

## تولید و بهینه‌سازی نانوسامانه‌های کیتوزان برای حمل فراکسیون پپتیدی حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات سر میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

قاسم رشیدیان<sup>۱</sup>، عبدالمحمد عابدیان کناری<sup>۱\*</sup>، مریم نیکخواه<sup>۲</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲- گروه علوم نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

این تحقیق با هدف بررسی و بهینه‌سازی کپسوله‌سازی فراکسیون پپتیدی کوچکتر از ۱۰ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات سر میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) توسط کیتوزان انجام شد. هیدرولیز پروتئینی ید ست آمده توسط اولترافیلتراسیون با اندازه چشمه ۱۰ کیلو دالتون فراکسیون بندی و فراکسیون مورد نظر بر اساس روش ژلاسیون یونی (کیتوزان-تری پلی فسفات) در کپسول های نانوکیتوزان کپسوله و در شرایط آزمایشگاهی بر اساس نسبت های مختلف کیتوزان:تری پلی فسفات و غلظت های مختلف فراکسیون پپتیدی شامل ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بهینه سازی شد. بر اساس نتایج مشخص شد که آنزیم آکالاز با درجه هیدرولیز  $57 \pm 2/37$  درصد ضایعات سر میگو را هیدرولیز و طبق شرایط این آزمایش طول زنجیره پپتیدی  $1/175$  حاصل شد. وزن مولکولی پپتید های حاضر در فراکسیون حاصل از اولترافیلتراسیون دارای دامنه وزنی نزدیک بهم و زیر ۱۰ کیلو دالتون بود. اندازه ذرات در غلظت ها و تمپارهای مختلف متنوع و در محدوده ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر بود. بهترین نتیجه حاصل از بهینه سازی کپسوله سازی در تیمار نسبت ۲:۱ کیتوزان به پلی فسفات و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. اندازه، شاخص پراکندگی (PDI)، پتانسیل زتا و اندازه نانوکپسول ها در شرایط بهینه مورد نظر به ترتیب  $0.375$ ،  $2020$  و  $30/13$  نانومتر بودند و شرایط نگهداری در دمای  $20$ - درجه سانتیگراد تاثیر چندانی بر کیفیت نانوکپسول ها نداشت. یافته های این تحقیق نشان داد کیتوزان می تواند بخوبی برای نانکپسوله کردن فراکسیون پپتیدی کوچکتر از ۱۰ کیلودالتون با کارایی  $91/04 \pm 0/18$  درصد مورد استفاده قرار گیرد.

**کلید واژه‌ها:** نانوکپسوله سازی، نانو کیتوزان، پپتید زیست فعال، ضایعات میگو، هیدرولیز آنزیمی

### مقدمه

استفاده از هیدرولیزها در جیره غذایی ماهی به‌عنوان جاذب و محرک ایمنی به دهه های گذشته باز میگردد<sup>[۱،۲]</sup>. پروتئین هیدرولیز شده آبزیان از جمله ضایعات میگو یک منبع با ارزش طبیعی از پپتید های زیست فعال می باشند و طیف وسیعی از زیست فعالی برای این پپتیدها از جمله خاصیت ایمنی‌زایی گزارش شده است<sup>[۳-۷]</sup>. در صنعت فرآوری میگو، تقریباً ۳۵-۴۵ درصد از مواد اولیه فرآوری شده به عنوان ضایعات حذف می شوند و بسته به نوع گونه حاوی مقادیر مختلفی از پروتئین، چربی، کاروتنوئیدها و کیتین هستند<sup>[۸]</sup>. هیدرولیز آنزیمی ضایعات می تواند منجر به تشکیل پپتیدهای زیست فعال محرک رشد و سیستم ایمنی غیر اختصاصی شود<sup>[۲]</sup>. با این حال ترکیبات زیست فعال می‌توانند نسبت به فرآیند تولید و یا شرایط نگهداری بسیار حساس باشند. در نتیجه، اثر آنها ممکن است به دلیل برهمکنش با اجزای غذایی کاهش یابد و بنابراین غلظت های بالاتری اغلب مورد نیاز است<sup>[۹]</sup>. کاربرد پپتیدهای ضداکسیداسیون بعنوان یک گروه جدید از ترکیبات ضداکسیداسیونی به دلیل تلخ مزه بودن، دسترسی زیستی پایین و واکنش های تقابلی با مواد مغذی، تا حدودی دارای محدودیت می‌باشد<sup>[۱۰]</sup>. همچنین آنزیم‌های پروتئولیتیک

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۲۵

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۳/۱۰

\*نویسنده مسول:

[aabedian@modares.ac.ir](mailto:aabedian@modares.ac.ir)

نیز پپتیدهای کوچک را در معده و روده تخریب می کنند [۱۳]. از آنجایی که اغلب اسیدهای آمینه و پپتیدهای زیست فعال در طبیعت آبگریز هستند، روش های تلخی زدایی شامل حذف پپتید آبگریز با روش کروماتوگرافی، جذب پپتیدهای تلخ با کربن فعال و استخراج گزینشی با الکل میتواند منجر به از دست رفتن زیست فعالی شود [۱۲]. مناسب ترین رویکرد برای محافظت پپتیدهای زیست فعال به واسطه هضم، استفاده از یک پوشش و کپسوله کردن این ترکیبات می باشد [۱۴].

کپسوله سازی پپتیدهای ضد اکسیداسیون توسط نانو ساختارها می تواند راهکار مناسبی برای غلبه به این مشکل باشد زیرا کپسوله سازی موجب ارتقاء پایداری پپتیدها و ایجاد محافظی برای مقاومت در برابر آنزیم های پروتئولیتیک و افزایش زیست فراهمی پپتیدها شود [۱۵]. فناوری نانو می تواند با کپسوله کردن ترکیبات آنتی باکتریال موجب محافظت و تقویت کارایی و پایداری آنها در کاربردهای مواد غذایی به این مشکل غلبه کند [۱۶]. در واقع با محصور کردن پپتیدها در کپسول های خوراکی، یک مانع محافظ بین ترکیب زیست فعال و محیط بیرونی تشکیل می شود. پلی ساکاریدهایی مثل کیتوزان پلیمرهایی طبیعی هستند که به عنوان مواد غذایی بی خطر و کم هزینه مورد استفاده قرار می گیرند و برای تحویل عناصر غذایی فعال زیستی مورد توجه قرار گرفته اند. کیتوزان یک کوپلیمر خطی است که از واحدهای مرتبط با  $\beta$ -D-GlcNAc (1-4) B-گلوکوزامین و N-acetyl-d-glucosamine تشکیل شده است و در سالهای اخیر در صنایع دارویی و غذایی و مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷]. کیتوزان یک پلی ساکارید کاتیونی است که به دلیل ویژگیهای مطلوب آن از جمله منابع کافی برای بدست آوردن آن، استخراج قابل کنترل و آسان، زیست سازگاری، تجزیه پذیری زیست و غیر سمی بودن، پتانسیل بالایی برای استفاده در تولید انواع ریزپوشانی ها در حوزه غذا و دارو دارد [۱۸]. علاوه بر این کیتوزان دارای چندین گروه عملکردی در زنجیره های پلیمری خود است که امکان اصلاح شیمیایی را فراهم می کند و بنابراین فرصت به دست آوردن ترکیبات جدید با خواص فیزیوشیمیایی مناسب را فراهم می کند [۲۰، ۲۱]. روش ژلاسیون یونی به طور گسترده ای برای تولید نانو کپسول های حاوی مواد غذایی با استفاده از کیتوزان و ماده ای غیر سمی و چند ظرفیتی مانند تریپلی فسفات (TPP) مورد استفاده قرار گرفته است [۲۲، ۲۳]. در این راستا غلظت، نسبت مواد تشکیل دهنده، روش اختلاط و pH از عوامل تأثیرگذار در فرآیند ژل سازی هستند [۲۳]. اگرچه اندازه بزرگ نانوذرات بدست آمده (۱۰۰۰-۲۰۰۰ نانومتر) ظرفیت بارگیری بالایی را فراهم می کند (تا ۸۰٪ برای آلبومین سرم گاو)، اندازه ذرات، حساسیت به pH و شاخص پراکندگی زیاد به عنوان اشکال این روش در نظر گرفته می شود [۲۴]. مطالعات متعددی کپسوله سازی ترکیبات غذایی و دارویی توسط کیتوزان را مورد بررسی قرار داده اند [۲۵-۲۷]. بیشترین کارایی کپسوله سازی با استفاده از روش ژلاسیون یونی TPP-chitosan توسط jamil و همکاران [۲۸] برای محصور سازی اسانس هل در نانوکامپوزیت هایی با اندازه ۵۰-۱۰۰ نانومتر و با اثر ضد میکروبی قابل توجهی در برابر *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* گزارش شده است.

در مطالعه قبلی Rashidian و همکاران [۲۹]، نشان داده شد که فراکسیون کوچکتتر از ۱۰ کیلو دالتون بدست آمده از ضایعات سر میگوی وانامی دارای خواص ضد اکسیداسیونی و ضدباکتریایی می باشند. لذا تحقیق حاضر به منظور تولید و بهینه سازی کپسوله سازی این فراکسیون در نانو حامل های کیتوزان-تری پلی فسفات انجام شد.

## مواد و روش ها

ضایعات میگو به صورت منجمد و تازه از شرکت شیل گستر آبری واقع در بندر پنج پیکر استان گلستان تهیه و به دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی در شهرستان نور منتقل شد. ضایعات سر به صورت دستی جداسازی و با استفاده از چرخ گوشت بصورت خمیر درآمده و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آنزیم مورد استفاده، آنزیم میکروبی آلكالاز بوده که از شرکت Novozymes دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتیگراد نگهداری شد. آنزیم آلكالاز (۲/۴L) پروتئاز قلیایی است که از باکتری *Bacillus licheniformis* استخراج میشود. فعالیت آنزیمی و چگالی آن به ترتیب ۲/۴ Au/Kg و ۱/۸ گرم بر میلی لیتر می باشد. کیتوزان تهیه شده از شرکت سیگما (9012-76-4, sigma Aldrich, USA) با درجه داستیلاسیون متوسط و وزن مولکولی ۹۰ تا

۳۱۰ کیلودالتون مورد استفاده قرار گرفت. همچنین تری پلی فسفات، استیک اسید و سایر واکنشگرها در این تحقیق با درجه خلوص آزمایشگاهی و از محصولات شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

### هیدرولیز آنزیمی

هیدرولیز نمونه‌ها بر اساس مطالعه قبلی انجام شد<sup>[۲۹]</sup>. بطور خلاصه ۵۰ گرم نمونه با نسبت ۱:۱ با اب مقطر دوبار تقطیر مخلوط و هموزن شدند. پس از ۱۵ دقیقه حمام آب گرم در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد اسیدیته نمونه‌ها با کمک سود ۴ نرمال روی ۸/۵ تنظیم شد. آنزیم الکالاز (L ۲/۴) با نسبت ۰,۰۵ درصد وزنی-وزنی اضافه و واکنش در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بمدت ۳ ساعت بطول انجامید و واکنش با حرارت دادن نمونه‌ها بمدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سانتیگراد به پایان رسید. ۳ نمونه برای اندازه‌گیری درجه هیدرولیز جدا و سپس نمونه‌ها بمنظور جداسازی قطعات بزرگ و غیر محلول از فیلتر نخی عبور داده شده و در ۵۰۰۰ دور بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ و برای فراکسیون بندی در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

### تعیین درجه هیدرولیز و اندازه طول پپتیدها

میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها قبل و پس از هیدرولیز با استفاده از روش بردفورد<sup>[۳۰]</sup> اندازه‌گیری شد. نمونه‌های هیدرولیز شده با دور ۵۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و با نسبت ۱:۱ در محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ در صد مخلوط شدند. میزان پروتئین در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اندازه‌گیری و درجه هیدرولیز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه (۱)

$$100 \times \text{نیترژن کل در نمونه اولیه} / \text{میزان کل نیترژن در محلول تری کلرواستیک اسید} 10\% = (\%) \text{ درجه هیدرولیز}$$

طول زنجیره پپتیدی بر اساس درجه هیدرولیز و با کمک فرمول زیر محاسبه شد<sup>[۳۱]</sup>:

رابطه (۲)

$$\text{درجه هیدرولیز} (\%) = 100 / \text{طول زنجیره پپتیدی}$$

### فراکسیون بندی

در این مرحله هدف جداسازی ذرات موجود با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون مدنظر بوده که از فیلتر ممبران‌های با قطر منافذ ۱۰ کیلودالتونی (Amicon, Spain) مورد استفاده قرار گرفتند. فراکسیون مورد نظر بعنوان محلول عبوری از فیلترها در نظر گرفته شدند. به‌طور خلاصه نمونه هیدرولیز سانتریفیوژ شده (۵۵۰۰ دور دقیقه به مدت ۲ دقیقه) به اولترافیلترها منتقل و در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۳۰ دقیقه با ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس فراکسیون‌ها توسط خشک‌کن انجمادی خشک و بصورت پودر تهیه و تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

### تعیین حدود وزن مولکولی پپتیدها

برای تعیین وزن مولکولی پپتیدهای حاضر در فراکسیون بدست آمده از روش الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید استفاده شد. کلیه محلول‌های استوک شامل بافر ژل فوقانی و تحتانی، بافر مخزن، محلول رنگ آمیزی، و محلول رنگ بری بصورت تازه و بر اساس پروتکل‌های استاندارد تهیه شدند. ژل استفاد شده با ضخامت ۱ میلی‌متر و ۱۲ تا ۱۶/۵ در صد آکریل آمید در بخش تحتانی و ۶ در صد در بخش فوقانی ساخته شد. الکتروفورز ژل بر اساس روش Laemmli و همکاران<sup>[۳۲]</sup> با اندکی تغییرت انجام شد. بطور خلاصه چند نمونه با غلظت مساوی درون چاهک‌های تعبیه شده ریخته شد و با برقراری ولتاژ ۱۵۰ ولت جداسازی پپتیدها بر اساس وزن مولکولی انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل

ها دوبار توسط آب مقطر شستشو داده شده و برای رنگ آمیزی ژل و باندها به مدت دو ساعت در محلول کوماسی بلو (G-250) و روی شیکر ملایم قرار داده شدند. سپس ژل با کمک محلول رنگ بری و آب مقطر شسته شده تا زمینه ژل شفاف گردد. از ژل آماده شده عکس برداری و وزن ولکولی نسبی در مقایسه با پروتئین استاندارد تعیین گردید. تمام مواد شیمیایی استفاده شده مربوط به شرکت Merck آلمان است.

### فرایند کپسوله سازی، بهینه سازی کپسوله سازی و راندمان بارگزاری فراکسیون پپتیدی

در این مرحله فراکسیون پپتیدی توسط نانوذرات کیتوزان-تری پلی فسفات بر اساس روش ژلاسیون یونی کپسوله شدند. برای این کار ابتدا محلول ۱ گرم در میلی لیتر فراکسیون تهیه و سایر غلظت های ۱ و ۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر با رقیق کردن توسط آب مقطر در حجم نهایی ۱ میلی لیتر تهیه و حداکثر میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج ۲۲۰ تا ۲۸۰ با کمک دستگاه الیزا اندازه گیری شد. محلول های کیتوزان با غلظت های ۱ و ۲ میلی گرم بر میلی لیتر کیتوزان تهیه و اسیدیته محلول با کمک هیدروکلرید اسید روی ۵ تنظیم شد. نسبت حجمی کیتوزان:تری پلی فسفات (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) بصورت ۱:۵ و ۲:۵ تنظیم شدند. برای سنتز نانوکپسول ها غلظت های مختلف پپتیدی در محلول تری پلی فسفات حل شده و بصورت قطره چکانی به داخل محلول کیتوزان حل شده در استیک اسید ۰.۰۵ در صد اضافه شد. پس از گذشت ۴۰ تا ۶۰ دقیقه محلول حاصل توسط حمام اولتراسوند با قدرت ۴۵ هرتز سونیکه شده و در سانتریفیوژ یخچال دار با ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شد. نانوکپسول ها در مقدار اندکی آب مقطر حل و توسط خشک کن انجمادی بصورت پودر تهیه و تا انجام آزمایشات بیشتر در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. حداکثر میزان جذب نوری مایع رومانند در طول موج های ۲۲۰ تا ۲۸۰ اندازه گیری شد و اختلاف این دو معیار محاسبه میزان کارایی کپسوله سازی قرار گرفت [۳۳].

رابطه (۳)

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = [\text{OD}_{\text{Stock}} - \text{OD}_{\text{supernatant}} / \text{OD}_{\text{Stock}}] \times 100$$

دانشیته یا جذب نوری ذخیره (OD<sub>Stock</sub>)، دانشیته یا جذب نوری مایع رومانند (OD<sub>supernatant</sub>)، کارایی کپسول سازی (EF)

نانو سامانه های سنتز شده به وسیله خشک کن انجمادی لیوفیلیز شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بمنظور بررسی کیفیت و تغییرات احتمالی سامانه طی شرایط نگهداری، آزمایش بر روی انحلال مجدد و اندازه گیری سایز و پتانسیل زتا صورت گرفت. نمونه ها تحت شرایط دمای اتاق در آب مقطر حل شده و پس از سونیکاسیون (پروپ) بمدت ۲ دقیقه نمونه ها جهت اندازه گیری به دستگاه منتقل شدند.

### تعیین اندازه، پتانسیل زتا و شاخص چند توزیعی

به منظور تعیین اندازه ذرات، شاخص چندتوزیعی و پتانسیل زتا از روش پراکندگی نور پویا و دستگاه انکسار نور لیزر مدل nano Malvern, Zetasizer، ساخت انگلستان، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. همچنین شاخص بس پاشیدگی با توجه به منحنی توزیع اندازه ذرات توسط نرم افزار دستگاه، در دمای محیط و با سه تکرار محاسبه گردید. قبل از اندازه گیری، نمونه ها جهت جلوگیری از پدیده پراکندگی چندگانه ناشی از فعل و افعالات بین ذره ای نمونه ها به میزان ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شدند و به مدت ۹۰ ثانیه با سونیکاتور پروپ سونیکه شدند. نمونه های خشک شده پس از ۱ هفته نگهداری در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد مجدد مورد بررسی قرار گرفتند.

### بررسی مورفولوژی نانو کپسول ها

بررسی سطوح خارجی و مورفولوژی سطحی نانوکپسول های تولید شده با تهیه تصویر توسط میکروسکوب الکترونی روبشی TESCAN مدل MIRA3، ساخت کشور چک، انجام شد. بدین منظور نمونه ها روی استاب های آلومینیومی دستگاه ثابت و با استفاده از طلا: پالادیوم (۴۰:۶۰) پوشانده شدند. جهت بررسی شکل و ویژگیهای سطحی (شکستگی، فرورفتگی، چین خوردگی و غیره) از سطح نانوکپسول ها تصویر تهیه گردید

## تجزیه و تحلیل داده‌ها

در مطالعه بهینه سازی کپسوله سازی اندازه نهایی، میزان یکنواختی اندازه محصول تولید شده، و غلظت بالای فراکسیون مورد استفاده ملاک ارزیابی قرار گرفته و تعیین بهترین خروجی حاصل از بهینه سازی فراکسیون مورد نظر انجام شد.

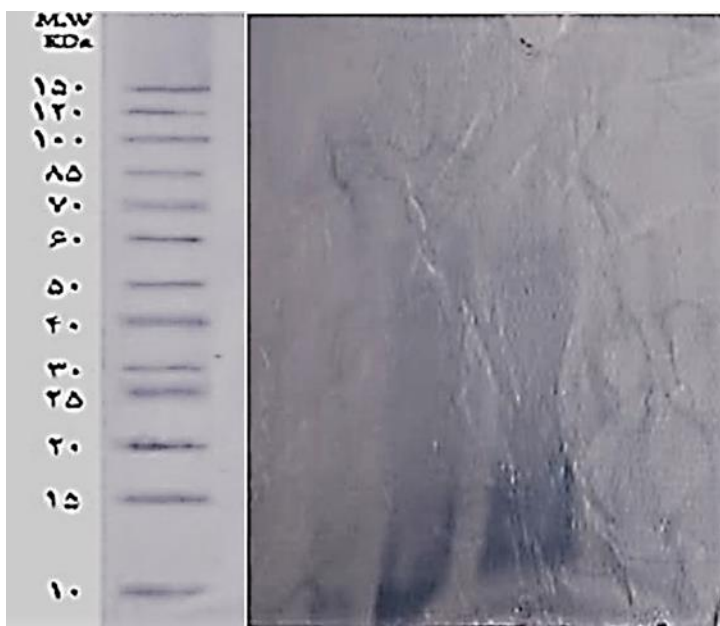
## نتایج

## درجه هیدرولیز

سه نمونه جهت اندازه گیری درجه هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت. مقدار نیتروژن کل در نمونه اولیه و پس از هیدرولیز اندازه گیری و درجه هیدرولیز معادل  $57 \pm 2/37$  درصد محاسبه شد. بر همین اساس طول زنجیره پپتیدی با کمک درجه هیدرولیز بر اساس فرمول ذکر شده معادل  $1/754$  محاسبه شد.

## وزن مولکولی پپتیدهای حاضر در فراکسیون

نتایج حاصل از آنالیز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) با کمک پروتئین استاندارد نشان داد عمده پپتیدهای حاضر در فراکسیون نزدیک به ۱۰ کیلودالتون یا کمتر از آن می باشند (شکل ۱). به دلیل کوچک بودن اندازه پپتیدها، عمده پپتیدها در انتهای ژل به دام افتادند و باند قوی و هاله ای شکل نشان دهنده نزدیک بودن وزن مولکولی عمده پپتیدهای حاضر در فراکسیون می باشد. در واقع سه لاین یا باند قابل مشاهده است. لاین اول مربوط به فراکسیون زیر ۳ کیلو دالتون می باشد. لاین وسط مربوط به فراکسیون کوچکتر از ۱۰ و لاین آخر سمت راست مربوط به فراکسیون بین ۱۰ و ۳۰ کیلو دالتون می باشد.

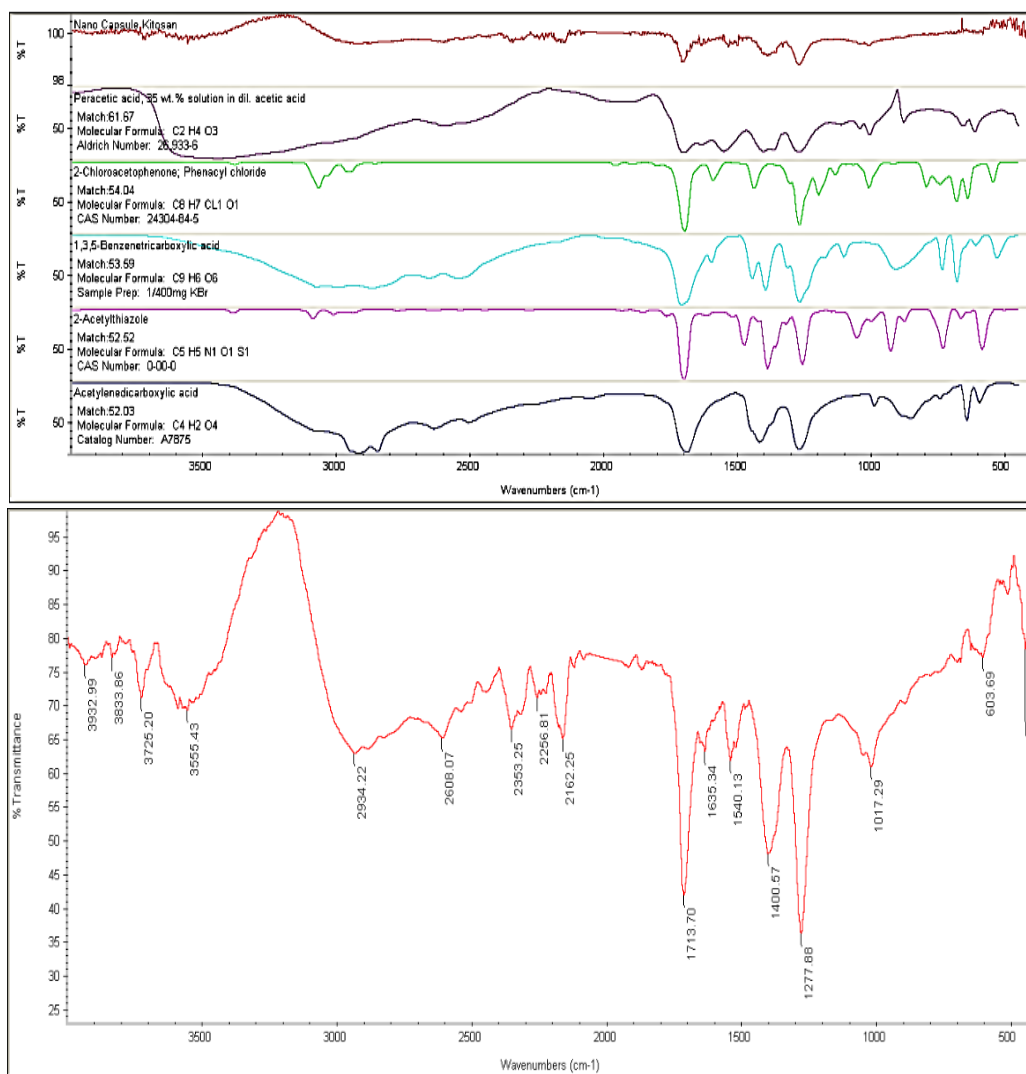


شکل ۱. پروفایل SDS-PAGE پروتئین استاندارد (سمت چپ) و فراکسیون‌های بدست آمده از هیدرولیز ضایعات سر میگوی وانامی

## آنالیز FTIR مربوط به کیتوزان

شکل ۲ نشان دهنده پیک های مربوط به نانوکپسول های کیتوزان (آ) از محدوده ۵۰۰-۴۰۰۰ بر سانتی متر است. در شکل (آ) پیک های محدوده ۳۲۰۰-۳۴۰۰ ترکیبی از پیک های مربوط به گروه های کششی OH و پیوندهای درون مولکولی هیدروژنی هستند. پیک ۱۶۳۵ مربوط به گروه R-CO-NH<sub>2</sub> و ۱۰۱۷ مربوط به C-O-C است. در شرایط اسیدی گروه های آمین کیتوزان با دریافت پروتون می توانند در ایجاد پیوندهای عرضی با یونهای P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> تری پلی فسفات شرکت کنند. دو پیک ۱۵۴۰ و ۱۴۰۰ در شکل آ مربوط به گروه خمشی NH<sub>4</sub><sup>+</sup> بوده که نشان دهنده تشکیل میان کنش بین گروه های فسفات TPP و گروه های آمین کیتوزان است.

کاهش باندهای هیدروژنی در نانوذره کیتوزان کراس لینک شده به دلیل ساختارهای باز بیشتر در نتیجه کراس لینک کیتوزان با تری پلی فسفات می باشد. باند ۲۸۶۷ cm<sup>-1</sup> در کیتوزان مربوط به کجی محوری گروه H-C می باشد که در طیف سنجی نانوذره این گروه در باند ۲۹۳۸ قرار دارد. مشخصه دیگر که می توان گفت کیتوزان به نانوذره تبدیل شده است، انتقال باند ۱۶۵۷ cm<sup>-1</sup> به طیف در ۵۳۶۱ cm<sup>-1</sup> و ۱۶۴۳ cm<sup>-1</sup> به ۱۵۷۶ cm<sup>-1</sup> نانو ذره می باشد که نشان دهنده گروه های COOH- می باشد. جا به جایی این دو باند و افزایش شدت باند NH نیز به وسیله سایر محققین گزارش شده است که بر همکنش یونی بین گروه های آمینی کیتوزان با بار مثبت و بار منفی گروه های تری پلی فسفات را پیشنهاد می دهد.



شکل ۲. طیف سنجی مادون قرمز نانوکیتوزان (بالا) و نانوکیتوزان حاوی فراکسیون پپتیدی (پایین).

### بهینه‌سازی کپسوله‌سازی و کارایی بارگذاری فراکسیون پیتیدی

نتایج مربوط به اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی اندازه ذرات در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان داد با تغییر نسبت کیتوزان: تری پلی فسفات و همچنین تغییر در غلظت فراکسیون و محلول های اولیه سنتز نانوکپسول ها اندازه و کیفیت کلی ذرات تولید شده دستخوش تغییرات می شوند. نتایج هیچ گونه عملکرد خطی نشان ندادند در واقع جابجایی نسبت ها و غلظت ها محصولات متفاوتی تولید کرد و الزاما رابطه ای بین عوامل متغیر و نتیجه مشاهده نشد. در این شرایط بهینه سازی هدف مطلوب میزان بارگذاری حداکثر، اندازه کوچکتر، و یکنواختی ذرات تولید شده بود که بدین ترتیب تیمار شماره ۶ بعنوان تیمار بهینه انتخاب و ملاک ارزیابی های بعدی قرار گرفت. بهینه سازی سنتز نانوکپسول های کیتوزان نشان داد که در بهترین شرایط سنتز (یکسان برای همه آزمایشات)، غلظت پیتیدی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در نسبت سنتز ۵ به ۲ کیتوزان (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به تری پلی فسفات کپسول های با اندازه ۳۰/۱۳ نانومتر تولید می کند. از اینرو شرایط فوق بعنوان بهینه در نظر گرفته شده و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین نتایج نشان داد نگهداری نانو سامانه ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تاثیر چندانی بر خواص فیزیکی آنها نداشته است (جدول ۲).

جدول ۱. بهینه‌سازی کپسوله سازی فراکسیون کوچکتر از ۱۰ کیلو دالتون حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات سر میگوی وانامی توسط ژلاسیون یونی کیتوزان-سدیم تری پلی سولفات. <sup>۱</sup> غلظت پیتید به صورت میلی گرم بر میلی لیتر آب مقطر منظور شده است. <sup>۲</sup> شاخص پراکندگی یا polydispersity index

تیمار	غلظت فراکسیون <sup>۱</sup> (میلی لیتر/میلی گرم)	غلظت کیتوزان (میلی لیتر/میلی گرم)	نسبت کیتوزان: تری پلی فسفات	PDI <sup>۲</sup>	پتانسیل زتا (mV)	اندازه (نانومتر)	کیفیت نتایج
۱	۱	۱	۱:۵	۰/۲۲۴	۱۴۳/۲	۷۶/۳۷	خوب
۲	۵	۱	۱:۵	۰/۵۷۶	۵۲۲/۱	۳۴۴/۵	نامناسب
۳	۱۰	۱	۱:۵	۰/۴۵۵	۲۱۰/۲	۳۸/۴۸	خوب
۴	۱	۲:۵	۲:۵	۰/۴۶۲	۳۴۷/۴	۲۸۸/۳	خوب
۵	۵	۲:۵	۲:۵	۰/۲۷۷	۳۴۲/۲	۸۴/۲	خوب
۶	۱۰	۲:۵	۲:۵	۰/۳۷۵	۲۰۲	۳۰/۱۳	خوب
۷	۱	۲	۱:۵	۰/۷۳۸	۹۲۰/۹	۵۰۱/۲	نامناسب
۸	۵	۱:۵	۱:۵	۰/۲۴۵	۳۲۰/۵	۷۸/۳	خوب
۹	۱۰	۱:۵	۱:۵	۰/۶۲۷	۱۸۲/۵	۴۲۹/۱	خوب
۱۰	۱	۲:۵	۲:۵	۰/۲۲۴	۱۴۲/۳	۸۸/۷۷	خوب
۱۱	۵	۲:۵	۲:۵	۰/۳۹۴	۱۷۲/۸	۵۹/۱۱	خوب
۱۲	۱۰	۲:۵	۲:۵	۰/۵۲۲	۲۷۴/۵	۱۱۵/۸	خوب

### مطالعه کارایی کپسوله سازی

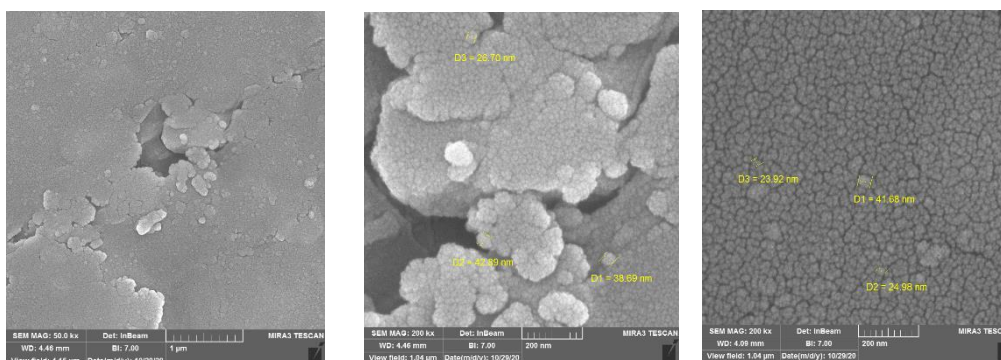
کارایی کپسوله سازی با استفاده از نانوکیتوزان از تفریق میزان پیتید آزاد در مایع رومانند و مقدار کل پیتید استفاده شده و معادل  $91/04 \pm 0/18$  درصد محاسبه شد.

جدول ۲- انحلال مجدد نانو سامانه ها یک هفته نگهداری در منهای بیست درجه سانتیگراد

نانو کپسول کیتوزان	اندازه (نانومتر)	پتانسیل زتا (mV)	PDI
سنتز شده	۳۳/۱۳	۲۰۲	۰/۳۷۵
نگهداری شده	۳۳/۳۹	۲۳۸	۰/۴۰۱

### بررسی مورفولوژی نانوکپسولها

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شده از نانو کپسول های حاوی فراکسیون در شکل ۳ نمایش داده شده اند. ساختار لایه ای مشاهده شده با قطر ذرات مشابه به نتایج DLS نشان دهنده موفقیت در سنتز نانوکپسول هایی با اندازه مطلوب است. یکنواختی نسبی کپسول های کروی شکل و پراکنش اندازه آنها بخوبی در تصاویر مشهود است.



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه شده از نانو کپسول های تولید شده در تیمار بهینه حاوی فراکسیون پپتیدی

### بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد که هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم آلکالاز طبق شرایط بهینه ذکر شده و استفاده از اولترافیلتراسیون می تواند راهکار مناسبی برای تولید هیدرولیز پروتئینی و جداسازی فراکسیون های پپتیدی با وزن مولکولی پایین از ضایعات سر میگوی وانامی باشد. بر اساس فرمول ارائه شده طول پپتیدهای تولید شده در طی فرایند هیدرولیز تا حد زیادی متاثر از شرایط هیدرولیز درجه هیدرولیز می باشد به این معنی که با افزایش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی کوتاه تر خواهد بود. در مطالعه حاضر درجه هیدرولیز ضایعات سر میگو توسط آنزیم آلکالاز معادل  $57 \pm 2/37$  درصد محاسبه شد. در مطالعات دیگر درجه هیدرولیز ۲۸٪ برای هیدرولیز آنزیمی ضایعات پوست ماهی قزل آلا گزارش شده است [۳۳] که به نظر می رسد این تفاوت می تواند مربوط به شرایط هیدرولیز و منبع تولید هیدرولیز باشد [۳۴].

روش ژلاسیون یونی به طور گسترده ای برای تولید نانو کپسول های حاوی مواد غذایی با استفاده از کیتوزان و ماده ای غیر سمی و چند ظرفیتی مانند تریپلی فسفات (TPP) مورد استفاده قرار گرفته است [۳۵، ۳۲]. در این راستا غلظت، نسبت مواد تشکیل دهنده، روش اختلاط و pH از عوامل تأثیرگذار در فرآیند ژل سازی هستند [۳۳]. حساسیت به pH و شاخص پراکندگی زیاد به عنوان اشکال این روش در نظر گرفته می شود [۳۶]. در این تحقیق بهینه سازی کپسوله سازی نشان داد تیمار نسبت ۲:۱ کیتوزان به پلی فسفات و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر منجر به تولید کپسول هایی با شاخص پراکندگی (PDI)، پتانسیل زتا (mV) و اندازه به ترتیب شامل ۰/۳۷۵، ۲۰۲۰ و ۳۰/۱۳ نانومتر شد و شرایط نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تأثیر چندانی بر کیفیت نانوکپسول ها نداشت. بر همین اساس نتایج سنتز نانوکپسول های کیتوزان در شرایط بهینه منجر به کپسوله شدن بیش از ۹۰ درصد از پپتید مورد نظر شده است.



در مطالعه Othman و همکاران<sup>[۳۷]</sup> برای بهینه سازی کپسوله سازی L-Ascorbic Acid و Thymoquinone بصورت توام در نانوکپسول های کیتوزان، اندازه  $141/5 \pm 7/8$  نانومتر و شاخص PDI معادل  $0/207 \pm 0/013$  با کارایی ۲۲ تا ۳۵ درصد به ترتیب برای L-Ascorbic Acid و Thymoquinone بدست آمد. درحالیکه کارایی کپسوله سازی حدود ۶۹٪ برای حالتی که فقط یک ترکیب کپسوله شده بود بدست آمد. در مطالعه ای دیگر توسط Honary و همکاران<sup>[۳۸]</sup> نشان داده شد که در شرایط مطلوب برای تولید نانوذرات کیتوزان بارگزاری شده با 5-Fluorouracil غلظت کم ۰/۵-۱، غلظت متوسط ۰/۵-۰/۸ و غلظت بالا ۰/۵-۰/۷۵ میلی گرم در میلی لیتر کیتوزان و نسبت کیتوزان: TPP ۴ یا ۶، ذراتی در دامنه قطر متوسط ۱۱۴-۱۸۸ نانومتر و بازده کپسوله سازی بین ۴۲-۵۵٪ تولید می شود. در مطالعه حاضر کارایی کپسوله سازی بالای ۹۰ در اندازه تقریبی ۳۰ تا ۴۰ نانومتر بدست آمد که می تواند مربوط به ماهیت هسته کپسوله شده یا درجه داستیلاسیون کیتوزان مورد استفاده مرتبط باشد. همچنین بهترین تیمار ب در شرایط ترکیب کیتوزان: TPP با نسبت ۵:۲ و غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر کیتوزان دست آمد. نانو سامانه های تولید شده به دلیل ابعاد کوچکشان می توانند بطور مستقیم وارد مجاری گردش خون شده و برای دارورسانی هدفمند بکار گرفته شوند. حضور گروه های عاملی متعدد و ساختار شیمیایی کیتوزان امکان اصلاحات ساختاری را فراهم و دارورسانی هوشمند یا هدف دار را میسر می سازد.

منا سب بودن فرمولا سیون های نانو حامل برای یک مسیر خاص از تجویز دارو به پارامترهای دیگر به قطر متوسط، PDI و پایداری اندازه آنها بستگی دارد<sup>[۳۹]</sup>. شاخص پراکندگی بین ۰/۱ تا ۰/۴ نشان دهنده حضور ذرات با اندازه مختلف می باشد که در تحقیق حاضر تیمار انتخاب شده بعنوان تیمار بهینه شاخص PDI در این محدوده بود. شاخص پراکندگی یا Polydispersity index بصورت عددی بین صفر تا یک بوده و نشان دهنده میزان پراکندگی ذرات از نظر اندازه می باشد. هرچه این مقدار نزدیک به عدد صفر باشد نشان دهنده یکدست بودن اندازه ذرات می باشد که مقادیر قابل قبول بسته به هدف آزمایش میتواند متفاوت باشد. PDI بین صفر تا ۰/۱ بصورت ذرات با اندازه کاملاً یکنواخت و بیشتر از ۰/۷ نامناسب شمرده می شود. پتانسیل زتای نمونه، در تعیین تمایل ذرات درون مایع برای اتصال به یکدیگر مورد استفاده قرار می گیرد. بطور کلی محلول یا کلوئید با پتانسیل زتای بزرگتر از ۶۱ به عنوان محلول های با پایداری بسیار بالا در نظر گرفته می شوند<sup>[۴۰]</sup>. در مطالعه حاضر پتانسیل زتا در تمام تیمارها بسیار مناسب ارزیابی شدند و در تیمار بهینه معادل ۲۰۲ اندازه گیری شد.

خصلت آب دوستی کیتوسان ویژگی مهمی برای تشکیل نانوذرات خود تجمع است و به طور ذاتی برای کاربردهای دارورسانی مناسب است. مطالعات اندکی در زمینه ریزپوشانی یا کپسوله سازی فراکسیون های پپتیدی بدست آمده از ضایعات انجام شده است با این حال طیف وسیعی از ترکیبات زیست فعال از جمله اسانس های گیاهی توسط کیتوزان کپسوله شده اند. کارایی کپسوله سازی به ماهیت هسته (دارو) و شرایط آزمایش بستگی دارد. بیشترین کارایی کپسوله سازی در این زمینه توسط<sup>[۳۸]</sup> برای محصور سازی اسانس هل با استفاده از روش ژلاسیون یونی TPP-chitosan گزارش شده است. آنها نانوکامپوزیت ها را در محدوده اندازه ۵۰-۱۰۰ نانومتر با اثر ضد میکروبی قابل توجهی در برابر *S. aureus* و *E. coli* تشکیل دادند. در مطالعه حاضر کارایی بالای ۹۱ درصد برای کپسوله سازی در تیمار بهینه مشاهده شد.

کیتوزان یک آمینو پلی ساکارید خطی ترکیبی از رابط های به طور تصادفی پراکنده شده (۴→۱) واحدهای D-گلوکز آمین و N-استیل-D-گلوکز آمین است. تری پلی فسفات با گروه های آمین کیتوزان وارد واکنش شده و سبب ایجاد اتصال عرضی بین کیتوزان و پروتئین میشود. در نتیجه حل شدن تری پلی فسفات در آب دیونیزه، یون های OH و  $P_3O_{10}^{5-}$  را ایجاد می شود که همزمان در محلول TPP وجود دارند و پیک ۳۷۲۵ بر سانتیمتر مربوط باند کششی OH می باشد. برای به دست آوردن بهترین حالت در ترکیب کیتوزان و TPP برای تولید نانوذراتی با اندازه مناسب، نسبت های مختلفی از این دو با هم ترکیب شده و ذرات حاصل از نظر اندازه با هم مقایسه شدند. دیده شد که وقتی کیتوزان به نسبت پنج به دو به TPP اضافه می شود، ذرات تشکیل شده مناسبترین اندازه را داشتند.

بررسی ریخت شناسی توسط عکس برداری میکروسکوپی روبشی نشان داد ذرات تشکیل شده کروی شکل بوده و یکنواختی اندازه ذرات قابل مشاهده بود. در مطالعات انجام شده توسط سایر محققان کروی بودن ساختار نانوکپسول های تشکیل شده گزارش شده است<sup>[۴۱]</sup>. در اتصال بین

تری پلی فسفات و پلیمر خطی کیتوزان فضایی ایجاد می شود که می تواند محل مناسبی برای ذخیره سازی مواد زیست فعال مورد استفاده قرار گیرد. تشکیل نانوکپسول های کیتوزان حاوی فراکسیون پپتید و کارایی بالای کپسوله سازی می تواند به ماهیت به فراکسیون مرتبط باشد. ثابت شده است که اکثر پپتید های زیست فعال دارای بار الکتریکی مثبت می باشند و این مهم می تواند در به دام افتادن آنها در نانوکپسول ها بسیار موثر باشد. در تحقیق حاضر غلظت های مختلف از فراکسیون جدا شده ابتدا با تری پلی فسفات مخلوط و سپس به محلول کیتوزان اضافه شدند. در این مرحله به نظر می رسد پپتید های موجود تا حد زیادی به آنیون چند ظرفیتی تری پلی فسفات متصل و در تماس با کیتوزان به خوبی پوشش داده شوند (شکل ۳).

حضور گروه های عاملی متعدد و ساختار شیمیایی کیتوزان امکان اصلاحات ساختاری را فراهم و دارورسانی هوشمند یا هدف دار را میسر می سازد. این پلی ساکارید کاتیونی به دلیل دسترس پذیری فراوان، چسبندگی بی نظیر، خواص دارویی مناسب و دیگر خواص سودمند بیولوژیکی مثل زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، عدم سمیت و تحریک کم سیستم ایمنی، در موارد بیوپزشکی و داروی مورد توجه گسترده قرار گرفته است. خواص فیزیکی شیمیایی و بیولوژیکی کیتوزان به شدت توسط وزن مولکولی و درجه داستیلاسیون، تحت تاثیر قرار می گیرد. کیتوزان به فراوانی به عنوان سیستم دارو رسان برای داروهای با وزن مولکولی کم، پپتیدها یا ژن، مورد استفاده قرار گرفته است [۴۲-۴۴]. همچنین کپسوله کردن مواد دارویی در نانوذرات پلیمری میتواند اثرات درمانی چنین ترکیباتی را بهبود دهد و کیتوزان به عنوان نانوپلیمر زیست تخریب پذیر به دلیل کپسوله کردن بهتر، رهاسازی کنترل شده و سمیت پایین در انتقال دارو بسیار مورد توجه می باشد [۴۵، ۴۶].

### نتیجه گیری

بر اساس نتایج بدست آمده برای درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی، استفاده از آنزیم آلکالاز برای تولید ترکیبات با ارزش افزوده و خواص کارکردی از ضایعات حاوی پروتئین بالا پیشنهاد می شود. در این مطالعه فراکسیون کوچکتتر از ۱۰ کیلودالتون بدست آمده از هیدرولیز آنزیمی ضایعات سر میگوئی و انامی با موفقیت توسط کیتوزان کپسوله و کارایی کپسوله سازی در شرایط بهینه معادل  $91/04 \pm 0/18$  درصد اندازه گیری شد. بنابراین پلیمر کیتوزان در تیمار بهینه سازی شده (تیمار ۶ جدول ۱) برای تولید نانوکپسول های با اندازه ۳۰ تا ۴۰ نانومتر و پایداری بالا ( $PDI > 200$ ) برای ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال پیشنهاد می شود. با توجه به محدود بودن اطلاعات موجود در این زمینه تولید کپسول های حاوی سایر ترکیبات زیست فعال و اثربخشی ها در شرایط برون تنی و درون تنی نیازمند تحقیقات بیشتر می باشد.

**تشکر و قدردانی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تاییدیه های اخلاقی:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**تعارض منافع:** هیچگونه تعارض منافع در مورد داده ها و مقاله ارائه شده وجود ندارد.

**سهام نویسندگان در مقاله:** موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

**منابع مالی/حمایت ها:** این پژوهش با حمایت های مالی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور با شماره طرح ۹۷۰۱۱۷۶۳ انجام شده است.

### منابع

1. Gildberg A, Børgwald J, Johansen A, Stenberg E. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 1996 May 1; 114(1):97-101.

2. Gildberg A, Stenberg E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*. 2001 Mar 1; 36(8-9):809-12.
3. Simpson BK, Nayeri G, Yaylayan V, Ashie IN. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*. 1998 Jan 1; 61(1-2):131-8.
4. Mizani MA, Aminlari M, Khodabandeh M. An effective method for producing a nutritive protein extract powder from shrimp-head waste. *Food science and technology international*. 2005 Feb; 11(1):49-54.
5. Kandra P, Challa MM, Kalangi Padma Jyothi H. Efficient use of shrimp waste: Present and future trends. Vol. 93, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012: 17-29.
6. Shahidi F, Ambigaipalan P. Novel functional food ingredients from marine sources. Vol. 2, *Current Opinion in Food Science*. 2015. p. 123-9.
7. Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*. 2012 Dec 15; 135(4):3020-38.
8. De Holanda HD, Netto FM. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*. 2006 Jun; 71(5): 298-303.
9. Hou Y, Wu Z, Dai Z, Wang G, Wu G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2017 Dec; 8(1):1-3.
10. Mohanty DP, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 20016 Sep 1; 23(5):577-83.
11. Erdmann K, Cheung BW, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008 Oct 1; 19(10):643-54.
12. Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*. 2014 Feb 1; 122:15-27.
13. Li-Chan EC. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*. 2015 Feb 1; 1:28-37.
14. Vilaça N, Amorim R, Martinho O, Reis RM, Baltazar F, Fonseca AM, Neves IC. Encapsulation of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid into a NaY zeolite. *Journal of Materials Science*. 2011 Dec; 46(23):7511-6.
15. Jonassen H, Kjøniksen AL, Hiorth M. Stability of chitosan nanoparticles cross-linked with tripolyphosphate. *Biomacromolecules*. 2014 Nov 12; 13(11):3747-56.
16. Mosquera M, Giménez B, Da Silva IM, Boelter JF, Montero P, Gómez-Guillén MC, et al. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*. 2014; 156:144-50.
17. Hosseinnejad M, Jafari SM. Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016 Apr 1; 85:467-75.
18. Hu Q, Luo Y. Polyphenol-chitosan conjugates: Synthesis, characterization, and applications. *Carbohydrate polymers*. 2016 Oct 20; 151:624-39.
19. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine drugs*. 2015 Mar; 13(3):1133-74.
20. Pujana MA, Pérez-Álvarez L, Iturbe LC, Katime I. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*. 2013 May 15; 94(2):836-42.
21. Ramimoghadam D, Bagheri S, Abd Hamid SB. Stable monodisperse nanomagnetic colloidal suspensions: an overview. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015; 133:388411.

22. Rajabi H, Jafari SM, Rajabzadeh G, Sarfarazi M, Sedaghati S. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2019 Oct 5; 578:123644.
23. Akbari-Alavijeh S, Shaddel R, Jafari SM. Nanostructures of chitosan for encapsulation of food ingredients. In *Biopolymer nanostructures for food encapsulation purposes*. 2019 Jan 1; 381-418.
24. Katouzian I, Jafari SM. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*. 2016 Jul 1; 53:34-48.
25. Bugnicourt L, Ladavière C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2016 Sep 1; 60:1-7.
26. Bulmer C, Margaritis A, Xenocostas A. Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochemical Engineering Journal*. 2012 Oct 15; 68:61-9.
27. Detsi A, Kavetsou E, Kostopoulou I, Pitterou I, Pontillo ARN, Tzani A, et al. Nanosystems for the encapsulation of natural products: The case of chitosan biopolymer as a matrix. *Pharmaceutics*. 2020; 12(7):1-68.
28. Jamil B, Abbasi R, Abbasi S, Imran M, Khan SU, Ihsan A, et al. Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: in-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Frontiers Microbiology*. 2016; 7:1580.
29. Rashidian G, Abedian Kenari A, Nikkhah M. Evaluation of antioxidative and antibacterial activities of fractionated hydrolysate from shrimp *Litopenaeus vannamei* head wastes against aquatic pathogenic bacteria. *Aquaculture Research*. 2021 Mar 19.
30. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 May 7; 72(1-2):248-54.
31. Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *Functionality and Protein Structure*; 1979 125-146.
32. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug; 227(5259):680-5.
33. Wang T, Zhu XK, Xue XT, Wu DY. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. *Carbohydrate polymers*. 2012 Mar 17; 88(1):75-83.
34. Kristinsson HG, Rasco BA. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000 Mar 20; 48(3):657-66.
35. Akbari-Alavijeh S, Shaddel R, Jafari SM. Encapsulation of food bioactives and nutraceuticals by various chitosan-based nanocarriers. *Food hydrocolloids*. 2020 Aug 1; 105:105774.
36. Katouzian I, Jafari SM. Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins. *Trends in Food Science & Technology*. 2016 Jul 1; 53:34-48.
37. Othman N, Masarudin MJ, Kuen CY, Dasuan NA, Abdullah LC. Synthesis and optimization of chitosan nanoparticles loaded with L-ascorbic acid and thymoquinone. *Nanomaterials*. 2018 Nov; 8(11):920.
38. Honary S, Ebrahimi P, Hadianamrei R. Optimization of size and encapsulation efficiency of 5-FU loaded chitosan nanoparticles by response surface methodology. *Current drug delivery*. 2013 Dec 1; 10(6):742-52.
39. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018 Jun; 10(2):57.
40. Kumar A, Dixit CK. Methods for characterization of nanoparticles. In: *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids*. Elsevier; 2017; 43-58.

41. Chauhan N, Dilbaghi N, Gopal M, Kumar R, Kim KH, Kumar S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *International journal of biological macromolecules*. 2017 Apr 1; 97:616-24.
42. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews*. 2010 Jan 31; 62(1):28-41.
43. Lima HA, Lia FM, Ramdayal S. Preparation and characterization of chitosan-insulin-tripolyphosphate membrane for controlled drug release: Effect of cross linking agent. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2014 Sep 30; 5(04):211.
44. Sacco P, Borgogna M, Travan A, Marsich E, Paoletti S, Asaro F, Grassi M, Donati I. Polysaccharide-based networks from homogeneous chitosan-tripolyphosphate hydrogels: Synthesis and characterization. *Biomacromolecules*. 2014 Sep 8; 15(9):3396-405.
45. Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, Tang ZX. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2011 Sep; 28(3):353-62.

# Production and optimization of chitosan nanosystems loaded with peptide fraction obtained from enzymatic hydrolysis of vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) head wastes

Ghasem Rashidian<sup>1</sup>, Abdolmohammad Abedian Kenari<sup>1\*</sup>, Maryam Nikkhah<sup>2</sup>

1. Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

2. Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate optimization of encapsulation of peptide fraction smaller than 10 kDa obtained from enzymatic hydrolysis of shrimp head wastes (*Litopenaeus vannamei*) by chitosan. Based on ion gelation method (chitosan-tripolyphosphate) encapsulated was optimized based on different ratios of chitosan: triphosphate and different concentrations of peptide fractions including 1, 5 and 10 mg/ml. Based on the results, alkalase enzyme hydrolyzed shrimp head wastes with  $57 \pm 2.37$  degree of hydrolysis and according to the conditions of this experiment, the peptide chain length was 1.175 and molecular weight was close to 10 kDa. The particle size varied in different concentrations and treatments, and ranged from 30 to 150 nm, with the best results from encapsulation optimization in a 2: 1 ratio of chitosan to TPP and Concentration of 10 mg/ml. The PDI, zeta potential, and size of nanocapsules in the optimal conditions were 0.375, 2020 and 30.13 nm, respectively, and storage conditions at -20 °C had limited effect on the quality of nanocapsules. Our findings suggest that chitosan can be well used for nanocapsulation of peptide fractions smaller than ten kDa with an efficiency of  $91.04 \pm 0.18\%$ .

**KEYWORDS:** Nanocapsulation, Nanochitosan, Bioactive peptide, Shrimp waste, Enzymatic hydrolysis.

## ARTICLE TYPE

Original Research

## ARTICLE HISTORY

Received: 30 March 2021

Accepted: 20 April 2021

ePublished: 31 May 2021

\* Corresponding Author:

Email address: aabedian@modares.ac.ir

Tel: +98 1144553101

© Published by Tarbiat Modares University

eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513