول‌ها برای حفظ پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آلکالاز به میزان ۹۰/۲ درصد و پپسین ۹۳/۰۳ درصد شد ($P < 0.05$). افزایش بازده ریزپوشانی با پوشش دهی نانوذرات با استفاده از کیتوزان، در کار پژوهشی حسنی و همکاران (۲۰۱۹) و بارانی و همکاران (۲۰۲۰) نیز به اثبات رسید [۶ و ۱۸]. به طور کلی در این پژوهش بازده ریزپوشانی نانولیپوزوم‌های پوشش داده نشده (۸۴/۶ درصد برای پپسین و ۸۱/۱۶ درصد برای آلکالاز) نسبت به نانونیوزوم‌ها (۷۹/۱ درصد برای پپسین و ۷۵/۳ درصد برای آلکالاز) بیشتر بود. این نتیجه با نتایج محمد و فهمی (۲۰۲۰) و حسینی و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۲۲ و ۳۴]. اگرچه بایندیر و توکسل (۲۰۱۰) رابطه‌ای بین HLB و بازده ریزپوشانی پیشنهاد کردند که بر اساس آن سورفکتانت‌های غیر-یونی با میزان HLB پایین منجر به ریزپوشانی بالاتر می‌شود [۳۵]. اما در پژوهش حاضر، نانولیپوزوم‌ها که ساختار آنها فاقد اسپن ۶۰ بود، بازده ریزپوشانی بالاتری نسبت به نیوزوم‌ها نشان دادند. احتمالاً میزان هیدراتاسیون پایین در نانوزیکول‌های حاوی

ریزپوشانی و میزان رهائش در شرایط نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد چشمگیرتر بود (شکل 3B و 4B). روند تغییرات در میزان رهائش نانولیپوزومها در شرایط نگهداری در دمای در نانولیپوزومهای بارگذاری شده با پپتیدهای حاصل از آلکالاز شده (۴۳/۷۳ درصد افزایش)، بیشتر از نانولیپوزومهای بارگذاری شده با پپتیدهای حاصل از پپسین (۳۰/۱۹ درصد افزایش) بود (شکل 4B).

در پژوهش سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) اثر دمای بالا بر افزایش سرعت رهائش پپتیدها گزارش شد [۵]. پایداری بیشتر و رهائش کم تر نانولیپوزومها در دمای پائین را می توان به نفوذپذیری کم تر غشا در دمای پائین، کاهش توده ای شدن در نتیجه تحرک مولکولی کم تر^۱ و تاخیر در فرآیند اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها نسبت داد [۳۸]. در پژوهش حاضر میزان رهائش (در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و ۴ درجه سانتیگراد) در نانولیپوزومها و نانولیپوزومهای بارگذاری شده با پپتیدهای حاصل از پپسین نسبت به پپتیدهای حاصل از آلکالاز به میزان بیشتری اتفاق افتاد. با بارگذاری بهتر پپتیدهای با وزن مولکولی کم تر و با اندازه یکنواخت تر حاصل از پپسین در ساختار نانولیپوزوم و نانونیوزوم، نسبت به پپتیدهای درشت تر و با وزن مولکولی بالاتر، احتمالاً نظم تک لایه و زیکولی بهبود پیدا کرده و منجر به افزایش مقاومت و پایداری ساختار نانونیوزوم و نانولیپوزوم گردید [۱۲]. در پژوهش حاضر، با گذشت زمان میزان رهائش در نانولیپوزومها بیشتر از نانونیوزومها رخ داده است که با گزارش رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد [۳۱]. با توجه به اندازه کوچکتر لیپوزومها، احتمالاً کاهش اندازه و زیکول منجر به افزایش قابل توجه انحنا غشاء و در نتیجه بسته شدن ضعیف تر اجزای تشکیل دهنده در لایه های و زیکول شده است [۳۹]. به طور کلی پایداری بیشتر و رهائش کم تر نانوذرات لیپوزومی و نیوزومی در دمای پائین را می توان به نفوذپذیری کم تر غشا در دمای پائین، کاهش توده ای شدن در نتیجه تحرک مولکولی کم تر^۲ و تاخیر در فرآیند اکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها نسبت داد [۳۸]. با مقایسه ی شیب نمودار تغییرات بازده ریزپوشانی و میزان رهائش

است پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، اندازه نانولیپوزومهای پوشش داده شده با کیتوزان حاوی پپتیدهای حاصل از پپسین و آلکالاز به ترتیب ۲۲/۵ و ۲۶/۳۷ برابر گردید. با مقایسه ی شیب تغییرات نانولیپوزومهای بدون پوشش و با پوشش کیتوزان ۰/۲ درصد در شکل 2A و 2B می توان دریافت که شدت افزایش اندازه برای نانولیپوزومهای پوشش دهی شده با کیتوزان کمتر از نانولیپوزومهای بدون پوشش بوده است. این تفاوت را می توان به اثر محافظتی پوشش کیتوزان به دلیل افزایش در ضخامت غشاء، افزایش در پتانسیل زتا، و ایجاد دافعه ی الکترواستاتیک در بین ذرات مجاور نسبت داد [۲۷]. در پژوهش حاضر اندازه ذرات نانونیوزومی تحت تاثیر دمای نگهداری نبود، اما اندازه ذرات نانولیپوزومی به شدت تحت تاثیر دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری بود. پایداری نانویوزیکولها وابسته به سیالیت غشاء لیپیدی و دما است. در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد لیپوزومها به دلیل سیالیت بالای غشاء، آگلومریزه می شوند و لخته تشکیل می دهند که افزایش اندازه ذرات، توزیع اندازه ذره ای گسترده و ناهمگون را در پی خواهد داشت [۳۷]. در بین نمونه های تولید شده در این پژوهش، کم ترین تغییر در اندازه ذرات و بیشترین پایداری مربوط به نمونه نانولیپوزوم و نانونیوزوم شاهد (بارگیری نشده با ماده فعال) بود. این نتایج نشان دهنده اثر ماده فعال و واکنش تخریبی آن در سامانه است که منجر به ناپایداری ساختار لیپوزومی و نیوزومی و تغییرات گسترده در اندازه ذرات به ویژه در دمای بالا می شود. کلسترول در مقادیر بهینه با افزایش سفتی غشاء و افزایش پتانسیل زتا و در نتیجه افزایش دفع الکترواستاتیک بین ذرات از فرایند به هم آمیخته شدن جلوگیری می کند و موجب افزایش پایداری اندازه ذرات می گردد [۲۲].

۳-۲-۴ اثر شرایط نگهداری بر سرعت رهائش و بازده ریزپوشانی

میزان بازده ریزپوشانی و رهائش نانونیوزومها و نانولیپوزومهای (با/ بدون پوشش کیتوزان) حاوی پپتیدهای حاصل شده از آنزیم پپسین و پپتیدهای حاصل شده از آلکالاز، پس از ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد به ترتیب کاهش و افزایش یافت (شکل 3A و 4A). این کاهش و افزایش در میزان بازده

1 -Low molecular mobility
2 -Low molecular mobility

ضداکسایشی بعد از بارگذاری شدن در نیوزوم و لیپوزوم کمی کاهش یافته بود که احتمالاً به دلیل کمتر بودن غلظت هیدرولیزشده‌ها در محلول نانوزیکول‌های مورد اندازه‌گیری نسبت به هیدرولیز شده‌های خالص بوده است. اما حسیی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند فعالیت ضداکسایشی ترکیبات فنولی بارگذاری شده در ساختار نانولیپوزومی و نانونیزومی، نسبت به ترکیب فنولی خالص، افزایش یافت و دلیل آن را افزایش حلالیت آن ترکیبات پس از ریزپوشانی اعلام کردند [۲۲]. با این حال، پوشش کیتوزان به طور معنی‌داری باعث حفظ بهتر فعالیت ضداکسایشی در نانولیپوزوم‌ها گردید ($P < 0.05$). به طوری- که در نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان حاوی پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز و پپسین، به ترتیب بیش از ۹۱ و ۸۸ درصد از فعالیت مهار رادیکال DPPH و ۹۳ و ۹۶ درصد از قدرت احیاکنندگی یون آهن حفظ شد که با نتایج سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) و رمضان زده و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت [۵ و ۱۶]. در این زمینه حسنی و همکاران (۲۰۱۹) اعلام کردند که بالاتر بودن اثر ضداکسایشی در نانوذرات پوشش‌دهی شده با کیتوزان، به دلیل اثر ضداکسایشی کیتوزان بوده است [۶]. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در پژوهش حاضر بالاتر از مقادیر به دست آمده برای نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با پپتیدهای کازئین (حدود ۳۷-۴۸ درصد) توسط سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) بود [۵]. همانطور که در شکل ۵ و ۶ مشخص است، قدرت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده بعد از ۲۸ روز نگهداری کاهش چشمگیری پیدا کرد، اما در نمونه‌های بارگذاری شده در نانونیوزوم و نانولیپوزوم این کاهش بطور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0.05$). علاوه بر این در نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان ۰/۲ درصد میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH در روز بیست و هشتم در مقایسه با روز اول تفاوت معنی‌داری نداشت. بنابراین پوشش کیتوزان به‌طور معنی-

نانولیپوزوم‌های بدون پوشش و با پوشش کیتوزان ۰/۲ درصد در شکل ۳ و ۴ می‌توان دریافت که شدت کاهش بازده ریزپوشانی برای نانولیپوزوم‌های پوشش‌دهی شده با کیتوزان کمتر از نانولیپوزوم‌های بدون پوشش بوده است. دلیل آن، اثر محافظتی پوشش کیتوزان از طریق افزایش ضخامت غشاء و جلوگیری از نشت مواد ریزپوشانی شده بود [۲۷]. در این پژوهش احتمالاً کمتر بودن اندازه‌ی اولیه نانولیپوزوم‌های تولید شده با این پپتیدها نسبت به اندازه‌ی اولیه نانونیوزوم‌ها باعث بیشتر بودن سرعت رهایش در نانولیپوزوم‌ها نسبت به نانونیوزوم‌ها گردید که با نتایج رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) منطبق است [۳۱].

۳-۴-۳ اثر نگهداری بر ویژگی ضداکسایشی نانوذرات حامل پروتئین‌های هیدرولیز شده

در این پژوهش، تأثیر بارگذاری پروتئین‌های هیدرولیز شده-ی حاصل از آنزیم آلکالاز و پپسین در نانونیوزوم‌ها، نانولیپوزوم‌ها و پوشش کیتوزان (۰/۲ وزنی/حجمی) بر خصوصیات ضداکسایشی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵ و ۶). بر اساس یافته‌ها، فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده تحت تأثیر نوع آنزیم قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال DPPH و قدرت کاهندگی یون آهن در هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین بیشتر از هیدرولیز شده‌ی حاصل از آلکالاز بود ($P < 0.05$). با انجام فرایند هیدرولیز توسط آنزیم پپسین و آلکالاز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، تولید پپتیدهای با قابلیت اهداء الکترون برای احیای یون آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی افزایش پیدا می‌کند [۲]. حضور اسیدهای آمینه آزاد آب‌گریز و پپتیدهای حاوی آمینو اسیدهای آروماتیک و اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد باعث تبدیل آنها به فرم پایدار می‌شود [۱۱]. تفاوت میزان فعالیت ضداکسایشی هیدرولیز شده‌ای حاصل از پپسین و آلکالاز بعد از بارگذاری شدن در نانونیوزوم‌ها نیز مشهود بود. هرچند فعالیت

نانولیپوزومها و پوشش کیتوزان (۲/۰ وزنی/حجمی) بر ویژگی مهارکنندگی ACE آنها و تغییرات این ویژگی بعد از بیست و هشت روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷). در فعالیت مهار ACE هیدرولیزشده‌های پپسین (۹۱/۴۹ درصد) و هیدرولیزشده‌های آلکالاز (۸۷/۰۷ درصد) اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.05$) که به دلیل تفاوت در ویژگی آبگریزی-آبدوستی پپتیدها، وزن مولکولی و ترتیب اسید آمینه در پپتیدهای حاصله بود.

داری باعث حفظ بهتر ترکیبات زیست‌فعال بارگذاری شده در نانولیپوزوم فعالیت ضداسکایسی آنها گردید ($P < 0.05$) که با نتایج سرابندی و همکاران (۲۰۱۹) و مظلومی و همکاران (۲۰۱۹)، حسینی و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۵، ۱۴، ۲۲].

۳-۵ بررسی ویژگی مهار ACE نانولیپوزومها و نانونیوزومها

در این پژوهش، تأثیر بارگذاری پروتئین‌های هیدرولیز شده-ی حاصل از آنزیم آلکالاز و پپسین در نانونیوزومها،

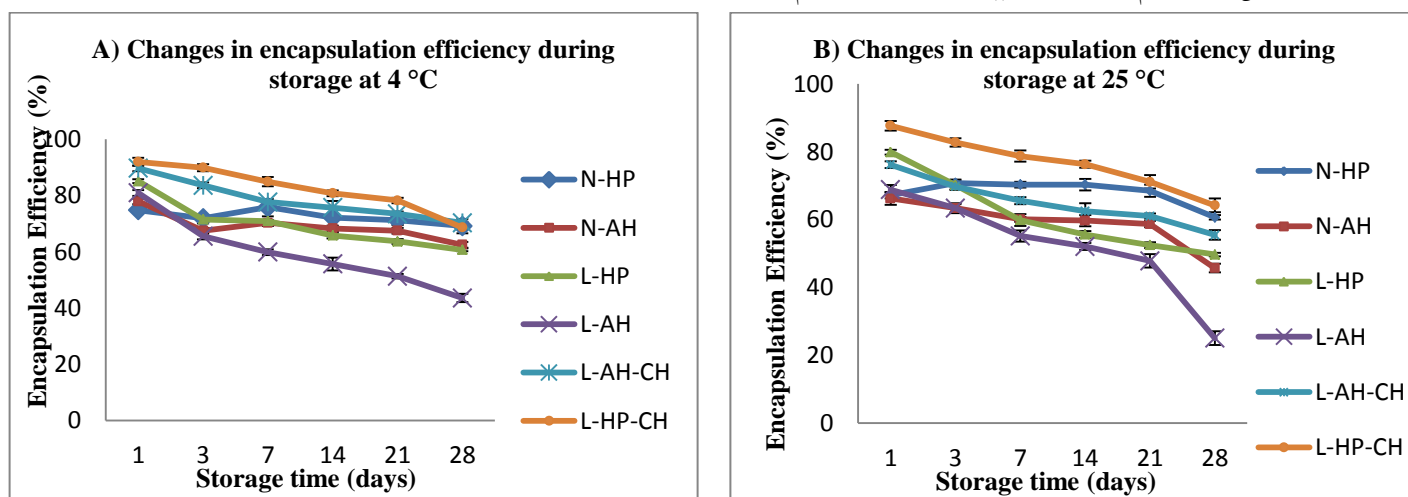


Fig. 3. Changes in Encapsulation Efficiency (%) of nanoliposomes and nanoniosomes during 28 days of storage at A) 4 °C and B) 25 °C

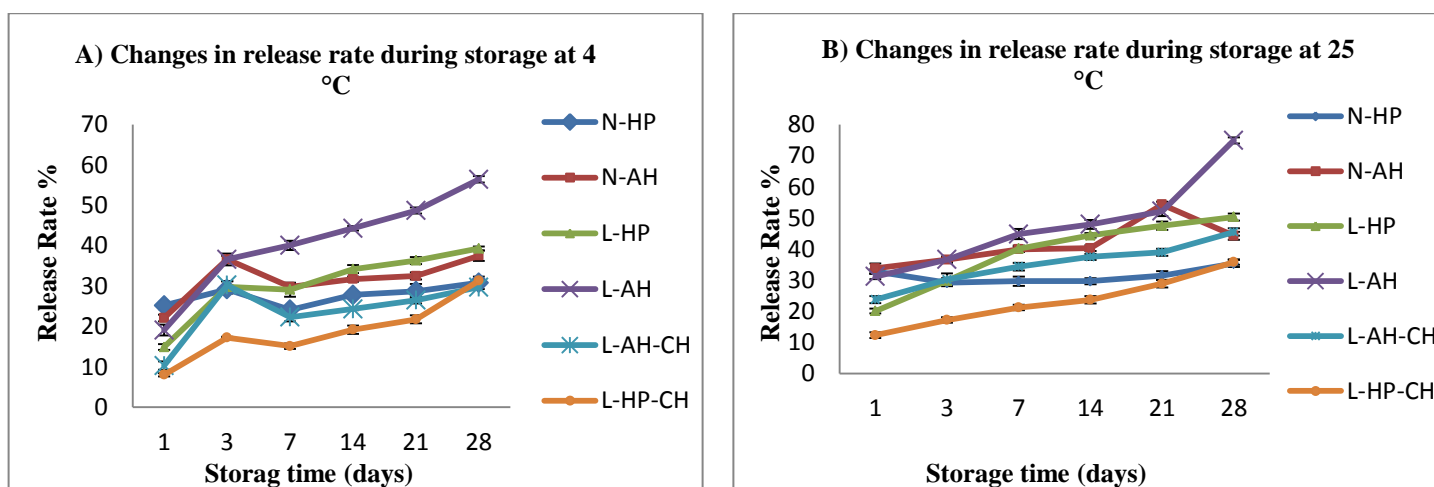


Fig. 4. Changes in release rate (%) of nanoliposomes and nanoniosomes during 28 days of storage at A) 4 °C and B) 25 °C

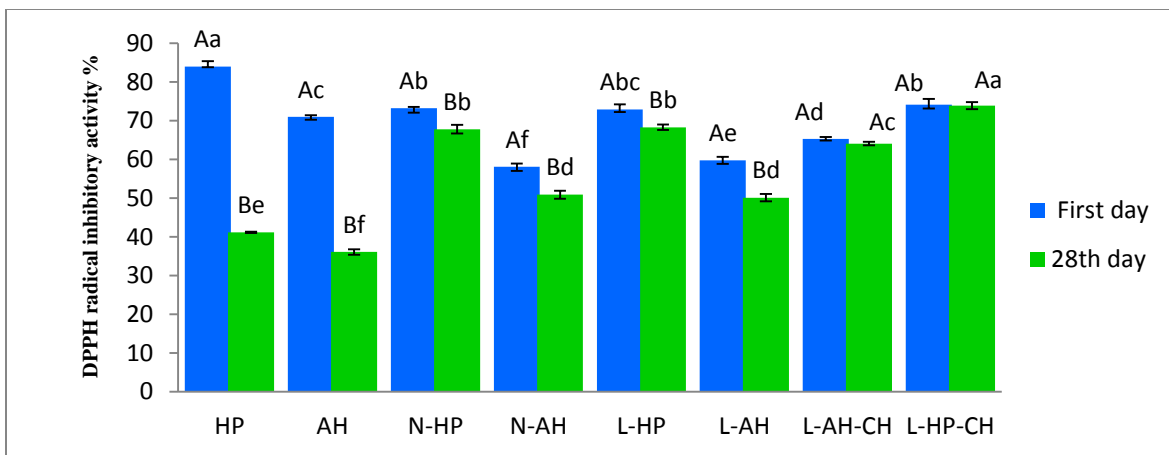


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of nanovesicles on the first day and the 28th

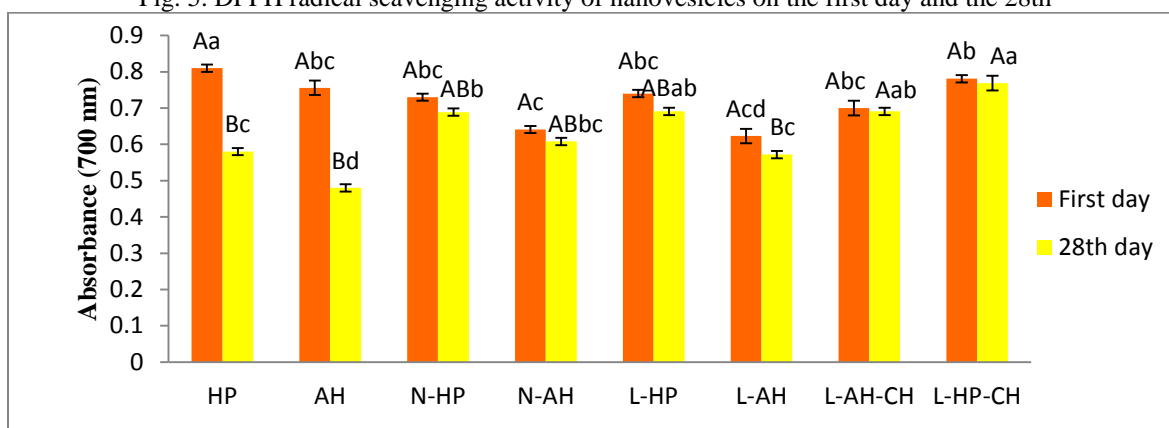


Fig. 6. Reducing power of nanovesicles on the first day and the 28th day (similar lowercase and uppercase letters respectively indicate the absence of significant differences between the treatments and in each treatment on the first day and the 28th day of storage).

های مشتق شده از نوعی کلاژن، بعد از ریزپوشانی در ساختار نانولیپوزومی فعالیت مهار ACE را ۱۰۰ درصد حفظ کردند [۴۱]. میزان فعالیت مهار ACE در نانولیپوزومها بطور معنی داری کمتر از نانولیپوزومها بود ($P < 0.05$) که با نتایج رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [۳۱]. مقایسه نتایج حاصل از فعالیت های زیستی نانوزیکول های بارگذاری شده و نتایج حاصل از DLS نشان داد که توزیع اندازه ذرات مناسب نمی تواند به تنهایی منجر به پایداری شیمیایی مناسب نانوزیکولها گردد. در این زمینه ترکیبات متفاوت وزیکولها نقش مهمی را ایفا می کنند. اسیدهای چرب غیر اشباع در ساختار لیپوزوم، منجر به نفوذ پذیری

بر اساس پژوهش های مقصودلو و همکاران (۲۰۱۸) و مقصودلو و همکاران (۲۰۱۹)، گلیسین و پرولین دو اسید آمینه آبگریز اصلی موجود در پپتیدهای شناسایی شده در هیدرولیز شده های آلکالاز و گلیسین و آلانین دو اسید آمینه آبگریز اصلی موجود در پپتیدهای شناسایی شده در هیدرولیز شده های پپسین بود که عامل فعالیت مهارکنندگی ACE آنها بودند [۱۱ و ۱۲]. بعد از بارگذاری هیدرولیز شده ها در نانوزیکولها، فعالیت مهار ACE بطور معنی داری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$) که با نتایج فولمر کوریا و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [۷]. اما آگوئیلار توالا و همکاران (۲۰۲۲) در یک کار پژوهشی اعلام کردند پپتید-

بیشتر غشاء لیپوزوم نسبت به نیوزوم شد که فعالیت زیستی کمتر لیپوزوم را به دنبال داشت. با پوشش دهی نانولیپوزومها با کیتوزان ۰/۲ درصد کاهش معنی داری در فعالیت مهار ACE مشاهده نشد. در واقع این نتایج حاکی از آن بود که تحت تاثیر پوشش محافظ کیتوزان، پپتیدها بطور کامل ریزپوشانی شده بودند، بدون آنکه از فعالیت زیستی آنها کاسته شود که با نتایج حسنی و همکاران (۲۰۱۹) همسو بود [۶]. بعد از گذشت ۲۸ روز، فعالیت مهار ACE هیدرولیز شده های آلکالاز و پپسین بطور چشمگیری کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$) (شکل ۷). در این مدت در فعالیت مهار ACE هیدرولیز شده های آلکالاز و پپسین بارگذاری شده در نانولیپوزوم های بدون پوشش کیتوزان ۰/۲ درصد، به ترتیب کاهش ۱۳ و ۱۵ درصدی مشاهده گردید که با نتایج رضوانی و همکاران (۲۰۱۹) همسو بود [۳۱]. احتمالاً خروج تدریجی پپتیدهای حاوی اسیدهای آمینه آبگریز که مسئولیت مهار ACE را بر عهده دارند، از میان اسیدهای چرب ساختار نانولیپوزوم باعث کاهش این فعالیت در نانولیپوزومها شده است. علاوه بر این پوشش کیتوزان به طور معنی داری باعث حفظ ترکیبات زیست فعال بارگذاری شده در نانولیپوزوم و فعالیت مهار ACE در آنها گردید که با نتایج حسینی و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۲۲].

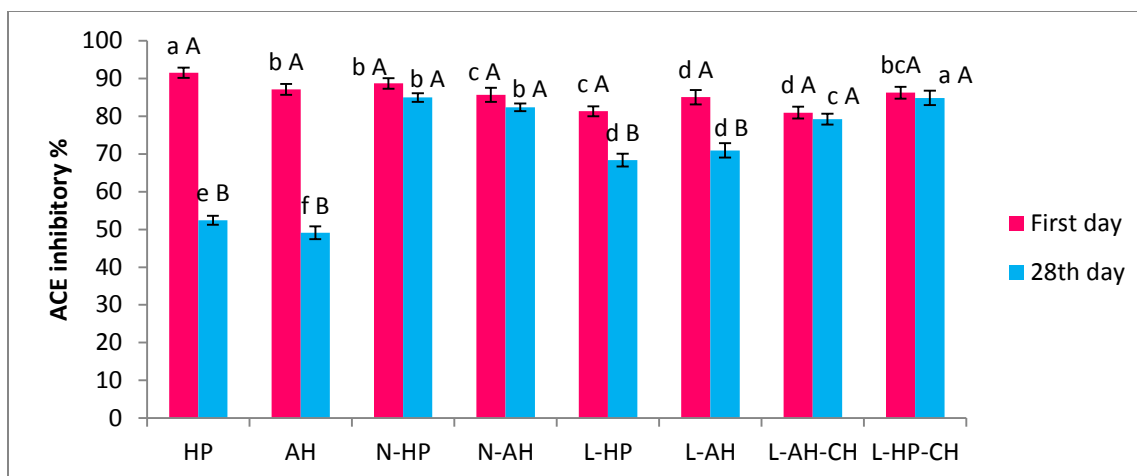


Fig. 7. ACE inhibitory activity of nanovesicles on the first day and the 28th day (similar lowercase and uppercase letters respectively indicate the absence of significant differences between the treatments and in each treatment on the first day and the 28th day of storage)

استفاده از حلال‌های خطرناک و غیرغذایی (مانند کلروفرم) در تهیه نانوحامل‌ها مانع کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی می‌شود، روش‌های تولید ارائه شده در این پژوهش می‌تواند یک استراتژی امیدوارکننده در فرایندهای غذایی برای بهبود و ارتقاء ویژگی سلامتی بخشی مواد غذایی، حفظ پایداری در مدت زمان نگهداری و دسترسی زیستی محصولات غذایی حاوی پروتئین هیدرولیز شده گرده گل پیشنهاد کند.

۵- سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب سپاسگزاری خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (Iran National Science Foundation: INSF) که پشتیبانی مالی طرح با کد ۹۸۰۲۴۳۹۰ را برعهده داشت، اعلام می‌داریم.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش امکان تولید دو نوع مختلف از نانوزیکول‌ها به عنوان ترکیب غنی کننده‌ی حاوی پروتئین هیدرولیز شده گرده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اندازه، پتانسیل زتا، توزیع اندازه ذرات و بازده ریزپوشانی نانوزیکول‌ها با پوشش دهی با کیتوزان افزایش معنی دار یافت. بعد از ۲۸ روز اندازه نانوزیکول‌ها افزایش یافت. میزان بازده ریزپوشانی نانونیوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های بدون پوشش به ترتیب کمترین و بیشترین کاهش را نشان دادند. نانوزیکول‌ها در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد ثبات بیشتری نشان دادند. با بارگذاری پروتئین‌های هیدرولیز شده در نانوزیکول‌ها و پوشش دهی آنها با کیتوزان از کاهش فعالیت ضداکسایشی و مهار ACE آنها در طول مدت ۲۸ روز نگهداری جلوگیری شد. بنابراین مشخص شد هر دوی این نانوسیستم‌ها می‌توانند از نظر پایداری فیزیکی و شیمیایی و حفظ فعالیت زیستی به عنوان یک ترکیب غنی کننده در سیستم‌های غذایی مورد استفاده قرار بگیرند، اما نانوسیستم‌های لیپوزومی حاوی پوشش کیتوزان کارآمدتر عمل کردند. البته سیستم‌های نانونیوزومی نیز با آن قابل رقابت بودند و در جایگاه دوم قرار گرفتند. از آنجایی که

۶- منابع

- [1] Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 10, 1949-1956.
- [2] Maqsoodlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., & Ghorbani, M. (2019). Controlled enzymatic hydrolysis of pollen protein as promising tool for production of potential bioactive peptides. *Journal of food biochemistry*. 43(5), e12819.
- [3] Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J. & Singh, H. (2015). Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food chemistry*, 175: 16-24.
- [4] Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A. & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *Int. Journal of Food Properties*, 11: 833-844.
- [5] Sarabandi, K., Sadeghi Mahoonak, A., Hamishehkar, H., Ghorbani, M. & Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, 251: 19–28.
- [6] Hasani, S., Shahidi, M. & Ojagh, S. M. (2019). The Production and Evaluation of Nanoliposomes Containing Bioactive Peptides Derived from Fish Wastes Using the Alkalase Enzyme. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8 (1):31-44.
- [7] Folmer Corrêa, A. P., Bertolini, P., Almeida Lopes, N., Fonseca Veras, F., Gustavo, G. & Brandelli, A. (2019). Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates *LWT - Food Science and Technology*, 101: 107–112.
- [8] Reyhani Poul, S. And Yeganeh, S. (2022). Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 21 (4) :987-1003.
- [9] Yousefi, M., Jafari, S. M., Ahangari, H., & Ehsani, A. (2021). Application of Nanoliposomes Containing Nisin and Crocin in Milk. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(1), 134-142.
- [10] Maqsoodlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mohebodini, H., Koushki, V. (2020). Stability and structural properties of bee pollen protein hydrolysate microencapsulated using maltodextrin and whey protein concentrate. *Heliyon*. 6, e03371.
- [11] Maqsoodlou, A., Mahoonak, A. S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., & Ghorbani, M. (2018). Peptide identification in alcalase hydrolysed pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food research international*, 116, 905-915.
- [12] Maqsoodlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., & Ghorbani, M. (2019). Controlled enzymatic hydrolysis of pollen protein as promising tool for production of potential bioactive peptides. *Journal of food biochemistry*. 43(5), e12819.
- [13] Diskaeva, E.I., Vecher, O.V., Bazikov, I. A. and Vakalov D. S. (2018). Particle size analysis of niosomes as a function of temperature. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*, 9 (2), 290-294.
- [14] Mazloomi, S. N., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., & Houshmand, G. (2020). Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, 280, 109976.
- [15] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F. & Arun Sharma, V. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121, 178-184.
- [16] Ramezanzade, L., Hosseini, S.F. & Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234: 220-229.
- [17] Mohan, A., Rajendran, S.R., He, Q.S., Bazinet, L. & Udenigwe, C.C. (2016). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC Advances*, 5: 79270-79278.
- [18] Barani M, Mirzaei M, Torkezadeh-Mahani M, Lohrasbi-Nejad A, Nematollahi MH. (2020). A new formulation of hydrophobin-coated niosome as a drug carrier to cancer cells. *Materials Science & engineering. Materials for Biological Applications*. 113-110975

- [19] García-Manrique, P., Machado, N. D., Fernández, M. A., Blanco-López, M. C., Matos, M., & Gutiérrez, G. (2020). Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 186, 110711.
- [20] 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.
- [21] Zhiyu, L., Allan, T., Paulson, T., & Gill, A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19: 733-743.
- [22] Hasibi, F., Nasirpour, A., Varshosaz, J., García-Manrique, P., Blanco-López, M. C., Gutiérrez, G., & Matos, M. (2020). Formulation and characterization of Taxifolin-loaded lipid nanovesicles (Liposomes, Niosomes, and Transfersomes) for beverage fortification. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 122(2), 1900105.
- [23] Zavareze, E., Telles, A.C., El Halal, S.L.M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L.M., de Castro, L.A.S., Dias, A.R.G. & Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Science and Technology*, 59: 841-848.
- [24] Tavano, L., Muzzalupo, R., Picci, N., & de Cindio, B. (2014). Co-encapsulation of antioxidants into niosomal carriers: gastrointestinal release studies for nutraceutical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 82-88.
- [25] Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Hashemi, S. M. H., Babaei, A., Eghbali, M., ... & Nokhodchi, A. (2022). Innovative topical niosomal gel formulation containing diclofenac sodium (niocfenac). *Journal of Drug Targeting*, 30(1), 108-117.
- [26] Rostamkalaei, S. S., Akbari, J., Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., & Nokhodchi, A. (2019). Topical gel of Metformin solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 150-157.
- [27] Li, Z., Paulson, A. T. & Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of functional food*, 19: 733-743.
- [28] da Silva Malheiros, P., Daroit, D.J., Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*. 21, 284292.
- [29] Mosquera, M., Giménez, B., da Silva, I.M., Boelter, J.F., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. and Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food chemistry*, 156: 144-150.
- [30] Rinaldi, F., Hanieh, P. N., Chan, L. K. N., Angeloni, L., Passeri, D., Rossi, M., ... & Marianecchi, C. (2018). Chitosan glutamate-coated niosomes: a proposal for nose-to-brain delivery. *Pharmaceutics*, 10(2), 124-131.
- [31] Rezvani, M., Hesari, J., Peighambaroust, S. H., Manconi, M., Hamishehkar, H. & Escribano-Ferrer, E. (2019). Potential application of nanovesicles (niosomes and liposomes) for fortification of functional beverages with Isoleucine-Proline-Proline: A comparative study with central composite design approach. *Food Chemistry*, 293: 368-377.
- [32] Were, L.M., Bruce, B., Davidson, P.M. and Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 67: 922-927.
- [33] Waddad, A. Y., Abbad, S., Yu, F., Munyendo, W. L., Wang, J., Lv, H., & Zhou, J. (2013). Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *International journal of pharmaceutics*, 456(2), 446-458.
- [34] Mohamad, E. A. and Fahmy, M. (2020). Niosomes and liposomes as promising carriers for dermal delivery of *Annona squamosa* extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 56: e18096.
- [35] Bayindir, Z. S., & Yuksel, N. (2010). Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(4), 2049-2060.
- [36] Chang, H. I., & Yeh, M. K. (2012). Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International journal of nanomedicine*, 7, 49-60.
- [37] Bartelds, R., Nematollahi, M. H., Pols, T., Stuart, M., Pardakhty, A., Asadikaram, G., & Poolman, B. (2018).

- Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *PloS one*, 13(4), e0194179.
- [38] Gibis, M., Thellmann, K., Thongkaew, C., Weiss, J. (2014). Interaction of polyphenols and multilayered liposomal-encapsulated grape seed extract with native and heat-treated proteins. *Food Hydrocolloids*, 41, 119-131.
- [39] Yamauchi, M., Tsutsumi, K., Abe, M., Uosaki, Y., Nakakura, M., & Aoki, N. (2007). Release of drugs from liposomes varies with particle size. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 963-966.
- [40] Mazloom, M., Naderinezhad, S., Vahedian, F., Haghirsadat, F., Daneshmand, F. (2018). Synthesize of nanoparticle-based surfactants containing *Mentha piperita* L. and *Mentha pulegium* L. essential oil in order to study the essential oil release and antioxidant activity. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 34(3), 359-379.
- [41] Aguilar-Toalá, J. E., Quintanar-Guerrero, D., Liceaga, A. M., & Zambrano-Zaragoza, M. L. (2022). Encapsulation of bioactive peptides: a strategy to improve the stability, protect the nutraceutical bioactivity and support their food applications. *RSC advances*, 12(11), 6449-6458.
- [42] Horwitz W. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists; 2000.
- [43] Hoyel, N. T., & Merritt, J. H. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 76-79

Journal of Food Science and Technology (Iran)Homepage: www.fsct.modares.ir**Scientific Research****Effect of temperature and storage time on bioactivity and physicochemical stability of containing hydrolyzed bee pollen protein nanovesicles**Atefe Maqsoodlou*^{1,2}, Alireza Sadeghi Mahoonak³, Hossein Mohebodini⁴

1- Postdoctoral Researcher, Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran,

2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Golestan Institute of Higher Education, Gorgan, Iran .

3- Professor, Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran .

4- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.

ABSTRACT**ARTICLE INFO**

In this study, the effect of temperature and storage time on the biological activity and the physicochemical stability of nanovesicles (specifically, liposomes and niosomes) containing bee pollen hydrolyzed protein obtained from alcalase and pepsin enzymatic hydrolysis was evaluated. The nanoliposomes were coated with 0.2% chitosan. DPPH radical scavenging power, ferric ion reducing power, ACE scavenging power, particle size, particle dispersion index, zeta potential, encapsulation efficiency and release rate of hydrolyzed proteins from nanovesicles during 28 days storage at both refrigerator and ambient temperature were investigated. The results from Dynamic Light Scattering (DLS) revealed a significant increase in the size of nanovesicles upon loading with hydrolyzed protein and coating with chitosan ($P < 0.05$). Chitosan coated nanoliposomes had the highest amount of PDI. The zeta potential of nanovesicles reached the highest value by coating with chitosan. Chitosan coated nanoliposomes had the highest encapsulation efficiency. After a 28 day storage period, both coated and uncoated nanovesicles exhibited a substantial increase in size, ranging from 2 to 26 times larger than their initial sizes. However, the encapsulation efficiency of nanoliposomes and uncoated nanoliposomes showed the lowest and highest decrease, respectively. The values of the measured factors during storage at the refrigerator were significantly lower than ambient temperature ($P < 0.05$). The decline in the antioxidant activities of nanovesicles was significantly prevented by loading hydrolyzed proteins and coating the nanovesicles with chitosan. The ACE inhibition was lower in the nanoliposomes as compared with the nanoniosomes. After 28 days, the ACE inhibition activity of the loaded in nanoliposomes without coating chitosan decreased slightly. These findings are of great importance for designing and developing nutritious foods containing hydrolyzed protein.

Article History:

Received: 2023/5/1

Accepted: 2023/8/12

Keywords:

Nanovesicles,
hydrolyzed protein,
bee pollen,
biological activity,
stability

DOI: 10.22034/FSCT.20.142.31
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.142.3.3

*Corresponding Author E-Mail:
atefe.maqsoodlou@gmail.com