

Priprema i karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim bioaktivnim hidrolizatom proteina soje

Neda V. Pavlović¹, Jelena R. Jovanović², Verica B. Đorđević³, Bojana D. Balanč¹,
Branko M. Bugarski³ i Zorica D. Knežević-Jugović²

¹Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu d.o.o., Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Republika Srbija

²Katedra za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Republika Srbija

³Katedra za hemijsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Republika Srbija

Izvod

Komercijalna primena hidrolizata proteina soje još uvek je ograničena zbog male bioraspoloživosti peptida, gorkog ukusa, higroskopnosti i reaktivnosti u prehrambenim proizvodima. Cilj ovog istraživanja jeste inkapsulacija hidrolizata soje u lipozome kako bi se prevazišli navedeni nedostaci, uz očuvanje bioloških aktivnosti. Hidrolizat soje inkapsuliran je u lipozome metodom tankog filma koristeći lipidnu smešu sa fosfatidilholinom. Dobijene multilamelarne vezikule tretirane su ultrazvučnim talasima visokog intenziteta frekvence 20 - 40 kHz. Najmanji i najuniformniji lipozomi, unimodalne raspodele i srednje veličine prečnika 310 nm, sa najvećom efikasnošću inkapsulacije hidrolizata od ~19 %, dobijeni su primenom ultrazvučne sonde (20 kHz). Utvrđeno je da je inkorporiranje hidrolizata ostvareno unutar lipozomne membrane uzrokovalo povećanje veličine lipozoma, npr. sa 297 na 310 nm. Sve formulacije lipozoma okarakterisane su negativnom vrednošću zeta potencijala, pri čemu je povećanje negativnog naelektrisanja ispod 30 mV u slučaju multilamelarnih vezikula ukazalo na veću stabilnost lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom. Merenjem sposobnosti inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona i sposobnosti heliranja Fe²⁺ jona potvrđeno je zadržavanje antioksidativne aktivnosti hidrolizata soje nakon inkapsulacije. Pripremljene lipozomne formulacije obezbeđuju produženo oslablađanje hidrolizata (2,25 puta manje) u odnosu na neinkapsuliran hidrolizat pokazujući potencijal primene u oblasti prehrambene tehnologije, za razvoj funkcionalne hrane, povećanje hranljive vrednosti i roka trajanja prehrambenih proizvoda.

Ključne reči: hidrolizat proteina soje; biološki aktivni peptidi; inkapsulacija; lipozomi; ultrazvuk visokog intenziteta; kontrolisano otpuštanje.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

NAUČNI RAD

UDK: 602.628-02:633.34::581.134

Hem. Ind. 74 (5) 327-339 (2020)

1. INTRODUCTION

Jedan od ozbiljnijih problema sa kojim se susreće prehrambena industrija je lipidna oksidacija prehrambenih proizvoda tokom skladištenja, koja dovodi do gubitka nutritivnog kvaliteta i promene ukusa proizvoda, bezbednosti i roka trajanja. Zbog toga, u procesima proizvodnje pribegava se kontrolisanju i sprečavanju lipidne oksidacije dodavanjem sintetičkih antioksidanata, butil-hidroksianizola (BHA) i butil-hidroksitoluena (BHT). Međutim, u najsavremenijim tehnološkim procesima proizvodnje pribegava se primeni prirodnih i manje štetnih antioksidanata, među kojima posebno mesto zauzimaju nativni proteini poreklom iz biljaka, njihovi hidrolizati i izolovane frakcije peptida [1]. Zato, proizvodnji hidrolizata proteina soje, koji predstavljaju odličan izvor hranjivih materija i koji se mogu koristiti kao izvor peptida nosioca bioloških aktivnosti poput antioksidativne [2], posvećuje se sve više pažnje među istraživačima. Između

Autor za korespondenciju: Zorica D. Knežević-Jugović, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Karnegijeva 4, 11000 Beograd, Srbija

E-mail: zknez@tmf.bg.ac.rs; Tel: +381113303776, Faks: +381113370387

Rad primljen: 30. maj 2020

Rad prihvaćen: 18. oktobar 2020

<https://doi.org/10.2298/HEMIND200530030P>



nekoliko različitih tehnologija za proizvodnju hidrolizata proteina soja, primena enzimske tehnologije je vrlo pogodna zbog blagih reakcionih uslova koji se koriste i specifičnosti delovanja enzima na native proteine soja što omogućava precizno kontrolisanje reakcije hidrolize i prilagođavanje toka reakcije željenim bioaktivnim svojstvima [1–4]. Vrsta proteolitičkih enzima i uslovi izvođenja hidrolize čine osnovne procesne parametre koji utiču na bioaktivna i funkcionalna svojstva hidrolizata, a koji su usko povezani sa:

- 1) promenama u molekularnoj strukturi nativnih proteina,
- 2) smanjenjem veličine polipeptidnih lanaca i
- 3) većom površinskom izloženošću polarnih i hidrofobnih grupa.

Enzimskim postupkom dobijeni hidrolizati proteina soja poseduju unapređena tehnološko-funkcionalna i nutritivna svojstva, dok nastali peptidi imaju bolju bioraspoloživost i ispoljavaju veću bioaktivnost u odnosu na native proteine veće molekulske mase [2,3]. Dobra fizičko-hemijska i tehnološko-funkcionalna svojstva hidrolizata soja odnose se pre svega na sposobnost vezivanja i apsorpcije vode, rastvorljivost i geliranje, površinsku aktivnost, emulgujuća i reološka svojstva i kapacitet vezivanja ulja. Dokazano je da se proteini soja i njihove izolovane proteinske frakcije koriste u medicinske svrhe kao što su prevencija kancera, kardiovaskularnih oboljenja, osteoporoze, dijabetesa i tretiranje gojaznosti [5].

Pregledom literaturnih podataka, uočava se da je u zavisnosti od porekla proteina, vrste enzima i procesnih parametara, antioksidativna aktivnost dobijenih hidrolizata proteina soja poprilično različita. Na primer, hidrolizovani proteini soja, odnosno smeše peptida inhibiraju slobodne radikale DPPH* (78 %) i ABTS** (88 %), ali i obrazovanje reaktivnih vrsta tiobarbiturinske kiseline u model sistemu sa svinjskim mesom (62 %) i mesom lososa (65 %) [3], proces lipidne oksidacije u model sistemu sa fosfatidilholinom (28 do 65 %) [6], i u model sistemu emulzije sa triacilglicerolom [7]. Čen (Chen) i sar. [4] izolovali su šest antioksidativnih fragmenata peptida iz β -konglicinina, glavnog sojinog skladišnog proteina. Pored velike primene u prehrambenoj industriji zbog izraženog antioksidativnog delovanja, potvrđeno je da se peptidi soja mogu koristiti i u farmaceutskoj industriji, kao sastavni deo krema koje se koriste za poboljšanje elastičnosti kože, stimulišući sintezu kolagena [8].

Međutim, pored svih pozitivnih efekata koje sojini peptidi ispoljavaju, postoji niz nedostataka koji ograničavaju njihovu širu primenu u prehrambenoj industriji u koje se ubrajaju: smanjena digestibilnost, potencijalna alergnost, slaba apsorpcija, pojava gorkog ukusa, nestabilnost i degradacija prilikom inkorporiranja u prehrambene proizvode što dovodi do gubitaka bioloških aktivnosti [9]. Tehnologija inkapsulacije nameće se kao jedno od rešenja kojim bi se prevazišli navedeni nedostaci i poboljšala primena peptida soja, kako u prehrambenim, tako i u farmaceutskim formulacijama. Danas, nekoliko tehnika smatra se relevantnim, a istovremeno su i najzastupljenije, za inkapsulaciju proteinskih hidrolizata i peptida:

- 1) hidriranje lipidnog filma (priprema lipozoma i liposfera),
- 2) sprej sušenje (priprema mikrosfera na bazi polisaharida i proteina) i
- 3) koacervacija (priprema koacervata sa hidrofilnim omotačem) [10,11].

Lipozomi i liposfere predstavljaju konvencionalne nosače za inkapsulaciju proteinskih hidrolizata i peptida. U poređenju sa liposferama, lipozomi su uspešniji sistemi za inkapsulaciju proteina zbog svojih višestrukih prednosti: biorazgradljivosti, niske toksičnosti i slabe imunogenosti, poboljšanje rastvorljivosti bioaktivne komponente, i mogućnosti površinskih modifikacija zarad ciljanog, produženog i neprekidnog otpuštanja proteina [11,12]. Svaka lipozomna koloidna čestica sadrži polarne, nepolarne i amfifilne delove, čineći liposome na taj način biokompatibilnim, kako sa hidrofobnim, tako i sa hidrofilnim bioaktivnim peptidima [13,14]. Primarni izazov sa kojim se suočava postupak implementacije bioaktivnih peptida u komercijalne prehrambene proizvode jeste osteljivost peptida u gastrointestinalnom traktu na dejstvo digestivnih enzima, pepsina u želudcu i alkalne proteaze u pankreasu, čijim delovanjem dolazi do smanjenja dužine i promene sekvence peptida, i gubitka njihove biološke funkcije [15]. Nedostaci lipozoma kao nosača za inkapsulaciju proizilaze od njihove loše stabilnosti usled oksidacije i hidrolize lipida, cepanja i fuzije koloidnih čestica, i posledičnog gubitka hidrofilnog jezgra. Navedeni nedostaci uspešno se prevazilaze dodavanjem stabilizatora, antioksidanata i post-preparativnim postupcima kao što je zamrzavanje [10,11].

Prema dostupnim literaturnim podacima, do sada su se lipozomi ograničeno ispitivali za inkapsulaciju hidrolizata proteina surutke [16], kazeina [13,17,18], pasulja [19] i ribljih proteina [20], ali podaci o inkapsulaciji hidrolizata proteina soje u lipozome izostaju. Stoga, cilj ovog rada bio je ispitivanje mogućnosti upotrebe lipozoma kao nosača za inkapsulaciju proteinskih hidrolizata soje, ispitivanje uticaja procesa inkapsulacije na antioksidativnu aktivnost hidrolizata proteina soje, ali i praćenje oslobađanja inkapsuliranih peptida u simuliranim gastrointestinalnim uslovima.

2. MATERIJALI I METODE

2. 1. Materijali

Proteinski koncentrat soje (komercijalan naziv TRADCON F200, granulacija: min 90 % < 0,075 mm, sadržaj proteina: sirovi proteini $70,96 \pm 1,77$ % s.m., sadžaj ulja: 1 %) korišćen kao supstrat u ovom radu nabavljen je od proizvođača Sojaprotein A.D., Bečej, Srbija. Proteolitički enzimi Neutraza, sa endopeptidaznom aktivnošću, komercijalnog naziva Neutrase® 0.8L (proteaza iz *Bacillus amyloliquefaciens*) i Flevorzim, enzim sa endo- i egzopeptidaznom aktivnošću, komercijalnog naziva Flavourzyme® (proteaza iz *Aspergillus oryzae*) obezbeđeni su od firme *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, SAD). Za pripremu lipozoma, nosača za inkapsulaciju bioaktivnog hidrolizata proteina soje, korišćen je Fosfolipon komercijalna lipidna smeša koja sadrži fosfatidil holin (94,0–102,0 %), lizofosfatidil holin (4,0 %) i tokoferol (0,3 %), a stabilizovana je askorbil-parmitatom (0,1 %) (*engl.* Phospholipon® 90G; *Natterman Phospholipids*, Nemačka) i hloroform (*Merck*, Nemačka). Biološka aktivnost pripremljnih hidrolizata proteina soje i lipozoma sa inkapsuliranom smešom peptida soje ispitana je testiranjem antioksidativne aktivnosti, a za pripremu neophodnih rastvora korišćeni su: 2,2'-azino-bis(3-etilbezotiazolin-6-sulfonska kiselina)-diamonijumova so, ABTS (*Alfa Aesar*, Masačusets, SAD); gvožđe (II)-hlorid (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD), natrijumova so 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-disulfonske kiseline, ferozin (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD); fosfatni pufer sa dodatkom soli, PBS pufer (*engl.* phosphate-buffered saline, *Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina, Troloks (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD) i etilendiamintetrasircetna kiselina, EDTA (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, SAD). Oslobađanje inkapsuliranih peptida ispitano je primenom model sistema sa želudačnim i pankreasnim sokom za čiju pripremu su korišćeni pepsin (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, SAD), žučne soli (*Biolife*, Italija), i pankreatin (*MP Biomedicals, LLC*, Francuska). Svi ostali korišćeni hemijski reagensi (albumin iz goveđeg seruma, *Folin-Ciocalteu* reagens, natrijum-hidroksid, natrijum-dihidrogen fosfat monohidrat, dinatrijum-hidrogen fosfat anhidrovan) bili su analitičke čistoće i nabavljeni od firme *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, SAD).

2. 2. Enzimska hidroliza proteinskog koncentrata soje

Dvostepena enzimska hidroliza proteinskog koncentrata soje izvedena je u šaržnom reaktoru zapremine 400 cm³, sa mehaničkim mešanjem korišćenjem propelerske mešalice sa tri propelera pri broju obrtaja 200 min⁻¹ i termoparom za automatsku regulaciju temperature, prema ranije publikovanom protokolu sa manjim izmenama [21]. Proteinski koncentrat soje, masene koncentracije 8 % (w/w), dispergovan je u dejonizovanoj vodi (18,2 MΩ, TOC<4 ppm; uređaj *Milli-Q purification system*; *Merck Millipore Advantage A10*, Darmštadt, Nemačka), homogenizovan mešanjem 1 min i termostatiran na 45 °C tokom 20 min, nakon čega je dodavanjem 1 M rastvora NaOH podešena vrednost pH 7. Na ovaj način, ostvareni su optimalni reakcioni uslovi za dodavanje prve proteaze Neutrase. Količina dodate proteaze određena je na osnovu masenog E/S odnosa, uzimajući u obzir količinu proteina u supstratu, 4 % (w/w). Proteini soje hidrolizovani su Neutrazom do postizanja stepena hidrolize ~7 % tj. do isteka 45 min reakcije, nakon čega je reakcionoj smeši podešena vrednost pH 7 i dodat drugi enzim Flevorzim u masenom odnosu E/S 4 %, a reakcija je vođena pri optimalnoj temperaturi od 50 °C. Po završetku hidrolize, posle tri sata, proteaze su inaktivirane zagrevanjem reakcione smeše 10 min na 90 °C, nakon čega je smeša ohlađena do sobne temperature i centrifugirana pri brzini 10000 × g u toku 10 min. U cilju dobijanja praškastih proizvoda dekantovan je supernatant, proteinski hidrolizat - smeša peptida soje, sakupljen je i osušen u sprej sušnici (*Mini Buchi B-290 spray-dryer*; *BÜCHI Labortechnik AG*, Švajcarska), a kao takav korišćen u daljim fazama istraživanja.

Standardizovanom metodom po Kjeldalu (Kjeldahl) (ISO 5983-2:2005 prema AOAC metodi) [20] određen je sadržaj sirovih proteina u hidrolizatu ($N \times 6,25$), a radi utvrđivanja specifičnosti proteaza i srednje veličine dužine peptidnih lanaca određen je stepen hidrolize prema ranije opisanoj ninhidrinskoj metodi [21].

2. 3. Priprema lipozoma metodom tankog filma

Lipozomi su pripremljeni metodom tankog filma, pri čemu je u prvom koraku 0,1 g fosfolipida rastvoreno u 5 cm³ hloroforma, nakon čega je izvršeno kompletno uklanjanje rastvarača do nastajanja tankog filma, na vakuum uparivaču (*Rotavapor® R-210, BÜCHI Labortechnik AG, Flaviil, Švajcarska*) pri temperaturi od 40 °C i pritisku od 474 mbar, tokom sat vremena. Tanak film koji se obrazuje na zidovima balona sušen je 15 min. U drugom koraku, za hidrataciju lipidnog filma i formiranje lipozoma, 2 cm³ smeše proteinskog hidrolizata soje (5 mg cm⁻³) je razblaženo sa 3 cm³ zagrejanog natrijum-fosfatnog pufera (0,01 M, pH 7, 60 °C). Nakon hidratacije izvršeno je pet ciklusa grejanja (60 °C) i hlađenja (sobna temperatura) u trajanju od 2 min, sa napomenom da je u ciklusima hlađenja vršeno intenzivno „vorteksiranje“, u prisustvu staklenih kuglica prečnika 3 mm. Kao kontrola pripremljeni su prazni lipozomi bez dodatka proteinskog hidrolizata soje hidratacijom lipidnog filma zagrejanim puferom. Smanjenje i standardizacija veličine lipozoma izvedeni su ultrazvučnim talasima visokog intenziteta, generisanim ultrazvučnom sondom frekvence 20 kHz i amplitude 30 % (*Sonopuls Ultrasonic Homogenizers, HD 2200 Bandelin, Nemačka*) u tri ciklusa. Svaki ciklus obuhvatio je soniciranje u trajanju od 20 s i hlađenje 1 min. Prilikom izvođenja soniciranja suspenzija lipozoma je održavana na konstantno istoj temperaturi od 5–6 °C, kako bi se izbegao toplotni efekat delovanja ultrazvukom. Pored sonde, za smanjenje veličine čestica lipozoma korišćeno je i ultrazvučno kupatilo radne frekvence 40 kHz (tip USK 28, EI Niš-Ro-Vep, Niš, Srbija) tokom deset ciklusa. Radni ciklusi bili su identični opisanim ciklusima sonikacije ultrazvučnom sondom.

2. 4. Efikasnost inkapsulacije

Efikasnost inkapsulacije peptida soje definisana je kao odnos mase inkapsuliranih peptida soje i mase ukupnih peptida soje, prema ranije opisanom protokolu sa manjim izmenama [16]. Masa inkapsuliranih peptida soje indirektno je određena merenjem koncentracije neinkapsuliranih peptida soje, tako što je nakon pripreme, suspenzija lipozoma centrifugirana pri brzini 13500 o min⁻¹ tokom 45 min na temperaturi 4 °C (mikrocentrifuga sa hlađenjem, *Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Voltam, MA, SAD*). Supernatant je dekantovan i korišćen za kvantitativnu analizu sadržaja proteina. Kvantitativno određivanje sadržaja ukupnih proteina unetih u sistem na početku postupka inkapsulacije i neinkapsuliranih proteina zaostalih u supernatantu nakon centrifugiranja suspenzije lipozoma izvršeno je metodom po Loriju (Lowry) merenjem promene apsorbance na 500 nm [23]. Shodno tome, efikasnost inkapsulacije, E_{ink} , određena je prema sledećoj formuli:

$$E_{\text{ink}} = \frac{m_{\text{ink}}}{m_{\text{uk}}} 100 = \frac{m_{\text{uk}} - m_{\text{sup}}}{m_{\text{uk}}} 100 \quad (1)$$

gde je m_{ink} je masa inkapsuliranih proteina, m_{uk} masa proteina uneta pre inkapsulacije, a m_{sup} masa neinkapsuliranih proteina u odvojenom supernatantu.

2. 5. Karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje

Srednja veličina čestica, raspodela veličina čestica po intenzitetu, kao i polidisperzni indeks (Pdl) pripremljenih suspenzija lipozoma ispitani su metodom laserske difrakcije pomoću uređaja čiji se rad zasniva na foton-korelacionoj spektroskopiji (*Zetasizer Nano Series, NanoZS, Malvern Instruments Ltd., Velika Britanija*). Eksperimentalni podaci predstavljeni u ovom radu srednja su vrednost najmanje osam uzastopnih merenja, pri čemu svaka kriva/merenje predstavlja srednji rezultat od 14 merenja. Na istom uređaju je izvršeno i merenje zeta potencijala pripremljenih uzoraka, tehnikom elektroforetske pokretljivosti i merenjem kretanja čestica u električnom polju. Deset uzastopnih merenja je izvedeno prilikom jednog merenja zeta-potencijala, a svaki uzorak je analiziran tri puta i prikazani podaci predstavljaju srednju vrednost tih merenja. Navedene analize izvršene su dva sata nakon pripreme suspenzije lipozoma, koje su za to vreme čuvane u frižideru na 4 °C.

2. 6. Antioksidativna aktivnost hidrolizata proteina inkapsuliranih u lipozome

Biološka aktivnost pripremljenog hidrolizata proteina soje i lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje ispitana je testiranjem antioksidativne aktivnosti, primenom dva po mehanizmu delovanja različita testa. Ukratko, uzorak rastvora hidrolizata pripremljen je u dejonizovanoj vodi tako da je: a) sadržaj sirovih proteina 5 mg cm^{-3} , b) sadržaj proteina jednak sadržaju inkapsuliranih proteina ($0,38 \text{ mg cm}^{-3}$). Razblaženjem $0,2 \text{ cm}^3$ pripremljenih uzoraka rastvora hidrolizata, zatim neinkapsuliranih (supernatanta) i inkapsuliranih proteina, i praznih lipozoma sa $0,8 \text{ cm}^3$ dejonizovane vode, pripremljeni su polazni rastvori. Dodavanjem $0,1 \text{ cm}^3$ rastvora gvožđe(II)-hlorida koncentracije 2 mM , „vorteksiranjem“ i inkubacijom 3 min na $20 \text{ }^\circ\text{C}$, započeta je reakcija. U drugom koraku, dodato je $0,2 \text{ cm}^3$ rastvora ferozina koncentracije 5 mM , i nakon intenzivnog mešanja inkubirano 10 min na $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Stepen heliranja Fe^{2+} jona kvantifikovan je spektrofotometrijskim merenjem smanjenja apsorbance proizvedenog gvožđe(II)–ferozin kompleksa na 562 nm [21].

Za izvođenje metode kojom je meren kapacitet redukcije ABTS^{*+} radiklaskog katjona, pripremljen je rastvor ABTS u PBS puferu (5 mM , $\text{pH } 7,4$) i kalijum-persulfatu, koncentracije $2,45 \text{ mM}$ i razblažen do apsorbance $0,700 \pm 0,05$ na 734 nm . I ovaj put, pripremljeni su uzorci rastvora hidrolizata, zatim neinkapsuliranih (supernatanta), inkapsuliranih proteina i praznih lipozoma. Test je izveden dodavanjem $0,01 \text{ cm}^3$ pripremljenih uzoraka u 1 cm^3 razblaženog ABTS^{*+} , a kapacitet redukcije radiklaskog katjona kvantifikovan je merenjem promene apsorbance posle 5 min na 734 nm [24].

Za oba testa, kontrolni uzorci pripremljeni su u skladu sa opisanim metodama, ali je umesto pripremljenih uzoraka u reakcionu smešu pipetiran PBS pufer i/ili dejonizovana voda. Stepenski redukcije ABTS^{*+} radiklaskog katjona i/ili stepen heliranja jona metala izraženi u procentima izračunati su kao odnos proreagovale količine ABTS^{*+} radiklaskog katjona i/ili jona gvožđa i ukupne količine radiklaskog katjona i/ili jona gvožđa unetih u reakcioni sistem, redom, prema jednačinama:

$$\text{Stepen redukcije } \text{ABTS}^{*+} = \frac{\text{Količina } \text{ABTS}_{\text{proreagovalo}}}{\text{Količina } \text{ABTS}_{\text{ukupno}}} \cdot 100 = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$\text{Stepen heliranja } \text{Fe}^{2+} = \frac{\text{Količina } \text{Fe}_{\text{proreagovalo}}}{\text{Količina } \text{Fe}_{\text{ukupno}}} \cdot 100 = \frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{kontrola}}} \cdot 100 \quad (3)$$

gde A_{kontrola} i A_{uzorak} predstavljaju spektrofotometrijski očitane vrednosti apsorbanci na odgovarajućim talasnim dužinama. U slučaju formulacije sa inkapsuliranim hidrolizatom, A_{uzorak} predstavlja apsorbancu inkapsuliranih peptida, koja se izračunava kao:

$$A_{\text{uzorak}} = A_{\text{uk}} - A_{\text{neink}} \quad (4)$$

gde je A_{uk} apsorbancu ukupnih proteina u formulaciji lipozoma, a A_{neink} apsorbancu neinkapsuliranih proteina u odvojenom supernatantu.

Radi poređenja sa literaturni podacima, rezultati su izraženi i kao ekvivalenti određenog standarda, troloksa i EDTA, za ABTS^{*+} radiklaskog katjona i Fe^{2+} jone, redom. Naime, kapacitet redukcije ABTS^{*+} radiklaskog katjona izražen je kao troloks ekvivalent antioksidativna aktivnost (*engl.* Trolox Equivalent Antioxidant Activity, TEAA) u $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ proteina. Sposobnost heliranja jona metala predstavljena je kao EDTA ekvivalent antioksidativne aktivnosti (*engl.* EDTA equivalent antioxidant activity, EAA) u $\mu\text{mol EE mg}^{-1}$ proteina.

2. 7. Kontrolisano otpuštanje hidrolizata proteina iz lipozoma

Kinetika otpuštanja proteina iz lipozoma praćena je u standardnoj Francovoj difuzionj ćeliji sa omotačem, zapremine receptorskog dela 20 cm^3 i površine membrane $4,91 \text{ cm}^2$ (*Perme Gear, Inc., SAD*). Primenom ove ćelije ispitan je uticaj lipozomne membrane na difuziju inkapsulirane smeše peptida u model sistemu sa želudačnim i pankreasnim sokom koji su pripremljeni prema ranije opisanoj metodi [25]. Ćelija se sastojala iz dva dela, donorskog i receptorskog, razdvojenih celulozno-acetatnom membranom. Pre početka, Francove ćelije ispunjene želudačnim ili pankreasnim sokom su termostatirane na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 30 min . U donorski deo uneto je 2 cm^3 suspenzije lipozoma sa inkapsuliranim peptidima. S obzirom na činjenicu da su simulirani gastrointestinalni uslovi za koje je poznato da se dejstvo želudačnih sokova ispoljava u toku prvih sat vremena, najpre je praćena difuzija peptida u tom sistemu. U nastavku, difuzija peptida

tokom narednih 4 h praćena je u pankreasnom soku, što simulira dalju digestiju nakon prolaska kroz želudac. Alikvot 0,5 cm³ uzorkovan je iz receptorskog dela u vremenskim intervalima 10 i 30 min za želudaćni i pankreasni sok, redom. Tom prilikom ista kolićina sveжих rastvora želudaćnog i pankreasnog soka vraćana je u receptorski deo. Sadržaj peptida u uzorcima određen je metodom po Loriju (Lowry), a udeo prodifundovanih peptida određen je kao odnos mase peptida tokom digestije i mase unetih inkapsuliranih peptida.

2. 8. Statistićka analiza

Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu ($n = 3$), a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje. U toku analize podataka, a u cilju procene statistićkog znaćaja rezultata korišćena je i jednostruka analiza varijanse sa naknadnim Tuki (Tukey) testom na nivou $p < 0,05$ (One-way ANOVA; OriginPro 9.0, OriginLabCorp., MA, SAD).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3. 1. Karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje

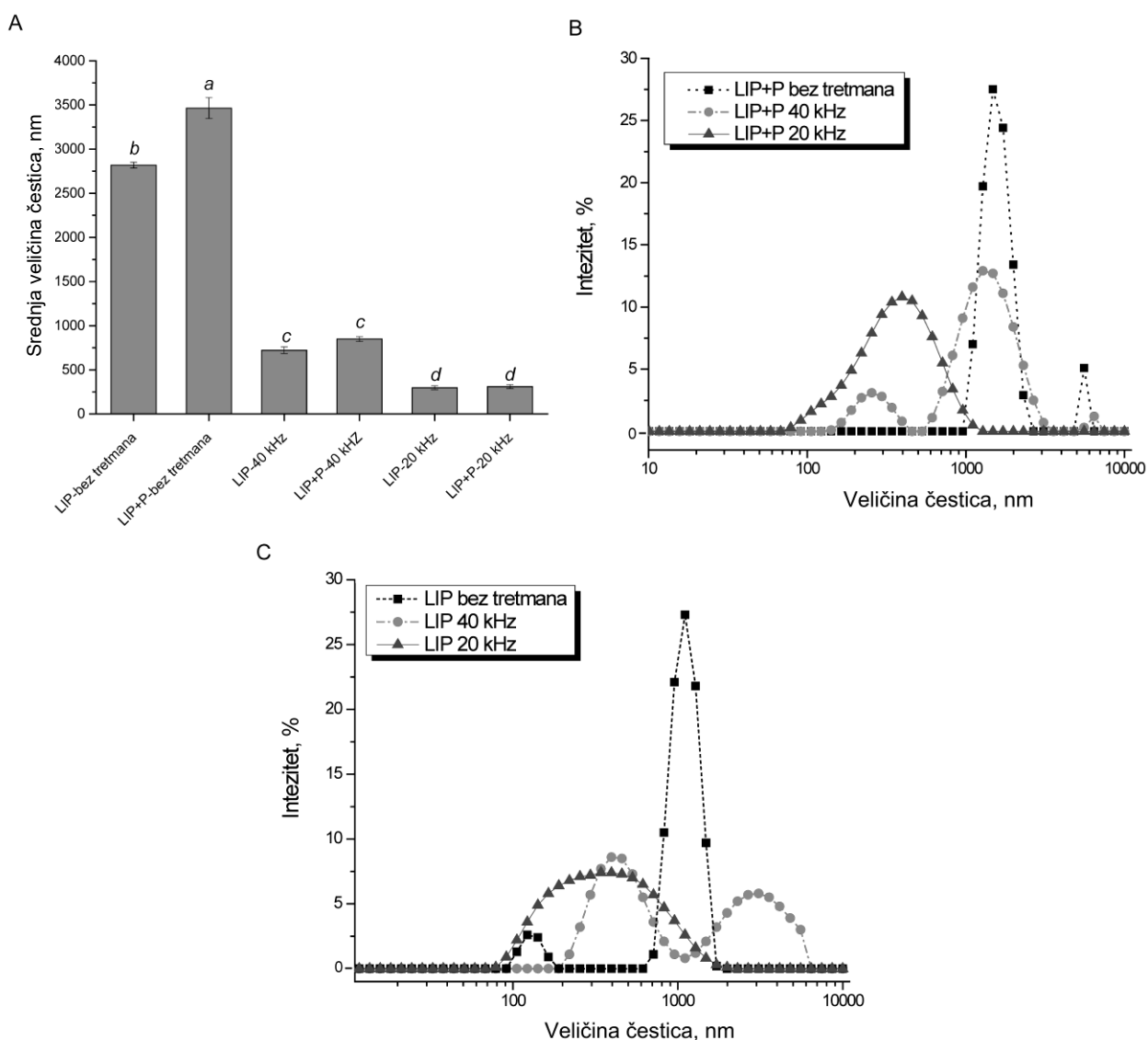
Tokom procesa pripreme lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje, standardnom metodom tankog filma, analiziran je uticaj delovanja ultrazvućnih talasa visokog intenziteta na smanjenje i standardizaciju srednje velićine multilamelarnih lipozoma. Tom prilikom ultrazvućni tretman izveden je na dva razlićita naćina, posredstvom ultrazvućnih talasa generisanih iz ultrazvućnog kupatila frekvence 40 kHz i iz ultrazvućne sonde frekvence 20 kHz. Dodatno, razmatran je uticaj tretmana na efikasnost inkapsulacije hidrolizata proteina soje, velićinu ćestica lipozoma i njihovu stabilnost.

U ovom istraživaniu, pri prethodno opisanim uslovima inkapsulacije, postignut je stepen inkapsulacije vrednosti $19,0 \pm 0,3$ % primenom ultrazvućne sonde, kao i $10,0 \pm 0,4$ % primenom ultrazvućnog kupatila. Prikazane vrednosti manje su u odnosu na literaturne podatke za stepen inkapsulacije hidrolizata proteina u liposome pripravljene fosfatidil holinom i tretirane ultrazvukom. Naime, u istraživaniu inkapsulacije hidrolizata proteina surutke dobijen je stepen inkapsulacije od 48 % [26], dok je druga grupa istraživaa [16] izvestila o stepenu inkapsulacije ćak 90 % i to inkapsulacijom izolovanih frakcija peptida surutke razlićitih molekulskih masa korišćenjem sojinog lecitina kao matriksa, koji pored fosfatidil holina sadri i nećistoće. U literaturi se takoće, mogu naći i drugi primeri sa najrazlićitijim vrednostima efikasnosti inkapsulacije hidrolizata, meću kojima je interesantno istraživanie inkapsulacije hidrolizata ribljih proteina gde je ostvarena efikasnost od ćak 80 % [20]. U drugom radu, postignut je stepen inkapsulacije hidrolizata proteina kazeina 43–46 % [13], dok je ta vrednost bila svega 28 % prilikom inkapsulacije biljinih peptida, tj. hidrolizata proteina pasulja [19]. Ostvarena mala efikasnost inkapsulacije hidrolizata proteina soje (~ 19 i ~ 10 %) u ovom radu, ukazuje na postojanje odbojnih sila izmeću anjonskih polarnih grupa fosfolipida u lipozomima i negativno naelektrisanih grupa hidrolizata proteina soje. Analizom aminokiselinskog sastava pripravljenog hidrolizata soje utvrđeno je da kvantitativno ima više kiselih aminokiselina, *L*-glutaminske i *L*-asparaginske kiseline u odnosu na bazne arginin, lizin i histidin (*rezultati nisu prikazani*). Kvantitativnom analizom udela hidrolizovanih peptidih veza, kao i sadržaja proteina, dobijeno je da je hidrolizom proteinskog koncentrata soje hidrolizovano ćak $22,3 \pm 0,9$ % proteina, dok sadržaj sirovih proteina na s.m. ($N \times 6,25$) iznosi $81,6 \pm 1,1$ %.

Kako bi se utvrdio uticaj dejstva ultrazvućnih talasa na velićinu ćestica pripravljenih lipozoma sa hidrolizatom proteina soje i njihovu raspodelu po intenzitetu, izmerene su srednje velićine ćestica suspenzije lipozoma neposredno pre tretmana i nakon tretmana u ultrazvućnom kupatilu i ultrazvućnom sondom. Dobijene srednje vrednosti velićine ćestica lipozoma sa inkapsuliranim peptidima prikazane su na slici 1A i u poređene su sa vrednostima praznih lipozoma koji nisu sadržali hidrolizat proteina soje, a ćija priprema je izvršena na identićan naćin. Na slikama 1B i 1C data je raspodela velićine ćestica lipozoma.

Netretiranoj suspenziji lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje izmeren je srednji prećnik ćestica od 3464 nm i utvrđena je bimodalna raspodela velićine, sa malim udelom ~ 5 % velikih vezikula u rasponu od 5–6 μm . Lipozomi sonicirani u ultrazvućnom vodenom kupatilu imaju takoće bimodalnu raspodelu centriranu na 850 nm, dok su

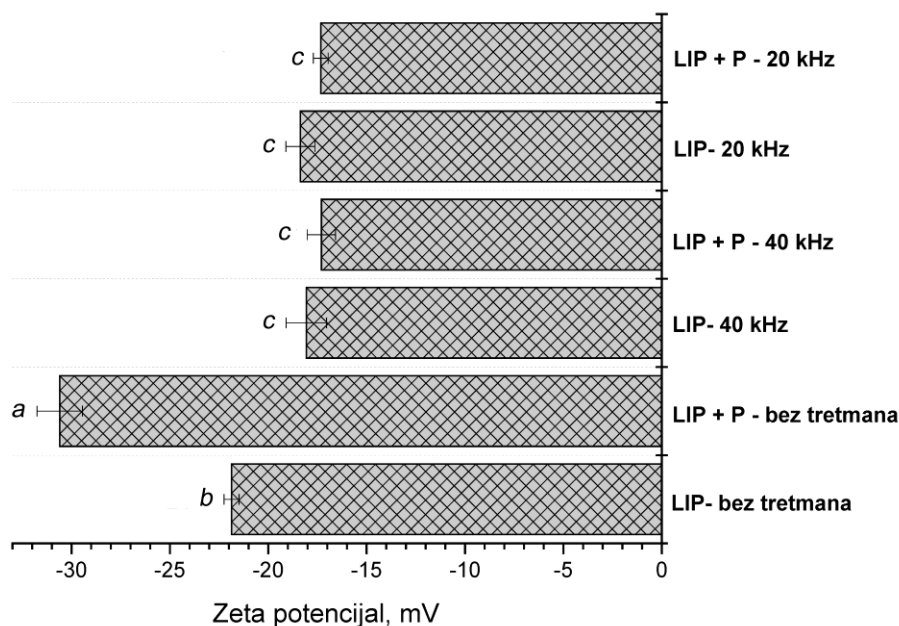
lipozomi pripremljeni ultrazvučnom sondom najmanji (310 nm) i unimodalne distribucije veličina. Dobijeni rezultati su očekivani s obzirom na činjenicu da se soniciranjem dobijaju manje jednolamelarne vezikule (*engl. single unilamellar vesicles*, SUV) u odnosu na početne multilamelarne vezikule (*engl. multilamellar vesicles*, MLV), što se pripisuje fizičkim efektima akustične kavitacije. Dodatno, efikasnost smanjenja veličine lipozoma veća je kod ultrazvučne sonde s obzirom na to da se kod ultrazvučnog kupatila oscilacije disperguju kroz daleko veću površinu nego u slučaju soniciranja sondom, gde je sonda u direktnom kontaktu sa suspenzijom lipozoma. Prikazani rezultati u saglasnosti su sa literaturnim podacima prema kojima je raspodela veličine lipozoma tretiranih umerenom kavitacijom bimodalna, a zatim sa povećanjem inteziteta kavitacije postaje unimodalna [27]. Sa slika 1B i 1C uočava se i to da su lipozomi sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje veći u odnosu na prazne lipozome u slučaju netertiranih i ultrazvučno tretiranih uzoraka. U skladu sa navedenim, može se pretpostaviti i izvesti zaključak da se hidrolizovani proteini soje delimično ugrađuju u lipozomnu membranu.



Slika 1. Uticaj ultrazvučnih tretmana na srednju veličinu i raspodelu čestica lipozoma sa i bez peptida dobijenim iz proteina soje (LIP-P i LIP, redom; 40 kHz se odnosi na tretman u ultrazvučnom kupatilu, a 20 kHz tretman ultrazvučnom sondom). Vrednosti obeležene istim slovima ukazuju da razlika srednjih vrednosti nije značajna na nivou 0,05

Figure 1 Effects of ultrasound treatments on the average diameters and size distribution of liposome particles with and without peptides obtained from soy protein (LIP-P and LIP, respectively; 40 and 20 kHz correspond to the treatment in the ultrasonic bath and by the ultrasonic probe, respectively). Values marked with the same letter indicate that the difference of means is not significant at the 0.05 level

Stabilnost lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje ispitana je merenjem površinskog zeta potencijala, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 2.



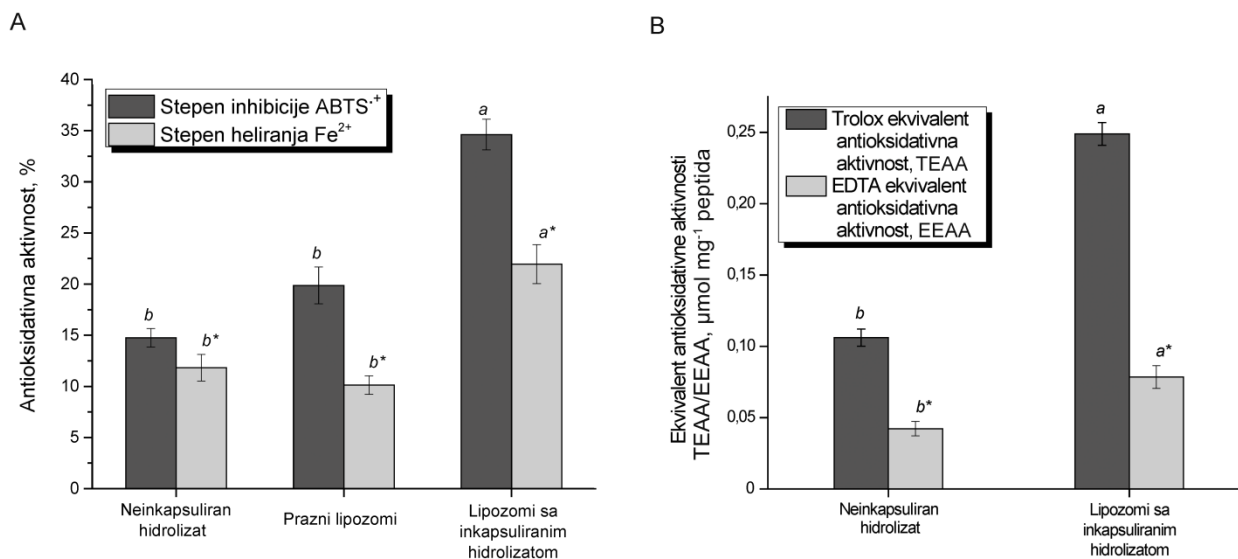
Slika 2. Uticaj ultrazvučnih tretmana na površinsko naelektrisanje lipozoma sa i bez peptida soje (LIP-P i LIP, redom; 40 kHz se odnosi na tretman u ultrazvučnom kupatilu, a 20 kHz tretman ultrazvučnom sondom). Vrednosti obeležene istim slovima ukazuju da razlika srednjih vrednosti nije značajna na nivou 0,05

Figure 2 Effects of ultrasound treatments on the zeta potential of liposome particles with and without soy peptides (LIP-P and LIP, respectively; 40 and 20 kHz correspond to the treatment in the ultrasonic bath and by the ultrasonic probe, respectively). Values marked with the same letter indicate that the difference of means is not significant at the 0.05 level

Sa slike 2 uočava se da je negativna vrednost zeta potencijala detektovana u svim pripremljenim suspenzijama lipozoma što potiče od negativno naelektrisanih fosfatnih grupa fosfolipida koje se u lipozomima orijentišu ka površini. Može se zaključiti da su MLV lipozomi stabilni s obzirom da je njihova apsolutna vrednost zeta potencijala veća od 20 mV i da su lipozomi sa inkapsuliranim hidrolizatom soje stabilniji usled prisustva većeg broja negativno naelektrisanih peptida sojinog hidrolizata. Promena u površinskom naelektrisanju MLV lipozoma navodi na zaključak da se peptidi ugrađuju u lipozomnu membranu tako da se negativno naelektrisane grupe orijentišu ka okolnoj vodenoj fazi. Do istog zaključka su došli i autori koji su ispitivali liposome nanoveličina dobijene od lecitina sa inkapsuliranim peptidima mlečne surutke [16]. Ova grupa istraživača je još pokazala da je povećanje apsolutne vrednosti zeta potencijala i stabilnosti lipozoma uzrokovano prisustvom peptida u korelaciji sa molekulskom masom proteinskih frakcija, tako da frakcije peptida manjih molekulskih masa imaju veći uticaj na zeta potencijal lipozoma. Međutim, uticaj hidrolizata proteina soje na liposome tretirane ultrazvukom nije takav, odnosno nema statistički značajne razlike u naelektrisanju u odnosu na prazne liposome. Dodatno, uočava se da su apsolutne vrednosti zeta potencijala ultrazvučno tretiranih uzoraka znatno manje u odnosu na netretirane liposome. Dobijeni rezultati navode na zaključak da je ultrazvučni tretman lipozoma doveo do strukturne reorganizacije lipozomne membrane MLV lipozoma. Takođe treba imati u vidu i da ultrazvučni talasi dovode do konformacionih promena u strukturi proteina što je moglo da za posledicu ima promene u orijentaciji naelektrisanih funkcionalnih grupa i promene u pozicioniranju ostataka aminokiselina u lipozomnoj membrani. U literaturi se mogu naći različite vrednosti zeta potencijala prilikom inkapsulacije proteinskih hidrolizata ili njihovih frakcija u SUV liposome od fosfatidil holina. Prilikom inkapsulacije proteinskog hidrolizata ribljih proteina dobijene su vrednosti od -2,2 do -5,8 mV [20], dok je vrednost površinskog naelektrisanja lipozoma sa proteinskim hidrolizatom proteina pasulja iznosila čak -70 mV [19]. Sumarno, može se zaključiti da vrednosti zeta potencijala značajno variraju u zavisnosti od porekla peptida koji se inkapsuliraju, njihove površinske hidrofobnosti, naelektrisanja bočnih ostataka aminokiselina, ali i od hemijske strukture fosfolipida.

3. 2. Antioksidativna aktivnost hidrolizata proteina soje inkapsuliranih u liposome

Poznato je da se mehanizam delovanja peptida nosioca antioksidativne aktivnosti ispoljava kroz: 1) neutralizaciju slobodnih radikala, 2) inhibiciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, 3) heliranje pro-oksidativnih jona metala i 4) inhibiciju lipidne peroksidacije [3]. Stoga, antioksidativna aktivnost hidrolizata proteina soje inkapsuliranih u liposome tretirane ultrazvučnom sondom u cilju redukcije veličine čestica i pripreme jednolamelarnih vezikula, analizirana je merenjem stepena inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona i stepena heliranja Fe²⁺ jona. Tom prilikom antioksidativna aktivnost lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje upoređena je sa neinkapsuliranim proteinima soje u obliku hidrolizata (pri istoj koncentraciji peptida; slike 3A i 3B) i praznim lipozomima (pri istoj koncentraciji fosfolipida; slika 3A).



Slika 3. Antioksidativna aktivnost lipozoma sa inkapsuliranim peptidima soje u odnosu na neinkapsulirani hidrolizat i prazne liposome kao kontrolu: (A) procenat inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona/metal-jon helatna aktivnost, i (B) troloks/EDTA ekvivalent antioksidativne aktivnosti izražen po masi peptida. Vrednosti obeležene istim slovima ukazuju da razlika srednjih vrednosti nije značajna na novou 0,05

Figure 3 Antioxidant activity of liposomes with encapsulated soy peptides with respect to non-encapsulated peptides and empty liposomes as a control: (A) scavenging activity of ABTS^{•+}/metal-ion helating activity, and (B) Trolox/EDTA equivalent antioxidant activity per mass of peptides. Values marked with the same letter indicate that the difference of means is not significant at the 0.05 level

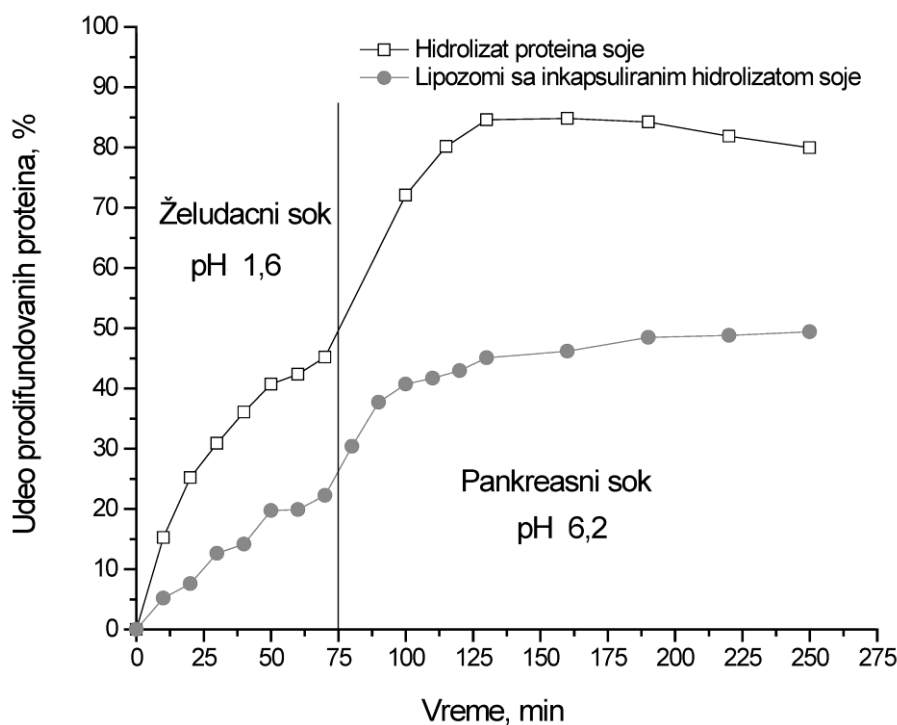
Antioksidativna aktivnost u vidu inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona za hidrolizat proteina soje (koncentracije 5 mg cm⁻³) iznosila je ~71,1 %, dok je efikasnost heliranja Fe²⁺ jona bila ~54,1 %. Sa slike 3 uočava se da je antioksidativna aktivnost lipozomne formulacije peptida manja u odnosu na slobodan hidrolizat, i iznosi ~35,0 % za inhibiciju ABTS^{•+} radikalskog katjona, odnosno ~22,0 % za efikasnost heliranja Fe²⁺ jona. Međutim, važno je istaći da je antioksidativna aktivnost neinkapsuliranog hidrolizata proteina soje (0,38 mg cm⁻³) iznosila ~14,7 % za inhibiciju ABTS^{•+} radikalskog katjona, dok je za efikasnost heliranja Fe²⁺ ta vrednost bila ~11,8 %. Analiziranjem antioksidativne aktivnosti (slika 3) evidentno je da ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti formulacije lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje doprinose fosfolipidi koji ulaze u sastav korišćene komercijalne smeše fosfolipon, a koji prema literaturnim podacima ispoljavaju antioksidativnu aktivnost [28], kao i prisustvo antioksidanta tokoferola tj. vitamina E (0,3 %). Antioksidativna aktivnost fosfolipida u ovom istraživanju potvrđena je i eksperimentano na uzorku praznih lipozoma bez inkapsuliranih hidrolizata proteina soje. Prazni lipozomi ispoljili su sposobnost inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona u vrednosti od ~19,9 % (slika 3A), što izraženo preko ekvivalenata korišćenog standarda iznosi 2,92 μmol TE mg⁻¹ fosfolipida, odnosno 0,288 μmol TE. Kada je reč o heliranju Fe²⁺ jona, prazni lipozomi imaju nešto manju sposobnost helacije u poređenju sa inhibiranjem radikalskog katjona (svega 10 %, odnosno 0,069 μmol EE tj. 0,080 μmol EE mg⁻¹ fosfolipida). Poređenjem vrednosti ekvivalenata antioksidativne aktivnosti suspenzije lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom (0,473 μmol TE odnosno 0,249 μmol TE mg⁻¹ peptida i 0,149 μmol EE odnosno 0,078 μmol EE mg⁻¹ peptida) i praznih lipozoma, može se zaključiti da fosfolipidi ispoljavaju čak 60 % od ukupnog kapaciteta suspenzije lipozoma za inhibiranje radikalskog katjona

i 46 % od ukupne sposobnosti suspenzije lipozoma za heliranje jona pro-oksidativnog metala. Prikazani rezultati idu u prilog samom postupku inkapsulacije, opravdavaju isti i naročito je značajano jer je njima potvrđeno da nije došlo do velikih gubitaka antioksidativne aktivnosti usled kavitacije u toku ultrazvučnog tretmana lipozoma.

U literaturi se mogu naći različiti podaci o uticaju procesa inkapsulacije na antioksidativnu aktivnost hidrolizata proteina i/ili izolovanih peptida. Tako, je pokazano smanjenje inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona i ACE-inhibitorne aktivnosti nakon inkapsulacije bioaktivnih peptida hidrolizata mlečne surutke u liposome [26]. S druge strane, utvrđene su bolje antioksidativne aktivnosti inkapsuliranih peptida dobijenih iz hidrolizata proteina jedne vrste morske ribe u odnosu na neinkapsulirane upravo usled prisustva fosfatidil holina u lipozomima [29], dok se mogu naći i radovi koji pokazuju da nema promene antioksidativne aktivnosti nakon inkapsulacije [20,30,31], kao i da uticaj inkapsulacije zavisi od vrste antioksidativnog testa i koncentracije proteina [31].

3. 3. Kontrolisano otpuštanje primenom Francove difuzione ćelije

Kako je inkapsulacijom hidrolizata proteina soje u liposome zadržana zadovoljavajuća antioksidativna aktivnost, u poslednjoj fazi istraživanja praćeno je otpuštanje hidrolizovanih proteina iz lipozoma. U tu svrhu korišćena je Francova difuziona ćelija, a zbog potencijalne upotrebe u prehrambenim proizvodima simulirani su gastrointestinalni uslovi tokom 4 h. Kinetika otpuštanja antioksidativnog hidrolizata proteina soje prikazana je na slici 4.



Slika 4. Kinetika otpuštanja hidrolizata proteina soje iz lipozoma u simuliranim gastrointestinalnim uslovima u odnosu na difuziju slobodnog hidrolizata

Figure 4 Release kinetics of soy protein hydrolysate from liposomes in simulated gastrointestinal fluids with respect to non-encapsulated soy protein hydrolysate

Sa slike 4, jasno se može uočiti da se u prvih 75 min oslobodilo ~20 % inkapsuliranog hidrolizata proteina soje u uslovima želudačne sredine, u odnosu na 45 % neinkapsuliranog hidrolizata, tj. kontrolnog uzorka. S obzirom da su prema literaturnim podacima lipozomi stabilni na niskim pH vrednostima i otporni na dejstvo pepsina [32], mehanizam otpuštanja peptida u gastričnom medijumu se pripisuje difuziji kroz lipozomnu membranu. U intestinalnim uslovima se takođe uočava usporeno otpuštanje peptida iz lipozoma u odnosu na kontrolni uzorak, tako da se ravnotežno stanje uspostavlja nakon 180 min u odnosu na 120 min koliko je bilo potrebno u slučaju difuzije slobodnih peptida, ali treba imati u vidu da u intestinalnim uslovima dolazi do lipolize fosfolipida lipozoma i to najviše kao posledica prisustva žučnih

soli [30]. Ovakav rezultat ukazuje na to da su lipozomi stabilne čestice pogodne za inkapsulaciju hidrolizata, tj. smeše oligo- i polipeptida, poreklom iz proteina soje, tako što deluju kao zaštitna barijera i usporavaju proces oslobađanja što opravdava njihovu upotrebu kao sistema za kontrolisano i produženo otpuštanje nestabilnih sojinih peptida.

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu priprema lipozoma izvršena je metodom tankog filma korišćenjem komercijalne smeše fosfolipona 90G. Formirani film lipida hidriran je vodenim rastvorom hidrolizata proteinskog koncentrata soje koji poseduje izraženu antioksidativnu aktivnost, a pripremljen je u dvostepenom enzimskom postupku sa endoproteazom iz *Bacillus amyloliquefaciens* i endo- i egzoproteazom iz *Aspergillus oryzae*. Smanjenje veličine lipozoma i povećanje njihove uniformnosti postignuto je dejstvom ultrazvučnih talasa generisanih ultrazvučnom sondom frekvence (20 kHz) i u ultrazvučnom kupatilu (40 kHz), pri čemu su ultrazvučnom sondom postignuti bolji rezultati, odnosno veća efikasnost inkapsulacije (19 %) i manje (310 nm) i uniformnije (unimodalna raspodela veličina) lipozomne čestice. Utvrđeno je da hidrolizat proteina soje doprinosi povećanju negativne vrednosti zeta potencijala, ali samo u slučaju velikih multilamelarnih lipozoma. Potvrđena je dobra antioksidativna aktivnost lipozomne formulacije hidrolizata koja je dobijena ultrazvučnim tretmanom i to merenjem sposobnosti inhibicije ABTS^{•+} radikalskog katjona i sposobnosti heliranja Fe²⁺ jona. Kinetika otpuštanja bioaktivnog hidrolizata proteina soje u simuliranim gastrointestinalnim uslovima pokazuje da lipozomi omogućavaju produženo oslobađanje bioaktivnih peptida iz hidrolizata. Rezultati pokazuju da se lipozomne formulacije mogu koristiti kao funkcionalni dodaci hrani. U cilju postizanja efikasnije inkapsulacije hidrolizata proteina soje buduće faze istraživanja potrebno je usmeriti ka unapređenju tehnološkog postupka izrade lipozoma, pri čemu optimizacija sastava lipozomne membrane, kako u pogledu procesnih parametara, tako i u pogledu primene drugih lipidnih sirovina će biti fokus.

Zahvalnica: Autori naučnog rada odaju veliku zahvalnost Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za finansijsku podršku (Ugovor br. 451-03-68/2020-14/200135 i Ugovor br. 451-03-68/2020-14/200287).

REFERENCES

- [1] Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci.* 2012; 77(1):R11–R24.
- [2] Chatterjee C, Gleddie S, Chao-Wu X. Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients.* 2018; 10(9):1211.
- [3] Oliveira CF, Coletto D, Correa APF, Daroit DJ, Toniolo R, Cladera-Olivera F, Brandelli A. Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease, *Int Food Res J.* 2014; 21(2): 775–781.
- [4] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 49–53.
- [5] Sugano M. Soy in health and disease prevention. 1st ed., Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.
- [6] Peña-Ramos E., Xiong YL. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system, *J Food Sci.* 2002; 67(8):2952–2956.
- [7] Hirose A, Miyashita K. Inhibitory Effect of Proteins and their Hydrolysates on the Oxidation of Triacylglycerols Containing Docosahexaenoic Acids in Emulsion, *J Jpn Soc Food Sci.* 1999; 46 (12):799–805.
- [8] Tokudome Y, Nakamura K, Kage M, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts. *Int J Food Sci Nutr.* 2012; 63(6):689–695.
- [9] Rocha GA, Trindade MA, Netto FM, Favaro-Trindade CS. Microcapsules of a casein hydrolysate: production, characterization, and application in protein bars. *Food Sci Technol Res.* 2009; 15(4):407–413.
- [10] Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., Udenigwe, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC advance.* 2015; 5(97):79270–79278.
- [11] Nkanga, C. I., Bapolisi, A. M., Okafor, N. I., Krause, R. W. M. General perception of liposomes: formation, manufacturing and applications. In: Angel Catala, ed. *Liposomes-advances and perspectives*. IntechOpen; 2019; <https://doi.org/10.5772/intechopen.84255>
- [12] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* 2013; 8(1):102.
- [13] Yokota D, Moraes M, Pinho SC. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Braz J Chem Eng.* 2012; 29(2):325–335.
- [14] Liu W, Ye A, Han F, Han J. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019; 263:52–67.



- [14] Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., & Hernandez-Escalante, V. M.
- [15] Bioavailability of Bioactive Peptides. *Food Rev. Int.* 2011; 27(3), 213–226
- [16] Mohan A, Mc Clements DJ, Udenigwe CC. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chem.* 2016; 213:143–148.
- [17] Morais HA, Da Silva Barbosa CM, Delvivo FM, Mansur HS, Oliveira MC, Silvestre MPC. Comparative study of microencapsulation of casein hydrolysates in lipospheres and liposomes. *J Food Biochem.* 2004; 28(1):21–41.
- [18] Morais HA, De Marco LM, Oliveira MC, Silvestre MPC. Casein hydrolysates using papain: Peptide profile and encapsulation in liposomes. *Acta Aliment.* 2005; 34(1):59–69.
- [19] Chay SY, Tan WK, Saari N. Preparation and characterisation of nanoliposomes containing winged bean seeds bioactive peptides. *J Microencapsul.* 2015; 32(5):488–495.
- [20] da Rosa Zavareze E, Telles AC, El Halal SLM, da Rocha M, Colussi R, de Assis LM, de Castro LAS, Guerra Dias AR, Prentice-Hernández C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Sci Technol.* 2014; 59(2):841–848.
- [21] Jovanovic JR, Proizvodnja biološki aktivnih peptida proteina balenceta enzimskim postupkom, izolovanje i karakterizacija. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu. (in Serbian) <https://fedorabg.bg.ac.rs/fedora/get/o:19785/bdef:Content/get>
- [22] IS/ISO 5983-2 (2005): Animal feeding stuffs - Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content, Part 2: block digestion/steam distillation method [FAD 5: Livestock Feeds, Equipment and Systems]
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265–275.
- [24] Jovanović JR, Stefanović AB, Žuža MG, Jakovetić SM, Šekuljica NŽ, Bugarski BM, Knežević-Jugović ZD. Improvement of antioxidant properties of egg white protein enzymatic hydrolysates by membrane ultrafiltration. *Hem Ind.* 2016; 70(4):419–428.
- [25] Volić M, Pajić-Lijaković I, Djordjević V, Knežević-Jugović Z, Pećinar I, Stevanović-Dajić Z, Hadnadjev M, Bugarski B. Alginate/soy protein system for essential oil encapsulation with intestinal delivery. *Carbohydr Polym.* 2018; 200:15–24.
- [26] Corrêa APF, Bertolini D, Lopes NA, Veras FF, Gregory G, Brandelli A. Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates. *LWT-Food Sci Technol.* 2019; 101:107–112.
- [27] Yamaguchi T, Nomura M, Matsuoka T, Koda S. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. *Chem Phys Lipids.* 2009; 160(1):58–62.
- [28] Saito H, Ishihara K. Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *J Amer Oil Chem Soc.* 1997; 74:1531–1536.
- [29] Mosquera M, Giménez B, da Silva IM, Boelter JF, Montero P, Gómez-Guillén MC, Brandelli A. Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chem.* 2014; 156:144–150.
- [30] Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chem.* 2017; 234:220–229.
- [31] [31]Hosseini SF, Ramezanzade L, Nikkhah M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *Int J Biol Macromol.* 2017; 105:1455–1463.
- [32] Liu W, Ye A, Han F, Han J. Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Adv Colloid Interfac.* 2019; 263:52–67.

ABSTRACT**Production and characterization of liposomes with encapsulated bioactive soy protein hydrolysate**

Neda V. Pavlović¹, Jelena R. Jovanović², Verica B. Đorđević³, Bojana D. Balanč¹, Branko M. Bugarski³ and Zorica D. Knežević-Jugović²

¹*Innovation Center of the Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Republic of Serbia*

²*Department of Biochemical Engineering and Biotechnology, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Republic of Serbia*

³*Department of Chemical Engineering, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 11000 Belgrade, Republic of Serbia*

(Scientific paper)

Soy proteins known for their high nutritional value and pronounced techno-functional properties, can be hydrolyzed by using proteolytic enzymes and thus converted into hydrolysates rich in di-, tri- and oligopeptides. The resulting peptides are carriers of valuable biological activities, which make the soy hydrolysates very important in functional food applications as techno-functional and bioactive ingredients. However, commercial incorporation and application of soy protein hydrolysates can be hindered by their low bioavailability and instability, bitter taste, hygroscopicity and possibility to interact with the food matrix. The aim of this research is encapsulation of the soy protein hydrolysate in liposomes in order to overcome the stated shortcomings, while preserving the biological activities that protein hydrolysates exhibit. The soy hydrolysate was prepared by a two-step enzymatic hydrolysis of a soy protein concentrate using commercial food-grade proteases, endoprotease from *Bacillus amyloliquefaciens* (Neutrase[®]) and exo- and endoprotease from *Aspergillus oryzae* (Flavourzyme[®]) and encapsulated within liposomes. The liposomes were produced by a thin film method using a commercial lipid mixture (Phospholipon[®] 90G) containing mainly phosphatidylcholine. Next, the obtained multilamellar vesicles (MLV) with the soy protein hydrolysate were treated by high-intensity ultrasound waves generated by using (1) an ultrasonic probe at a frequency of 20 kHz and (2) an ultrasonic bath with a frequency 40 kHz. The smallest (310 nm) and uniform (unimodal size distribution) liposomes with the highest efficiency of peptide encapsulation (19 %) were obtained by the probe sonication. The presented results showed that incorporation of the soy protein hydrolysates was achieved within the liposome membrane and caused an increase in the liposome size in all tested formulations, namely: from 297 to 310 nm by using the ultrasonic probe, from 722 to 850 nm by using the ultrasonic bath, while in formulations without the ultrasonic treatment the increase from 2818 to 3464 nm was recorded. The entrapped peptides caused enlargement of all liposomes and the increase in negative charge of zeta potential values, which in the case of MLV liposomes was below -30 mV, indicating high stability of these liposomes. Significant antioxidant activity of the probe-sonicated liposomal formulation was confirmed by the ABTS scavenging ability and iron-chelating activity. Release studies conducted under simulated gastrointestinal conditions confirmed that liposomes provide prolonged release of encapsulated soy protein hydrolysates as compared to diffusion of the free hydrolysate. In the first 75 min, only 20 % of liposome encapsulated soy peptides diffused, which is 2.2-fold lower as compared to the diffusion of the non-encapsulated soy hydrolysate. Liposome encapsulated soy protein hydrolysates may provide the possibility for application in the areas such as food science and technology, with the aim to enhance the nutritional value and shelf life of food products, and develop functional foods.

Keywords: soy protein hydrolysate, bio-active peptides; encapsulation, liposome, ultrasound high-intensity, controlled release.