ریزپوشانی آرژنین با کیتوزان و اثر آن بر بقای آمینواسید در جیره غذایی و رشد لارو ماهی قزل‌آلا(*Onchorhynchus mykiss*)

سجاد فتاحی[۱]، محمد ذاکری*[۱]، ژاله ورشوساز[۲]، وحید یاوری[۱]

۱- گروه شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۳- گروه داروسازی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷//۶/۲۱

چکیده

در این تحقیق به بررسی فاکتورهای رشد بچه ماهیان قزل‌آلا تغذیه شده با آرژنین ریزپوشانی شده در مقایسه با آرژنین آزاد پرداخته شد. بدین جهت حدود ۴۰۰ بچه ماهی ۱ گرمی قزل الای رنگین‌کمان پس از سازگاری با محیط آزمایشی، تحت تغذیه با تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند. پس از ارزیابی زمان ماندگاری آمینواسید و آماده سازی نانوذرات کیتوزان، تاثیر مکمل‌ها بر روی فاکتور های رشد ماهیان انجام شد. ماهی ها به ۴ گروه صدتایی (با سه بار تکرار) در استخرهای ریس مخصوص پرورش بچه ماهی مجزا با شرایط یکسان تقسیم شدند. در گروه اول، ماهی ها با جیره تجاری به میزان ۵ درصد وزن بدن ۵ بار در روز، گروه دوم، جیره های حاوی نانو ذرات کیتوزان به میزان ۵ درصد وزن بدن در روز، گروه سوم با جیره حاوی آرژنین به میزان ۵ درصد وزن بدن و در گروه چهارم نیز ماهیان با جیره حاوی کیتوزان و آمینواسید آرژنین به میزان ۵ درصد وزن بدن در روز به مدت ۶۰ روز متوالی تغذیه شدند. افزایش وزن مولکولی کیتوزان، سبب افزایش سایز و اندازه نانوذرات تولیدی شد. ماندگاری آمینو اسید در جیره در مکمل‌های ریزپوشانی شده بطور معناداری بالاتر بود ($P\leq0.05$). بیشترین میزان ریزپوشانی آرژنین با کیتورزان، در وزن مولکولی ۱۱۰ کیتوزان اتفاق افتاد. ریزپوشانی آرژنین با کیتوزان، روند آزادسازی اسیدآمینه را در بدن کنترل شده‌تر کرد و آبشویی آن نیز بطور چشمگیری کاهش یافت ($P\leq0.05$). استفاده از مکمل ریز پوشانی شده آرژنین بطور معناداری سبب بهبود فاکتور های رشد در بچه ماهیان گردید($P\leq0.05$).

کلمات کلیدی: آرژنین، کیتوزان، رشد، ریزپوشانی، قزل‌آلای رنگین کمان.

* عهده‌دار مکاتبات (✉).mhdzakeri@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

مقدمه

نانوذرات باتوجه به خواص منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی شان می توانند در بسیاری از مطالعات بیولوژیکی و زیست محیطی مورد استفاده قرار بگیرند و به همین دلیل توجه زیاد دانشمندان ومحققان را به خود جلب کرده اند (Liu, 2006). از جمله این موارد علم آبزی پروری می باشد. نانوکپسول‌ها، کپسول هایی در اندازه های نانو هستند که می توان مواد مختلف را درون آنها جایگذاری کرده و عمل کپسولاسیون را انجام داد. موادی که بعنوان پوشش در این روش استفاده می شود باید از مواد خوراکی بوده، قابلیت تجزیه زیستی داشته و توانایی حفظ کردن شکل ظاهری خود بعنوان یک حامل بین فاز داخلی و محیط پیرامون را داشته باشد. ذرات تولید شده معمولا دارای اندازه ای از چند نانومتر تا میلی متر می باشند (Adams, 1999). نانوتکنولوژی ممکن است یکسری از مزیت های مهم در انتقال ریزمغذی ها، مواد و اجزای غذایی با پایداری کم در ماهیان را دارا باشد. نانوذرات ممکن است جهت محصورکردن یا پوشاندن مواد غذایی ای (تکنولوژی ریزپوشانی) استفاده شود که بطور طبیعی از بین می روند (مانند اسیدهای چرب) و یا بدلیل میزان حلالیت کم، میزان کارآیی جذب محدودی در طی دستگاه گوارش ماهیان دارند (ویتامین های محلول در آب). این تکنولوژی برای کارتنوئیدها، مواد معدنی کمیاب، ویتامین‌ها و اسیدهای چرب از طریق افزایش قابلیت دسترسی زیستی بمنظور رسیدن به هدف اصلی پیشنهاد شده است (Acosta, 2009; Bouwmeester *et al.*, 2009).

در تغذیه لارو ماهیان استفاده از میکروذرات تا حدی توانسته است مشکل قابلیت هضم پذیری درشت مغذی ها در جیره را حل نماید. بعبارت دیگر در مراحل اولیه گوارش، با توجه به محدودیت گوارش و هضم پروتئین ها، مکمل های اسیدهای آمینه آزاد (کریستاله)، دارای اهمیت بالایی هستند (Hamre *et al.*, 2013). جیره های غذایی استفاده شده در تغذیه آبزیان، در هنگام رهاسازی در آب تحت تاثیر عوامل مختلف از جمله انحلال مواد کریستاله قرار دارند که می توانند ضریب اثرگذاری جیره را در آبزیان تحت تاثیر قرار دهد.

نانو ذرات کیتوزان به دلیل خاصیت پلی کاتیونی می توانند با نانو ذرات دیگر که دارای بار منفی باشند پیوند الکترواستاتیکی و دیگر پیوندهای شیمیائی دهند که از این طریق باعث تولید نانو پلیمر می شوند. تشکیل این نانو پلیمرها منجر می شود که فضای موجود بین نانو کامپوزیت ها نسبت به حالت انفرادی کاهش یابد و خصوصیات کاربردی این نانوپلیمرها را افزایش می دهد (Xing *et al.*, 2008). همچنین از کیتوزان به عنوان حامل‌های دارویی نیز یاد شده است (بنایی و همکاران، ۱۳۹۷).

قزل آلا یکی از ماهیان اقتصادی کشور ایران محسوب شده و و سالانه بیش از یک میلیارد قطعه تخم چشم زده وارد می‌شود (حاجی بگلو و سوداگر، ۱۳۹۷) که معمولا مشکلات تغذیه ای میتواند درصد بالایی از تلفات دوران پرورش سنین پایین را به خود اختصاص دهد. با توجه به نقصان‌های موجود در روش‌های تغذیه، تحویل بسته‌های غذایی جامع به لارو ماهیان، پوشش‌دار کردن جیره‌های غذایی متناسب با نیاز گونه‌ها بخصوص لاروها، استفاده از فناوری نانو میتواند راه‌حل مناسبی جهت رفع مشکل آبشویی عناصر حیاتی و محدود کننده رشد این موجودات در حساس‌ترین مرحله

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

زنـدگی شـان باشـد (Dziezak, 1988). تکنولـوژی ریزپوشانی[1] یک گزینه مناسب و جایگزین در این زمینه می‌باشد.

موادی که جهـت پوشـش حفـاظتی در پوشـش دار کردن استفاده می شـود اغلـب بایسـتی خـوراکی، قابـل تجزیه زیستی و قادر به حفـظ شـکل خـود بعنـوان یـک حامل بین فاز داخلی و محیط اطراف باشند. اکثر موادی کـه بـرای انکپسـوله کـردن در غـذا اسـتفاده مـی شـود، مولکول های زیستی هستند. کیتوزان نیـز کربوهیـدراتی است کـه از آن بـرای نـانو ذرات و ریـزکپسـوله کـردن آمینوسیدها استفاده مـی‌شـود. کیتـوزان از داسـتیله شـده کیتین بدست می‌آید. کلمه کیتین از کلمه یونانی کیتون منشا گرفته است که به معنـی پوشـش زره ای مـی باشـد که برای اولین بار به وسیله برادکونات در سال ۱۸۱۱ در قارچ شناسایی شد (Shahidi *et al*., 2006). نـانو ذرات کیتوزان به دلیل خاصیت پلی‌کاتیونی می تواننـد بـا نـانو ذرات دیگـــر کـــه دارای بـــار منفـــی باشـــند پیونـــد الکترواستاتیکی و دیگر پیوندهای شیمیائی دهنـد کـه از این طریق باعث تولید نانو پلیمر می شـوند. تشـکیل ایـن نانو پلیمرها منجر می شود کـه فضـای موجـود بـین نـانو کامپوزیت ها نسبت بـه حالـت انفـرادی کـاهش یابـد و خصوصـیات کـاربردی ایـن نانوپلیمرهـا را افـزایش مـی دهد (Xing *et al*., 2008).

علاوه بر نقش اسید های آمینه در سـاختار پـروتئین ها این گروه در رشد، نگهداری و ترمیم بافت های بـدن نیـز نقـش دارنـد (Hertrampf and Piedad-Pascual, 2000). افزودن صحیح مکمل های غـذایی اسـید آمینـه بعنوان پیش ساز متابولیسم به جیـره غـذایی، سـبب تهیـه جیره غذایی با ترکیب متعادل اسید آمینـه ای شـده و در نتیجه باعث بهبـود عملکـرد رشـد و سـودآوری صـنعت آبزی پروری می گردد؛ از این رو در امر تغذیه، افزودن اسید های آمینه آزاد به جیره غذایی فرموله شـده آبـزی به ویژه در جایگزینی منابع پروتئینی ، به یک عمل رایج تبـدیل شـده اسـت (Li *et al*., 2009). آرژنـین بعنـوان پیش ساز کراتین و سنتز اسید نیتریک بحساب مـی آیـد و می تواند بعنوان محرک قوی انسولین و هورمون رشد بکار گرفته شود و از همین رو می تواند نقش مهمـی در فرآیندهای آنابولیک ایفا کند. این اسید آمینـه همچنـین می تواند در سـنتز پلـی آمـین هـا، متابولیسـم نیتـروژن و کراتین دخالت کنـد و یـک سوبسـترا مهـم بـرای اسـید نیتریک به حساب آید (Wan *et al*., 2006).

با توجه به اهمیت اسید های آمینه، هدف اصـلی در خوراک آبزیان، اطمینان از بـالا بـردن مانـدگاری اسـید هـای آمینـه درجیـره و رسـیدن آن بـه مـاهی مـی باشـد. امروزه با تغییـر سـاختار اجـزا جیـره از جملـه نـانوذرات کردان آن ها، این امر تا حدی انجام گرفته است. وجود نانو کپسول ها و ریزپوشانی اجزا خوراک، روش نـوینی است که می تواند هـم ماهیـت اجـزا خـوراک را حفـظ کرده و هم میزان رساندن ایـن اجـزا بـه بـدن مـاهی نیـز افزایش دهد. از ایـن رو در ایـن تحقیـق، بـا ریزپوشـانی آرژنین بوسـیله کیتـوزان، سـعی در آزمـودن مانـدگاری اسید آمینه در جیـره در حـالات مختلـف و تـاثیر آن در میـزان آرژنـین دریـافتی در مـاهی و فـاکتور هـای رشـد ماهیان، می باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در شهریور ماه ۱۳۹۴ در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی موسیان استان اصفهان اجرا شد. در این راستا جهت پرورش لارو ماهیان قزل آلای

[1] Microencapsulation

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، از حوضچه های پلی اتیلنی با حجم ۱۰۰ لیتر آب استفاده شد. هر حوضچه تقریبا ۸۰ لیتر آبگیری گردید و جریان آب با دبی ۲لیتر در دقیقه در آن ها برقرار شد. میزان اکسیژن اشباع و بیشتر از ۸ میلی گرم در لیتر در مخازن مشاهده شد. ۳۰۰ عدد لارو با میانگین وزن ۵۰۰ میلی گرم در سه تکرار برای هرکدام از تیمارهای تغذیه ای در حوضچه ها (مجموعه ۱۲ حوضچه) رهاسازی شد.

ماهیان در طی دوره در شرایط ثابت نگهداری شده و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب (شهری) هرهفته اندازه‌گیری شدند). در طول دوره تعویض آب روزانه ۵۰ درصد انجام گرفت و با آب کلرزدایی شده جایگزین گردید. هوادهی به صورت شبانه روز انجام گردید.

جدول ۱: فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب

پارامتر	مقدار
دما	۱۵±۱^{0C}
pH	۷,۲
سختی	۱۸۰ میلی گرم $CaCo_3$
قلیائیت	۱۶۸ میلی‌گرم بر لیتر $CaCo_3$
شوری	۰/۵ppt

بمنظور دستیابی به بهترین محلول نانو ذره کیتوزان جهت انجام ریزپوشانی با اسیدهای آمینه، محلول کیتوزان با وزن مولکولی متفاوت(وزن مولکولی پایین: ۶۵ کیلودالتون، وزن مولکولی متوسط: ۱۱۰ کیلودالتون، و وزن مولکولی بالا: ۴۵۰ کیلودالتون)، با حل کردن کیتوزان در اسید استیک ۱۰ درصد آماده شد(۱۰ میلی لیتر اسید استیک خالص به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد). سپس محلول تری پلی فسفات با غلظت ۰/۵ درصد آماده ودر ادامه محلول کیتوزان با تری پلی فسفات مخلوط شده تا نانوپارتیکل کیتوزان-تری پلی فسفات آماده گردد. این محلول به مدت ۱ ساعت به آرامی تکان داده شد تا پیوند های عرضی بین نانو ذرات به خوبی تشکیل شود. بعد از این مرحله نانو ذرات کیتوزان-تری پلی فسفات آماده گردید.

مقادیر متفاوتی از آرژنین با کیتوزان با وزن مولکولی متفاوت با هم مخلوط شدند و این مخلوط در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت به آرامی تکان داده شدند. سپس نانوپارتیکل با استفاده از سانتریفیوژ با دور بالا یعنی ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتی‌گراد جدا شدند. در ادامه مایع روی ماده جامد دور ریخته شد و ماده جامد با استفاده از Freeze-dryer خشک و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت طولانی برای اهداف مختلف نگهداری گردید.

اندازه نانو ذرات و پتانسیل زتا (پتانسیل زتا عبارت است از میزان بار الکتریکی که در اطراف نانو ذرات وجود دارند) با استفاده از دستگاه Zetasizer 3000HSA (Malvern, Instrument, England) تعیین گردید (Alishahi *et al*, 2011b). همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اندازه و شکل نانو ذرات در آزمایشگاه مرکزی دانشکده داروسازی دانشگاه اصفهان بررسی شد.

پس از تهیه نانوذرات ریزپوشانی شده اسیدآمینه با کیتوزان در وزن‌های مولکولی مختلف، نمونه‌ها با سانتریفیوز دوربالا (۶۰۰۰ مرتبه در دقیقه) به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از این مدت نانوذرات تشکیل شده، در ته ویال ها رسوب داده و سوپرناتانت شفاف رویی جداسازی شد. سپس مایع شفاف جهت سنجش آرژنین آزاد ، استفاده گردید. با محاسبه میزان آرژنین آزاد با استفاده از دستگاه آمینواسید آنالایزر

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و کم کردن از میزان آرژنین استفاده شده جهت ریزپوشانی، درصد ریز پوشانی آرژنین در هریک از اوزان مولکولی کیتوزان محاسبه گردید.

تعیین زمان ماندگاری آرژنین به شکل ریز کپسوله شده و ریزکپسوله نشده در جیره ماهی قزل آلای رنگین کمان به مدت ۶۰ روز در شرایط استاندارد در انبار نگهداری شده است بررسی شد. بعد از این زمان، محتوای آرژنین جیره آنالیز گردید. بدین منظور نمونه های خوراک حاوی آرژنین ۱٪ در دو حالت آزاد و ریزپوشانی شده ، در فواصل زمانی روزهای ۰، ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۴ با استفاده از دستگاه آمینواسید آنالایزر(Amino Acid Analyzer ARACUS) آزمایشگاه مرکزی دانشگاه صنعتی اصفهان سنجیده شد. لازم به ذکر است میزان تکرار در هر تیمار سه مرتبه بود.

خوراک استفاده شده در این بررسی، خوراک تجاری Rosha بود که از بازار محلی فراهم شد (خوراک S1 و S2) و سپس در آب خسیانده شد. بعد از یک ساعت، جیره به خوبی له شده و تبدیل به خمیر گردید. در ادامه، نانو ذرات کیتوزان حاوی آمینواسید آرژنین (تقریبا ۰/۱ گرم) به ۱۰ گرم (وزن مرطوب) جیره قزل آلای رنگین کمان (خمیر) اضافه و به صورت کامل مخلوط شد. سپس، جیره خمیری با استفاده از یک چرخ گوشت با سایز دهانه ریز به شکل پودری در آمده و در نهایت پودر ها در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد در آون به مدت ۱ ساعت خشک و آماده شد.

جدول ۲: آنالیز جیره مصرفی پایه

آنالیز Rosha	S1	S2
پروتئین خام٪	۵۴	۵۴
چربی خام٪	۱۴	۱۴
NFE%	۱۰	۱۰
خاکستر٪	۷	۷
فیبر٪	۰/۶	۰/۶
انرژی قابل هضم(Kcal/Mj)	۴۲۰۰	۴۲۰۰

برآورد شاخص درصد بازماندگی در انتهای دوره و با مقایسه تعداد بچه ماهیان اولیه و تعداد آنها در پایان دوره آزمایش محاسبه شد (Jafaryan *et al*., 2011).

درصد بازماندگی(SR[1]): {تعداد ماهیان اولیه- تعداد ماهیان پس از قرارگیری در معرض استرس تقسیم بر تعداد ماهیان اولیه}*۱۰۰

پس از اتمام دوره پرورش، فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای از قبیل درصد افزایش وزن (BWI[2])، ضریب رشد ویژه (SGR[3])، ضریب تبدل غذایی (FCR[4]) محاسبه شد.(Jafaryan *et al*., 2011)

WG: درصد افزایش وزن: (وزن انتهایی – وزن اولیه) × ۱۰۰

SGR: ضریب رشد ویژه :[(Ln وزن انتهایی – Ln وزن اولیه)/ طول دوره آزمایش] × ۱۰۰

FCR: ضریب تبدیل غذایی: میزان غذای داده شده / میزان افزایش وزن

FCE: کارایی غذایی: ۱۰۰ × وزن بدست آمده ماهیان (تر) / وزن غذای داده شده (خشک)

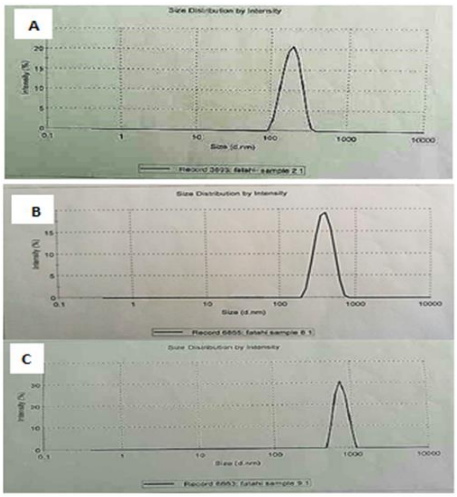
[1] Survival Rate
[2] Body weight increase
[3] Specific growth rate
[4] Food conversion ratio

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

پس از اندازه گیری فاکتورهای مطرح شده و ثبت آنها ابتدا نرمال بودن داده با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف بررسی شد و در صورت نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه بین تیمارهای آزمایشی از آزمون One-way ANOVA در سطح احتمال (۰/۰۵ ≥P) استفاده شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۸) در محیط ویندوز ۸ انجام شد. وجود تفاوت معنی دار در داده های بدست آمده در سطح احتمال (P≤۰/۰۵) به کمک آزمون دانکن انجام شد.

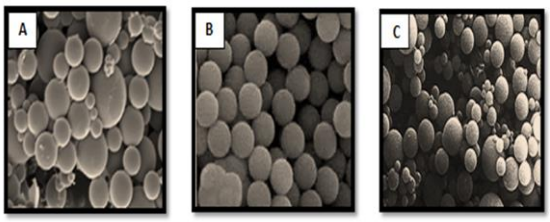
نتایج

نانو ذرات با مخلوط کردن تری پلی فسفات با کیتوزان تحت تاثیر پیوندهای مولکولی بین گروه فسفات مولکول تری پلی فسفات و گروه آمین کیتوزان ساخته شد. شکل۱ تاثیر وزن مولکولی کیتوزان را روی اندازه نانو ذرات نشان می دهد. گراف A مربوط به نانوذرات با وزن مولکولی ۶۵ کیلو دالتون، گراف B مربوز به وزن ۱۱۰ و گراف C مربوط به وزن مولکولی ۴۵۰ کیلو دالتون می باشد. عمده توزیع سایز نانوذرات بین ۱۰۰ نانومتر تا ۱۰۰۰ نانومتر هستند. همانطور که در شکل مشاهده می شود افزایش وزن مولکولی نانوذرات، توزیع سایز نانوذرات را وسیع تر کرده و همچنین بطور میانگین، با افزایش وزن مولکولی نانوذرات، سایز نانوذرات تشکیل شده نیز بزرگتر هستند.



شکل۱: منحنی توزیع اندازه ذرات نانو ذرات کیتوزان با وزن مولکولی (A)۶۵ ، (B) ۱۱۰ و (C) ۴۵۰ کیلو دالتون

شکل ۲ تصاویر SEM بدست آمده از نانو ذرات تولید شده را نشان می دهد. همانطور که در شکل مشاهده می شود، کیتوزان با وزن مولکولی کمتر تولید نانو ذرات کوچکتری کرده است. این تصاویر، نشان از توزیع سایز نانوذرات در وزن های مولکولی مختلف کیتوزان می باشد. همانطور که در تصاویر مشهود است، بیشترین پراکندگی سایز در وزن مولکولی ۴۵۰ کیلودالتون و کمترین آن در کیتوزان با ۱۱۰ کیلودالتون مشاهده شد. از همین رو با توجه به میزان و درصد ریز پوشانی و یکنواختی نانوذرات ریزپوشانی شده تشکیل شده، کیتوزان با وزن مولکولی ۱۱۰ کیلودالتون جهت تغذیه در جیره قزل‌آلا انتخاب شد.



شکل ۲: تصاویر SEM حاصل از نانو ذرات با وزن مولکولی (A) ۴۵۰، (B) ۱۱۰ و (C) ۶۵ کیلو دالتون

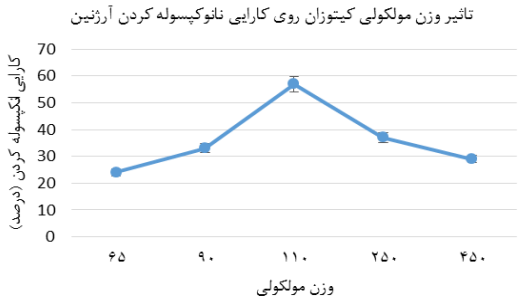
[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

جدول ۳ تاثیر وزن های مولکولی مختلف کیتوزان را در اندازه ذرات، پتانسیل زتا و محصول نانو ذرات نشان می دهد. همانطور که در جدول مذکور پیداست، با افزایش وزن مولکولی اندازه ذرات، پتانسیل زتا و میزان اندازه نانو ذرات افزایش یافته است. بیشترین میزان ریزپوشانی، مربوط به کیتوزان با وزن مولکولی ۱۱۰ کیلودالتون بود. ازین رو این نمونه جهت افزودن به جیره ماهی قزل و سنجش آزمایشات بعدی استفاده شد.

جدول ۳: تاثیر وزن های مختلف کیتوزان روی اندازه ذرات، پتانسیل زتا و محصول نانو ذرات حاوی آرژنین

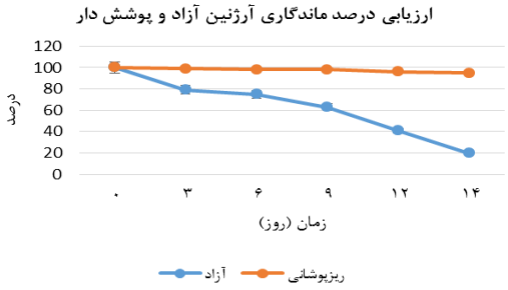
کیتوزان (کیلودالتون)	متوسط اندازه ذرات (نانو متر)	پتانسیل زتا (میلی ولت)	میزان ریزپوشانی (درصد)
۶۵	۱۵۴/۴۲ ± ۲/۱۰	۲۴/۵۳ ± ۱/۵۶	۲۴
۱۱۰	۳۲۱/۱۴ ± ۳/۲۰	۲۸/۳۱ ± ۴/۳۰	۵۹
۴۵۰	۶۳۱/۳۵ ± ۳/۶۰	۳۳/۳۲ ± ۱/۵۰	۲۹



شکل ۵: تاثیر وزن مولکولی کیتوزان بر روی کارایی نانوانکپسوله کردن آرژنین

بیشترین میزان کارایی و درصد ریزپوشانی آرژنین با کیتوزان، مربوط به کیتوزان با وزن مولکولی ۱۱۰ کیلودالتون می باشد. میزان آرژنین آزاد در واکنش با کیتوزان با وزن مولکولی بالا (۴۵۰ کیلو دالتون) و کم (۶۵ کیلودالتون) درمقایسه با کیتوزان متوسط (۱۱۰ کیلودالتون) بیشتر بود و این نشان دهنده میزان کارایی کم ریزپوشانی در این دو وزن مولکولی بود.

شکل زیر زمان ماندگاری آرژنین در دو حالت آزاد و ریز کپسوله شده را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که زمان ماندگاری آرژنین در پایان روز چهاردهم در نمونه های دارای پوشش به صورت کاملا معنی دار بیشتر از نمونه های فاقد پوشش بوده است.



شکل ۴: زمان ماندگاری آرژنین پوشش دار و فاقد پوشش

نمونه های غذای استفاده شده در کارگاه پرورش جمع آوری شد. ویژگی هایی مانند ماده خشک، میزان پروتئین و پروفایل آمینواسید مورد بررسی قرار گرفت. جهت سنجش آبشویی، پلت های غذایی را بمدت ۹۰ دقیقه در آب غوطه‌ور شده و ویژگی های ذکر شده، مجددا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به میزان آرژنین افزوده شده به جیره غذایی، در دو حالت مکمل آزاد و ریز پوشانی شده، با محاسبه آرژنین آزادشده در آب در فواصل زمانی ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه، درصد آرژنین آزاد شده در هردو تیمار محاسبه شد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

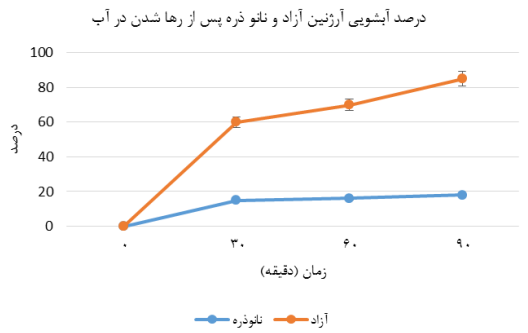
جدول۴: پروفایل آمینواسید جیره استفاده شده در آزمون

آمینواسید	پروفایل آمینواسید جیره (٪ پروتئین جیره)
لیزین	۵/۴۶
آرژنین	۴/۶۲
هیستدین	۱/۱۶
ایزولوسین	۳/۲۸
لوسین	۵/۶۳
متیونین	۲/۰۱
متیونین-سیستئین	۲/۵۹
فنیل آلانین	۲/۸۴
ترئونین	۳/۳۹
تریپتوفان	۰/۶۵
والین	۳/۵۱
فنیل آلانین-تیروزین	۴/۶۶

در بررسی حاضر، میزان آبشویی و هدررفت آرژنین در تیمارهای ۳ که مکمل کریستاله اسید آمینه آرژنین استفاده شد، بطور معناداری میزان بالاتری را نسبت به تیمار ۴ که بصورت ریز پوشانی اضافه شد، نشان داد ($P\leq0.05$).

جدول ۵ : میزان درصد آزادسازی آرژنین در آب از دوجیره حاوی مکمل آزاد آرژنین و آرژنین ریزپوشانی شده

	شروع	۳۰ دقیقه	دقیقه ۶۰	دقیقه ۹۰
آرژنین آزاد	۰	۷۰^{b}	۸۲^{b}	۸۸^{b}
آرژنین ریزپوشانی شده	۰	۱۵^{a}	۱۶^{a}	۱۸^{a}



شکل ۶: آبشویی متیونین آزاد و انکپسوله شده پس از رها شده در آب

شاخص های رشد و تغذیه

نتایج مربوط به اثرات مکمل های غذایی آزاد و ریزپوشانی شده آرژنین بر شاخص های رشد و تغذیه ای در جدول۴ آورده شده است. بازماندگی لارو ماهیان در تیمار های شاهد و ۲ (مکمل کیتوزان) میزان کمتری نسبت به سایر تیمارها دارد که این اختلاف معنادار می‌باشد ($P<0/05$). در شاخص افزایش وزن کمترین میزان مربوط به ماهیان تیمار ۲ می باشد. بیشترین مقدار افزایش وزن در تیمارهای ۳ و ۴ (آرژنین آزاد و ریزپوشانی شده) مشاهده شد. تیمار شاهد و تیمار ۲ کمترین میزان افزایش وزن را نشان داد و با دیگر تیمارها دارای اختلاف معنی دار می‌باشد ($P<0/05$). تمام تیمارهای غذایی بجز تیمار ۲ دارای افزایش وزنی بیشتر از تیمار شاهد بودند. آرژنین ریزپوشانی شده با کیتوزان بهینه‌ترین ضریب تبدیل غذایی را نشان داد که نسبت به سایر تیمارها اخلاف معنادار را نشان داد ($P<0/05$). افزایش مکمل های اسید آمینه ای آرژنین در جیره غذایی اثر معنی‌داری بر میزان نرخ رشد ویژه در تیمارهای مختلف آزمایشی نشان داد ($P<0/05$). کمترین مقدار این شاخص در تیمار شاهد و ۲ مشاهده شد.

جدول ۶: فاکتورهای رشد

	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
وزن اولیه	۰/۹±۰/۰۳^{a}	۰/۹۳±۰/۰۳^{a}	۰/۹۱±۰/۰۳^{a}	۰/۹۲±۰/۰۳^{a}
وزن نهایی	۵/۶۱±۰/۰۳^{a}	۵/۴۸±۰/۰۳^{a}	۷/۱۶±۰/۰۳^{b}	۷/۰۹±۰/۰۳^{b}
بازماندگی	۰/۹۵±۰/۰۳^{a}	۰/۹۶±۰/۰۱^{a}	۰/۹۹±۰/۰۱^{b}	۱/۰۰±۰/۰۰^{b}
(WG)[1]	۴/۷۰±۰/۰۸^{a}	۴/۵۵±۰/۳۸^{a}	۶/۱۰±۰/۴۱^{b}	۶/۰۸±۰/۴۰^{b}
(FCR)[2]	۱/۴۸±۰/۰۳^{b}	۱/۴۸±۰/۰۳^{b}	۱/۳۱±۰/۰۳^{a}	۱/۲۹±۰/۰۲^{a}
(FCE)[3]	۰/۶۷±۰/۰۱^{a}	۰/۶۷±۰/۰۱^{a}	۰/۷۶±۰/۰۱^{b}	۰/۷۷±۰/۰۱^{b}
(SGR)[4]	۱/۶۳±۰/۰۱^{a}	۱/۶۴±۰/۰۱^{a}	۱/۸۳±۰/۰۱^{b}	۱/۸۶±۰/۰۱^{b}

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

بحث

توانایی کیتوزان در ژل دهندگی سریع با پلی آنیون ها جهت تشکیل نانوذرات، بستگی به تشکیل پیوندهای بین مولکولی با پلی آنیون ها دارد.به محض اینکه محلول کیتوزان با تری پلی فسفاتTPP بعنوان پیوند دهنده عرضی با پلی آنیون ترکیب می شود، در اثر پیوند های بین و درون مولکولی بین گروه آمین کیتوزان که دارای بار مثبت می باشد و گروه TPP که دارای بار منفی می باشد، نانوذرات ساخته می شوند. اندازه و چگونگی پراکندگی نانوذرات تشکیل شده بستگی به وزن مولکولی کیتوزان دارد. هرچه وزن مولکولی کیتوزان بیشتر باشد، به همان اندازه، نانوذرات تشکیل شده بزرگتر می باشند که در این تحقیق مصداق یافته است(Gan *et al*., 2005; Mao *et al*., 2009). نانوذرات تشکیل شده در محیط اسیدی به واسطه وجود و استفاده از اسید استیک۱٪، دارای بار سطحی مثبت می باشند. نانوذرات تولید شده دارای بار الکتریکی مثبت می باشد که این نانوذرات می توانند از طریق پیوندهای یونی و هیدروژنی با اسیدهای آمینه واکنش داده و تشکیل نانوذرات حاوی اسیدهای آمینه را در نهایت می دهد. با توجه به نتایج مصور حاصل از این تحقیق، نانوذرات ساخته شده دارای شکل کروی می باشند و اندازه آنها در محدوده نانوذرات می باشند. هرچه وزن مولکولی کیتوزان کمتر باشند، به همان اندازه، نانوذرات تشکیل شده دارای اندازه کوچکتر می باشند. Xu و Du در سال ۲۰۰۳ و Jans و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز نتایجی مشابه را نشان دادند. علاوه بر این، آنها بیان داشتند که وزن مولکولی بالاتر کیتوزان سبب تشکیل نانو ذرات با اندازه بزرگتر می باشند. همانطور که از نتایج ارزیابی پتانسیل زتا در این تحقیق بر می آید، نانوذرات ساخته شده دارای بار الکتریکی مثبت می باشند که این امر نشان دهنده این موضوع می باشد که گروه آمین کیتوزان بخوبی سطح نانوذرات را پوشانده است.از طرف دیگر می توان به این نتیجه رسید که تشکیل نانوذرات دارای رابطه بسیار نزدیکی با تراکم گروههای آمین آزاد دارد. بار الکتریکی موجود در سطح نانوذرات و پتانسیل زتا، باعث تقویت پیوندهای الکترواستاتیکی بین نانوذرات و اسیدهای آمینه می شود که در نهایت برای حفظ شکل کروی نانوذرات و کاهش دادن اندازه نانوذرات کمک میکند.از این نتایج می توان دریافت که انتخاب وزن مولکولی مناسب کیتوزان برای دستیابی به اندازه مناسب نانوذرات با کارایی بالا در انتقال مواد فعال زیستی مانند اسیدهای آمینه امری مهم می باشد، چراکه اندازه ذرات یکی از مهمترین فاکتورها در جذب مواد زیست فعال از طریق سلول های روده می باشد(Mao *et al*., 2009; Alishahi *et al*., 2011b). بطور کلی سه فاکتور اندازه ذرات، خصوصیات سطحی و پتانسیل زتا نانوذرات، برای بررسی ویژگی انتقال و جذب یک عامل فعال در سیستم های بیولوژیکی از اهمیت و جایگاه بسیار ویژه ای برخوردار می باشد. همانطور که نتایج نشان داد، میزان محصولات و ریزپوشانی نانوذرات با افزایش وزن مولکولی افزایش می یابد که Gan و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Alishahi و همکاران (۲۰۱۱a)، بیان داشتند که بین اندازه نانوذرات تشکیل شده و محصول نانوذرات با وزن مولکولی کیتوزان، رابطه مستقیمی وجود دارد. بر این اساس می توان نتیجه گرفت وزن مولکولی بالا باعث پتانسیل زتا می شود و بنابراین پیوندهای الکترواستاتیکی با ذرات دارای بار منفی(اسیدهای آمینه)افزایش می یابد و در نهایت منجر

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

به افزایش محصول نانودرات می شود(Yang and Hun, 2009; Alishahi *et al*., 2011a).

در تحقیق حاضر نیز، افزایش وزن مولکولی کیتوزان، سبب افزایش سایز نانوذرات تولید شده، گردید. نتایج این آزمایش با بررسی نتایج Alishahi و همکاران (۲۰۱۱a) همسو بود. وی در این آزمایش با بکارگیری کیتوزان با اوزان مولکولی مختلف جهت ریزپوشانی ویتامین ث، دریافت افزایش سایز نانوذرات سبب افزایش سایز و پتانسیل زتا نانوذرات تولیدی می شود. عالیشاهی میزان ریزپوشانی ویتامین ث را ۷۵ درصد عنوان کرد که کم بودن این میزان در تحقیق حاضر می تواند بدلیل حلالیت پذیر بودن بیشتر اسیدهای آمینه در شرایط اسیدی و آبی می باشد. در تائید تحقیق حاضر، با توجه به خاصیت زیست تجزیه پذیری کیتوزان، Rajesh kumar و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از کیتوزان موفق به انتقال خوراکی واکسن در ماهی سی باس در مقابل ویبریو شد و علاوه بر انتقال خوراکی واکسن و کاهش استرس، سبب حفظ ویژگی های واکسن و آزادسازی کنترل شده آن در بدن ماهی شد.

همانطور که در نتایج ذکر شد، کارایی ریزپوشانی اسید آمینه با افزایش وزن تا وزن مولکولی متوسط (۱۱۰ کیلودالتون) افزایش یافت، از این وزن به بعد تا وزن مولکولی بالاتر کیتوزان، میزان ریزپوشانی کاهش یافت. Alishahi و همکاران (۲۰۱۱b)، نشان داد افزایش وزن مولکولی کیتوزان سبب افزایش کارایی ریزپوشانی ویتامین ث شد، ولی در کیتوزان با وزن مولکولی بالاتر میزان کارایی کاهش یافت. Yangو همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز بیان داشتند که کیتوزان با وزن مولکولی کمتر، حاوی رشته های کوتاهتر کیتوزان میباشد که به موجب آن گروههای آمین آزاد با سهولت بیشتری می توانند پروتونه شوند، و منجر به جذب بیشتر ویتامین ث از طریق پیوند یونی می شود. در مقابل برخی از محققان نیز نشان دادند که وزن مولکولی بالاتر کیتوزان منجر به کارایی بیشتر ریزپوشانی می شود که دلیل آن را زنجیره بزرگتر مولکول کیتوزان با وزن مولکولی بالاتر می دانند که می تواند مقدار بیشتری از ویتامین ث را در بر گیرد. بر اساس این یافته ها ،افزایش اندازه نانوذرات کیتوزان حاوی آمینواسید ممکن است کارایی ریزپوشانی را بعلت کاهش سطح نانوذرات کاهش دهد(Yoksan *et al*., 2010; Wang *et al*., 2009). بطور کلی با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، می توان گفت افزایش وزن مولکولی کیتوزان تا وزن مولکولی متوسط، میزان ریز پوشانی اسیدهای آمینه بدلیل پوشاندن مقادیر بالاتر گروههای آمین، افزایش می یابد، اما با رسیدن به وزن مولکولی بالاتر، بدلیل کاهش سطح نانوذرات، کارایی ریزپوشانی اسیدهای آمینه نیز کاهش می یابد.

همانطور که نتایج تحقیق حاضر نشان داد، زمان ماندگاری آرژنین ریزپوشانی شده با نانوذرات کیتوزان بطور معناداری بیشتر از اسیدهای آمینه کریستاله بود. آرژنین همانند سایر اسیدهای آمینه نسبت به نور و اکسیژن بسیار حساس می باشد، به همین دلیل در طی ساخت غذای آبزیان، مکمل های اسیدهای آمینه بعد از طی شدن پروسه حرارتی به جیره ماهی افزوده می شود، چراکه نانوذرات کیتوزان، قادر است آرژنین را به خوبی پوشش دهد و بنابراین از تماس مستقیم اسیدهای آمینه با فاکتورهای محیطی مثل نور و اکسیژن ممانعت به عمل می آورد و از این طریق باعث افزایش زمان ماندگاری و پایداری اسیدهای آمینه می شود.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

Esposito و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که میکروذرات Eudragit به خوبی قادر است ویتامین ث را ریزپوشانی کند و این سیستم به عنوان گزینه مناسبی برای انتقال و جذب ویتامین ث در شرایط In vivo و In vitro می باشد. Alishahi و همکاران (۲۰۱۱a)، با استفاده از کیتوزان توانستند ویتامین ث را ریزپوشانی کرده و در برابر شرایط محیطی در شرایط In vivo و In vitro حفظ کنند.

در تحقیق حاضر، مقایسه بین آبشویی اسید آمینه آرژنین در حالت کریستاله و ریزپوشانی شده، نشان می دهد که میزان هدررفت و آبشویی اسیدهای آمینه در حالت کریستاله به میزان چشمگیری بالاتر از حالت ریزپوشانی بوسیله کیتوزان می باشد. اسید امینه آرژنین در حالت کریستاله در ۲۰ دقیقه ابتدایی حدود ۶۰ درصد، و پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه، به ترتیب ۷۰ و ۸۵ درصد آبشویی را نشان داد. در حالت ریزپوشانی شده، پوشش کیتوزان تا حد چشمگیری مانع هدر رفت و آبشویی اسید های آمینه شد. میزان آبشویی در تیمارهای ریز پوشانی شده نشانگر تاثیر مثبت ریزپوشانی درحفظ و پایداری میکرونوترینت های جیره از جمله اسید های آمینه در سیستم پرورشی بود.

Lopez و همکاران در سال ۱۹۹۴ میزان نرخ آبشویی اسید آمینه کریستاله در انواع مختلف میکروجیره ها را ارزیابی کرد و دریافت پس از ۱ ساعت، کمترین میزان آبشویی در کپسول های با غشای لیپیدی و بیشترین میزان در ذرات میکرو باند شده را نشان داد.

افزودن مکمل های اسیدهای آمینه به جیره های غذایی ماهیان تبدیل به یک روش متعارف برای جبران فقدان یک یا چند اسید آمینه ضروری شده است(Luzzana *et al*., 1998).

نتایج حاصل از این آزمایش، نشان داد مکمل های آزاد و ریزپوشانی شده آرژنین بر شاخص افزایش وزن WG اثر معناداری داشته است، بطویکه کمترین این میزان در تیمار شاهد و مکمل کیتوزان (تیمار ۲) مشاهده گردید. بطور کلی افزودن مکمل آزاد و ریزپوشانی شده آرژنین سبب ایجاد روند افزایشی در شاخص افزایش وزن گردید. آرژنین همچنین سبب افزایش نرخ رشد ویژه شد، اما این تفاوت معنادار نبود. بطور مشابه در ماهیان دیگر مانند خامه ماهی *Chanos chanos* (Barlongan, 1993)، آزاد ماهیان *Onchorhynchus kisutch*(Luzzana *et al*., 1998) و ماهی سوف نقره ایی (Ngamsnaeet *et al*., 1999) افزایش آرژنین جیره سبب بهبود عملکرد رشد گردید. در تحقیقات انجام شده دیگر، Lou و همکاران ۲۰۰۴، با بررسی اثر مکمل آرژنین در جیره ماهی هامور، افزایش نرخ رشد ویژه و افزایش وزن را گزارش داد. برخی گونه ها قادرند در طی چرخه اوره، آرژنین را از طریق آنزیم های چرخه اورنیتین-اوره سنتز کنند (Hugins *et al*., 1969).

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از نتایج طرح مصوب با شماره قرارداد ۹۴۰۰۴۱۸۹ صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور می باشد.

منابع

۱. بنایی، م.، شریفی‌نسب، ز.، محیسنی، م. و نوری، ا. ۱۳۹۷. تاثیر حفاظتی ویتامین C و کیتوزان بر

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

پارامترهای بیوشیمیایی سلول‌های آبششی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در معرض پاراکوت. نشریه توسعه آبزی پروری ۱۲ (۱). ۳۴-۲۳.

۲. حاجی‌بگلو، ع. ع.، و سوداگر، م. ۱۳۹۷. اثر شدت نور بر نرخ تخم گشاییف بازماندگی و رشد آلوین قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه توسعه آبزی پروری ۱۲ (۲). ۴۸-۳۷.

3. Acosta, E., 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. Current opinion in colloid & interface science, 14(1):.3-15.
4. Adams, M., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology, 68(2–3):171-178.
5. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Rafiee, M., Farahmand, H., Shojaosadati, S. A., Dorkoosh, F., et al. 2011a Shelf life and delivery enhancement of vitamin C using chitosan nanoparticles. Food Chemistry, 126: 935–940.
6. Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M.R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F.A., and Elsabee, M.Z. 2011b. Chitosan nanoparticle to carry vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Carbohydrate Polymers, 86: 142– 146.
7. Borlangan, I. G., 1991. Argninine and threonine riquirements of milk fish (*Chanos chanos*) juveniles. Aquaculture 93: 312-323.
8. Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M. Y., Hagens, W. I., Bulder, A. S., de Heer, C., ten Voorde, S. E. C. G., Wijnhoven, S. W. P., Marvin, H. J. P., and Sips, A. J. A. M., 2009. Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 53(1): 52-62.
9. Dziezak, J. D., 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. Food Technology, 4:136-159.
10. Esposito, E., Cervellati, F., Menegatti. E., Nastruzzi. C., and Cortesi, R., 2002. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. International Journal of Pharmaceutics, 242: 329–334.
11. Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C., & MaCarron, P., 2005. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles included for gene delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 44: 65-73.
12. Hamre, K., Yufera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Luis, E.C., Conceicao. and Izquierdo, M. (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Reviews in Aquaculture, 5 (1), 26–58.
13. Hertrampf, J., Piedad-Pascual, F., 2000. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Kluwer Academic Publishers.
14. Hugins, A.K., Skutch, G., and Baldwin, E., 1969. Ornithine urea cycle enzymes in teleostean fishes. Comparative Biochemistry Physiology, 64: 187-190.
15. Jafaryan H., M. Soltani M. Taati A., Nazarpoor Morovat R. 2011. The comparsion of performance of isolated sturgeon gut bacillus *(Acipenser persicus* and *Huso huso*) with commercial microbial products on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. Journal of Veterinary Research, 66(1): 39- 46.
16. Janes, K.A., Calvo, P., and Alonso, M.J. 2001. Polysaccharide colloidal particles as delivery system for macromolecules. Advanced Drug Delivery Review, 47, 83-97.
17. Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. Amino acids, 37: 43-53.
18. Liu, W.T., 2006. Nanoparticles and their biological and environmental applications. Journal of Bioscience and bioengineering, 102(1): 1-7.
19. Lopez-Alvarado, J., Langdon, C.J., Teshima, S., Kanazawa, A., 1994. Effects of coating and encapsulation of crystalline

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]

amino acids on leaching in larval feeds. Aquaculture 122, 335– 346.
20. Lou, Z., Liu, Y., Mai, K., and Tian, L. (2004). Advance researches on arginine requirement for fish: a review. Journal of Fish China 28, 450- 459.
21. Luzzana, U., Hardy, R.W., Halver, J.E., 1998. Dietary arginine requirement of fingerling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 163, 137–150.
22. Mao, S., Sun, W., & Kissel, T., 2009. Chitosan-based formulation for delivery of DNA and siRNA. Advanced Drug Dlivery System, 62: 12-27.
23. Ngamsane, P., Desilva, S.S., Gunasekeva. R.M., 1999. Arginine and phenylalanine requirement of juvenile silver perch (Bidyanus b)and validation of the use of body amino acid composition for estimating individual amino acid requirements. Aquaculture nutrition, 5: 173-180.
24. Rajesh Kumar, S., Ishaq Ahned, V. P., Parameswaran, V., Sudhakaran, R., Sarath Babu, V., & Sahul Hameed, A.S., 2007. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio anguillarum*. Fish and Shellfish Immunology, *25:* 47-56.
25. Shahidi, F., Arachi, J.K., and Jeon, Y.T. 2006. Food application of chitin and chitosans. Trends in food sciences and technology, 10, 37-50.
26. Wan, J., Mai, K.S., Ai, Q.H., 2006. The recent advance on arginine nutritional physiology in fish. Journal of Fishery Sciences, 13: 679–685.
27. Wang, T. W., Xu, Q., Wu, Y., Zeng, A. J., Li, M., and Gao, H. 2009. Quaternized chitosan (QCS)/poly (aspartic acid) nanoparticles as a protein drug-delivery system. Carbohydrate Polymer, 344, 908–914.
28. Xing, K., Chen, X.G., Li, Y.Y., Liu, C.S., Liu, C.G., Cha, D.S., & Park, H.J., 2008. Antibacterial activity of oleoyl-chitosan nanoparticles: A novel antibacterial dispersion system. Carbohydrate Polymers, 74: 114-120.
29. Xu, Y., and Du, Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. International Journal of Pharmaceutical, 250, 215–226.
30. Yang, H. C., & Hon, M. H., 2009. The effect of the molecular weight of chitosan nanoparticles and its application on drug delivery. Microchemical Journal, 92: 87–91.
31. Yoksan, R., Jirawutthiwongchai, J., & Arpo, K., 2010. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 76: 292–297.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2025-11-06]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1397.12.3.7.5]