Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 171-180

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۸۰-۱۷۱

ارزیابی فاکتورهای موثر در تشکیل نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین با استفاده از روش سطح پاسخ

سمیرا تیزچنگ[۱]، محمود صوتی خیابانی[۲*]، رضا رضایی مکرم[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۵

چکیده

نایسین کاربردهای متعددی به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی در مواد غذایی از جمله محصولات لبنی، غذاهای کنسروشده، شیر و پنیرهای فرآیند شده دارد. مطالعات نشان داده است، استفاده از نایسین به صورت آزاد در مواد غذایی به دلیل واکنش این ماده با اجزای مواد غذایی و تجزیه پروتئولیتیک باعث کاهش فعالیت ضدمیکروبی آن می‌گردد. انکپسولاسیون پپتیدهای ضدمیکروبی توسط نانولیپوزوم‌ها یک روش جایگزین و موثر در زمینه حفاظت مواد ضدمیکروبی، افزایش میزان کارآیی انکپسولاسیون و پایداری این ترکیبات در کاربردهای غذایی به شمار می‌آید. از این رو در این تحقیق، در مرحله اول از روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تولید نانولیپوزوم‌ها به روش گرمایی استفاده شد. طرح مرکب مرکزی شامل ۱۸ آزمایش با در نظر گرفتن سه متغییر غلظت فسفولیپید (۳۰-۲mμ)، سرعت فرآیند (۱۳۶۰-۵۰۰rpm) و زمان فرآیند (۹۰-۳۰min) و بررسی اثرات این متغییرها روی اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها ارزیابی شد. در مرحله بعد، پایداری نانولیپوزوم‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری ذرات، طی ۲ ماه بررسی شد. مقادیر بهینه متغییرهای غلظت فسفولیپید، سرعت فرآیند و دمای فرآیند در بهینه سازی، به ترتیب (mM)۳۰، (rpm)۹۳۰ و (min)۹۰ بود. نتایج پایداری نانولیپوزوم‌ها طی زمان دو ماه نگهداری در دمای یخچال نشان داد، نمونه‌هایی با اندازه ذرات ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر از لحاظ اندازه ذرات اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p > ۰/۰۵$). در حالی که نمونه هایی با اندازه ذرات بزرگتر طی این زمان از لحاظ اندازه ذرات اختلاف معنی‌دار با هم داشتند ($p < ۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای ضدمیکروبی، نایسین، انکپسولاسیون، نانولیپوزوم، روش سطح پاسخ، پایداری

مقدمه

طی چند دهه اخیر با افزایش تولید مواد غذایی فرآوری شده، گرایش روز افزونی در استفاده از مواد افزودنی گزارش گردیده است. افزودنی‌ها برای اهداف مختلفی شامل: نگهدارنده، رنگ‌دهنده و شیرین‌کننده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zengin *et al.*, 2011). نگهدارنده‌ها ترکیباتی هستند که برای به تاخیر انداختن و یا ممانعت از فساد شیمیایی و یا میکروبیولوژی مواد غذایی استفاده می‌شوند. امروزه تمایل به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی با توجه به اثرات مضر استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی افزایش یافته است. از مواد نگهدارنده طبیعی که امروزه مورد توجه بسیاری هستند، می‌توان به باکتریوسین‌ها اشاره نمود (صاعد مبصری و همکاران، ۱۳۸۸).

باکتریوسین‌ها پپتیدهای سنتزی یا پروتئین‌هایی با فعالیت ضد-میکروبی هستند که توسط گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. باکتریوسین‌ها به عنوان نگهدانده زیستی، سالم و طبیعی توسط آنزیم‌های پروتئاز دستگاه گوارش و روده بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی سریعا هضم و تجزیه می‌گردند. بنابراین می‌توان از این ترکیبات به عنوان یک مانع اصلی جهت کنترل عوامل بیماریزایی ناشی از مواد غذایی نام برد. شناخته‌ترین باکتریوسینی که نه تنها از نظر اقتصادی بلکه از نظر علمی به طور گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرد، نایسین است (Chollet *et al.*, 2008). نایسین محصول تولیدی توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌باشد. این ترکیب یک ماده آنتی بیوتیک طبیعی متشکل از ۳۴ اسید آمینه است (Da Silva Malheiros *et al.*, 2010) مطابق سیستم طبقه‌بندی افزودنی‌های غذایی اتحادیه اروپا E۲۳۴ نام دارد و نگهدارنده‌ای با کارایی بالا، غیر سمی و بی ضرر برای انسان می‌باشد که هیچ‌گونه

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(* - نویسنده مسئول: (Email: M.Sowti@ tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

عوارض جانبی نداشته و به عنوان ماده امن[1] شناخته شده است (Kallinteri *et al.*, 2013). به همین دلیل در سال ۱۹۶۹ سازمانهای جهانی غذا و کشاورزی[2]، بهداشت جهانی[3] همچنین در سال ۱۹۸۸ سازمان غذا و داروی آمریکا[4] اجازه استفاده از آن را به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی صادر کرده است (Sobrino-Lopez *et al.*, 2008). امروزه از نایسین برای نگهداری محصولات لبنی، غذاهای کنسرو شده، گوشت‌های نمک‌زده و غذاهای دریایی استفاده می‌شود (صاعد مبصری و همکاران، ۱۳۸۸). با توجه به اینکه استفاده از نایسین به صورت آزاد در محصولات لبنی به دلیل عدم پخش یکنواخت، نیازمند مقادیری بیشتری است که این امر اقتصادی نبوده و بر تولید اسید و آرومای باکتری‌های آغازگر در محصولی مانند پنیر، اثر بازدارندگی دارد همچنین ترکیب این ماده در محصولات لبنی با سایر اجزای مواد غذایی نظیر چربی و پروتئین موجب کاهش فعالیت ضدمیکروبی آن می‌شود. بنابراین، به منظور حل مشکلات مذکور، انکپسولاسیون نایسین در گویچه‌های فسفولیپیدی (نانولیپوزوم) می‌تواند راهکار مناسب باشد. این تکنیک می‌تواند توزیع مناسب و پایداری باکتریوسین را در شبکه ماده غذایی تضمین کند (Phikunthong *et al.*, 2011؛ الهام زایرزاده و همکاران، ۱۳۹۰). نانولیپوزوم‌ها ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی هستند و به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دو لایه‌ای، تجمع می‌یابند. آن‌ها می‌توانند ترکیبات آبدوست را در هسته و ترکیبات آبگریز را در لایه لیپیدی به دام اندازند. نانولیپوزوم‌ها می‌توانند به دلیل سازگاری، زیست تخریب پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی، کاربردهای گوناگونی در صنعت داروسازی، آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی داشته باشند (Da Silva Malheiros *et al.*, 2012). از روش‌های تولید نانولیپوزوم می‌توان به روش‌های مکانیکی نظیر: فراصوت؛ هموژنیزاسیون و ریزسیال سازی و از روش‌های غیر مکانیکی می‌توان به تبخیر فاز معکوس، تخلیه ترکیب میسلی لیپید- دترجنت، خشک کردن انجمادی و روش حرارتی یا روش مظفری اشاره کرد. در اغلب روش‌های مکانیکی برای تهیه نانولیپوزوم‌ها، از حلال آلی فرار مثل کلروفرم و یا متانول استفاده می‌شود که البته مقادیر کمی از این مواد مضر در فاز لیپیدی و یا فاز آبی لیپوزوم باقی می‌ماند و خروج آن عملا ممکن نیست. این مشکل امکان استفاده از این نوع حامل را برای اهداف کلینیکی محدود می‌کند. از این رو نسل دومی از لیپوزوم‌های آنیونی ساخته شده که تولید آن بدون استفاده از مواد مضر و با بکارگیری حرارت صورت می‌گیرد (روش حرارتی). در روش حرارتی انرژی لازم برای تولید گرانول‌های لیپوزومی از حرارت دهی مخلوط حاصل می‌شود، در حالی که همزدن مخلوط جهت توزیع همگن مواد تشکیل دهنده صورت می‌گیرد (Mozafari *et al.*, 2006) همچنین با توجه به اینکه جزء اصلی در تشکیل نانولیپوزوم، فسفولیپید می‌باشد، کولاس و همکاران (۲۰۰۷)، از نسبتهای متفاوت فسفولیپید برای تهیه لیپوزوم به روش حرارتی استفاده کردند. نتایج نشان داد که با استفاده از این روش می‌توان لیپوزوم‌هایی با توزیع ذرات باریکتر، راندمان انکپسولاسیون بالا و پایداری بالا طی زمان و هدفگیری بهتر سلول باکتری تولید کرد. بنابراین زمان همزدن، سرعت همزدن و غلظت فسفولیپید از جمله متغییرهای اصلی در تشکیل نانولیپوزوم‌ها هستند. در این تحقیق برای تولید و بهینه سازی نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین از روش حرارتی به روش سطح پاسخ استفاده شد سپس پایداری فیزیکی نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین براساس اندازه ذرات، طی زمان (دو ماه) نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

در این پژوهش، فسفولیپید گرانولی با درجه خلوص ۹۹٪ با گرانولهای زرد رنگ از شرکت (Acros, USA) ، کلسترول پودری با خلوص ۹۵٪ از شرکت (Aldrich, USA)، نایسین پودری با نام تجاری Valisin از شرکت (Mayasan, Turkey) و گلیسرول با درجه خلوص ۸۰٪ از شرکت (Merk, Germany)، خریداری شدند.

روش‌ها

روش آماده سازی لیپوزوم

ابتدا فسفولیپید و کلسترول در بافر فسفات (pH≈۶)، به مدت یک ساعت تحت دمای محیط هیدراته شد. کلسترول هیدراته شده در حمام روغنی در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد و زیر همزدن (۱۳۷۰rpm) به طور کامل ذوب شد(Mozafari *et al.,2008*) سپس فسفولیپید هیدراته شده و کلسترول ذوب شده به همراه نایسین (۵ mg در ۱۰cc)، در بن ماری (W350B) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد، تحت نیروی برشی دستگاه همزدن مغناطیسی (Jenwey1000, UK) قرار گرفت. به منظور پایداری، فرمولاسیون لیپوزومی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس در یخچال در دمای ۴°C نگهداری شد (Mozafari *et al..*, 2005; Da Silva Malheiros *et al.*, 2010)

تعیین اندازه ذرات

به منظور مطالعه اندازه ذرات نمونه‌ها از دستگاه پارتیکل سایزر

1- GRAS
2 - FAO (Food And Agriculture Organization)
3 - WHO (World Health Organization)
4- FDA (Food and Drug Administration)

www.SID.ir

Archive of SID

(Shimadzu, Sald 1100, Japan)استفاده شد. اندازه نمونه‌های تهیه شده، بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴°C و متوسط اندازه ذرات بر اساس قطر حجمی توسط این دستگاه تعیین شد(معادله۱). کلیه نمونه ها در سه تکرار اندازه گیری شدند.

$$\overline{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

معادله (۱)

d_i: قطر ذرات، $\overline{D}$ [۴و۳] : میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean

این تحقیق در دو مرحله انجام شد:

مرحله اول: بهینه سازی نانولیپوزوم‌ها حاوی نایسین

در این تحقیق از روش سطح پاسخ استفاده گردید. روش سطح پاسخ در برگیرنده گروهی از فن‌آوری‌های ریاضی است که امکان رسیدن به شرایط بهینه در سامانه‌های پیچیده را فراهم می‌کند. این روش رابطه‌ای بین متغیرهای مستقل و متغیرهای وابسته جستجو می‌کند. بررسی همزمان چند متغیر باعث کاهش تعداد آزمون‌ها، بهبود پیش بینی‌های آمار و احتمالات می‌شود. از این روش برای مدل سازی، بهبود و بهینه سازی شرایط در انواع مختلف پروسه‌های علوم زیستی استفاده می‌شود (جعفری تپه، ۱۳۸۶؛ لطیفیان، ۱۳۸۴). در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی (RSMCC0318) با ۱۸ آزمایش که شامل ۴ آزمایش در نقطه مرکزی است، به منظور بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای غلظت فسفولیپید، زمان فرآیند و سرعت همزدن بر ویژگی اندازه ذرات استفاده گردید. اثرات تغییر پذیری غیر قابل توجیه در پاسخ مشاهده شده، به علت عامل‌های خارجی به وسیله تصادفی کردن ترتیب آزمایش‌ها کاهش داده شد. متغیرهای مستقل طرح در پنج سطح (۱/۶۸۲-، ۱-، ۰، ۱+، ۱/۶۸۲+) شامل غلظت فسفولیپید (X_1, %w/w) در سطوح (۲ تا ۳۰ میلی مولار)، زمان فرآیند، (X_2,min) در سطوح (۳۰ تا ۹۰ دقیقه)، سرعت همزن، (X_3,rpm) در سطوح (۵۰۰ تا ۱۳۶۰) بود در حالی که متغیر وابسته اندازه ذرات بود. برای تجزیه و تحلیل داده‌های اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ از نرم افزار SAS 9.1 و نرم افزار Statistica-9 استفاده شد. معادله چند جمله‌ای درجه دوم استفاده شده در تجزیه و تحلیل به صورت زیر است:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} X_i X_j$$

معادله (۲)

که در این فرمول Y متغیر وابسته یا پاسخ مدل، β_0 ، β_i، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیون برای عامل‌های ضریب ثابت (عرض از مبدأ)، ضریب اثر خطی، ضریب اثر درجه دوم و ضریب اثر متقابل هستند و X_i و X_j متغیرهای مستقل می‌باشند. نرم افزار آماری Statistica-9 برای ایجاد سطوح پاسخ و کنتور در حالی مورد استفاده قرار گرفت که یک متغیر در معادله چند جمله‌ای درجه دوم ثابت نگه داشته شد.

مرحله دوم: بررسی پایداری نانولیپوزوم‌های تولید شده طی مدت نگهداری در دمای یخچال

بررسی پایداری فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی طی مدت نگهداری آن‌ها یکی از آزمون‌های مهم در رابطه با ویژگی این نوع سیستم‌ها می‌باشد. برای بررسی پایداری لیپوزوم ابتدا نمونه‌های تولید شده در یخچال نگهداری شدند و سپس اندازه ذرات طی دو ماه (از زمان صفر تولید تا ۶۰ روز بعد از تولید) با سه تکرار توسط دستگاه اندازه‌گیری ذرات انجام گرفت. همچنین برای بررسی پایداری نانولیپوزوم‌ها از نرم افزار SPSS-16 استفاده شد.

کارآیی درون پوشانی

جهت تعیین کارایی درون پوشانی، ابتدا ۳۰۰ میکرولیتر از فرمولاسیون لیپوزوم، به همراه ۱۲۰۰ میکرولیتر بافر، داخل اپندورف ریخته شد و به مدت بیست دقیقه توسط سانتریفوژ با دور بالا ۱۸۴۰۸ (متر بر مجذور ثانیه) سانتریفوژ گردید سپس روشناور را به آرامی جدا کرده و میزان پروتئین در فاز رسوب توسط کیت اندازه گیری پروتئین پروگالول رد[5] توسط دستگاه اتو آنالیزور، محاسبه شد Wantana bei *et al.*, 2006؛ الهام زایرزاده و همکاران، ۱۳۹۰)

کارایی درون پوشانی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{کارایی درون پوشانی} = \frac{\text{میزان نایسین اندازه‌گیری شده در لیپوزوم}}{\text{میزان اولیه نایسین}} * ۱۰۰$$

معادله (۳)

آزمون میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به منظور بررسی مورفولوژی نانو ذرات و تأیید اندازه ذرات، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی نانو ذرات لیپیدی بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (Leo 906) (TEM مدل Zeiss 100 KV، ساخت آلمان) تصویربرداری شد (لازم به ذکر است، نمونه ارسال شده بلافاصله پس از ارسال، اندازه گیری نشده است. نمونه طی بازه زمانی یک تا دو هفته، اندازه‌گیری شده است).

نتیجه‌ها و بحث

نتایج بهینه سازی نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین

نتایج آزمایش‌های مرحله بهینه‌سازی تاثیر غلظت فسفولیپید،

5. pyrogallol red

www.SID.ir

Archive of SID

زمان فرآیند و سرعت همزدن روی میزان اندازه ذرات در جدول (۱) آورده شده است. با توجه به جدول، بیشترین و کمترین میزان اندازه ذرات به میزان۵/۲۲۰ و۰/۴۱۰ نانومتر (در نمونه‌های شماره یک با مشخصات غلظت (gr)۷/۶۶۴۴، سرعت همزدن (rpm)۶۷۴/۰۴۶، زمان فرآیند (min)۴۲ و در نمونه یازده با مشخصات غلظت (gr)۲، سرعت همزدن (rpm)۹۳۰، زمان فرآیند (min)۶۰ مشاهده شد.

نتایج آنالیز واریانس مدل‌های بررسی شده خطی، درجه دوم و اثر متقابل در جدول(۲) قابل مشاهده است. مدل به دست آمده برای پیش بینی تاثیر سرعت همزدن (X_1)، غلظت فسفولیپید (X_2)، زمان همزدن (X_3) بر روی اندازه ذرات لیپوزوم (Y) با حذف عوامل غیر معنی دار به صورت زیر به دست می‌آید.

معادله (۴) $Y = 1.162194 - 1.315645X_1 - 0.445125X_3 + 0.554265X_1$

جدول۱- نمایش متغییر وابسته (میانگین اندازه ذرات)

نمونه	میانگین اندازه ذرات*	نمونه	میانگین اندازه ذرات*
۱	۵۰۲۲± ۰/۰۶۵	۱۰	۵۲۴± ۰/۰۰۲
۲	۴۲۳۹± ۰/۰۸۲	۱۱	۴۱۰± ۰/۰۰۱
۳	۳۶۹۲ ±۰/ ۰۱۱	۱۲	۸۲۷± ۰/۰۰۲
۴	۱۳۰۲ ± ۰/۱۴۵	۱۳	۲۱۳۷± ۰/۲۰۱
۵	۶۳۱± ۰/۰۰۲	۱۴	۶۶۰± ۰/۰۰۱
۶	۴۳۱± ۰/۰۰۳	۱۵	۷۷۰± ۰/۰۳۰
۷	۵۷۱± ۰/۰۰۱	۱۶	۷۹۸± ۰/۰۰۷
۸	۵۴۷± ۰/۰۰۳	۱۷	۸۳۰± ۰/۰۰۸
۹	۳۹۱۰± ۰/۰۰۴	۱۸	۹۹۰± ۰/۰۰۶

*میانگین اندازه ذرات بر حسب نانومتر می‌باشد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس تاثیرغلظت فسفولیپید، زمان همزدن و سرعت همزدن بر روی اندازه ذرات

منبع تغییرات	ضرایب رگرسیون	درجه آزادی (df)	مجموعه مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F	P
X_1	−۱/۳۱۵	۱	۲۳/۶۳۸۹۲	۲۳/۶۳۸۹۲	۴۶/۴۹۰۹۴	۰/۰۰۰۱ **
X_2	−۰/۲۷۱	۱	۱/۰۰۴۷۷	۱/۰۰۴۷۷	۱/۹۷۶۱۰	۰/۱۹۷۰
X_3	−۰/۴۴۵	۱	۲/۷۰۵۹۲	۲/۷۰۵۹۲	۵/۳۲۱۷۷	۰/۰۴۹۹*
X_1^2	۰/۵۵۴	۱	۴/۲۴۷۲۱	۴/۲۴۷۲۱	۵/۶۶۲۰۱	۰/۰۱۴۰ **
$X_1 X_2$	۰/۵۶۵	۱	۲/۵۵۴۹۳	۲/۵۵۴۹۳	۵/۰۲۴۸۱	۰/۰۵۵۲
$X_1 X_3$	۰/۳۹۳	۱	۱/۲۳۷۹۵۱	۱/۲۳۷۹۵	۲/۴۳۴۶۹	۰/۱۵۷۲
X_2^2	۰/۰۶۲	۱	۰/۰۴۹۶۱	۰/۰۴۹۶۱	۰/۰۹۷۵۶	۰/۷۶۲۷
$X_2 X_3$	−۰/۱۵۴	۱	۰/۱۹۰۰۳	۰/۱۹۰۰۳	۰/۳۷۳۷۴	۰/۵۵۷۹
مدل	-	۳	۳۰/۵۹۲۰۲	۱۰/۱۹۷۳۴	۱۳/۵۹۴۱۹	۰/۰۰۰۱**
اثر خطی	-	۳	۲۷/۳۴۹۵۸	۹/۱۱۶۵۲	۱۷/۹۲۹۵۸	۰/۰۰۰۶**
هثر درجه دوم	-	۳	۵/۶۹۳۵۶	۱/۸۹۷۸۵	۳/۷۳۲۵۳	۰/۰۶۰۵
اثر متقابل	-	۳	۳/۹۸۲۹۱	۱/۳۲۷۶۳	۲/۶۱۱۰۸	۰/۱۲۳۵
باقی مانده	-	۱۴	۱۰/۵۰۱۷۵	۰/۷۵۰۱۲	-	-
عدم تطابق دادها با مدل	-	۵	۴/۸۲۲۷۸	۰/۹۶۴۵۴	۱/۵۲۸۶	۰/۲۷۳۰
خطای خالص	-	۹	۵/۶۷۹۰۰	۰/۶۳۱۰۰	-	-
کل	-	۱۷	۴۱/۰۹۳۷۷	-	-	-

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

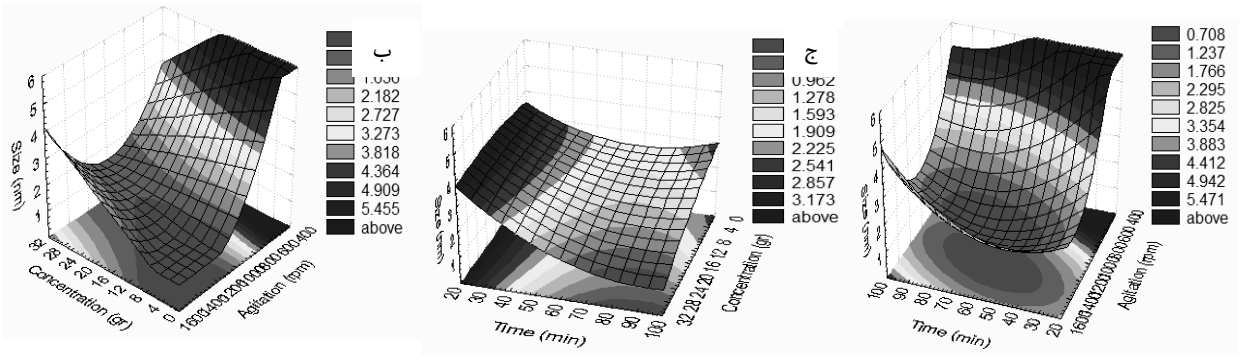
مقادیر P برای مدل ($P < ۰/۰۱$) و برای عدم تطابق داده ها با مدل (۰/۲۰) تاییدی بر تطابق خوب مدل با داده‌های آزمایشی دارد. مقدار عددی ضریب تبیین R^2_{adj} برای مدل رگرسیونی به دست آمده ۷۸٪ بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغیرهای مستقل (غلظت فسفولیپید ، زمان همزدن و سرعت همزن) و متغیر وابسته (اندازه ذرات) را نشان داده و پیش بینی کند. با استفاده از مدل RSM درجه دو، برای حداکثر کاهش اندازه ذرات نانولیپوزوم، مقادیر بهینه غلظت فسفولیپید (۳۰(mM، دور همزدن (rpm) ۹۳۰ و زمان فرآیند (min)۹۰ تعیین شد.

بررسی اثرات متقابل متغییرهای مستقل بر پاسخ

شکل(۱-الف) تاثیر سطوح مختلف غلظت و سرعت همزدن روی میانگین اندازه ذرات لیپوزوم (نانومتر) نشان می‌دهد. همانطور که در جدول(۲) م‌شاهده می‌شود، تاثیر سرعت همزدن بر روی سایز ذرات در سطح احتمال ۰/۰۱، تاثیر زمان همزدن بر روی سایز ذرات در سطح احتمال ۰/۰۵ و جملات مربوط به اثرات درجه دوم که شامل سرعت همزدن بود در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار شد. با توجه به نتایج حاصل، بررسی اثر همزمان متغییر غلظت و سرعت همزدن بر روی میانگین اندازه ذرات لیپوزوم نشان دهنده کاهش سایز ذرات در کمترین مقدار غلظت و بیشترین مقدار دور همزدن است. در تحقیقی که Schrooyen و همکاران (۲۰۰۱) در رابطه با تشکیل لیپوزوم‌ها انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تشکیل لیپوزوم‌ها نیاز به انرژی دارد و بسته به نوع لیپوزوم تشکیل دهنده، انرژی درونی مورد نیاز بسیار متفاوت می‌باشد. وزیکولهای بزرگ چندلایه در اثر همزدن ملایم تشکیل می‌شوند در حالی که وزیکولهای لیپیدی کوچکتر، با افزایش سرعت همزدن تشکیل می‌شوند. همچنین کیانوش خسروی دارانی و همکاران (۱۳۹۰) در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با افزایش در جریان حرکت مواد در حین مخلوط کردن پخش گرانول‌های لستین و توزیع آنها در محیط مایع بهتر صورت گرفته و ترسیب گرانول‌های لستین کمتر بوده است. این موضوع احتمالا بر ذوب لستین، توزیع یکنواخت‌تر و تشکیل لیپوزوم تاثیرگذار خواهد بود.

اثر همزمان نسبت غلظت فسفولیپید و زمان فرآیند برروی میانگین اندازه ذرات لیپوزوم در شکل (۱- ب)، نشان دهنده کاهش سایز ذرات در کمترین مقدار غلظت و بیشترین مقدار دور همزدن است. همانطور که در نمودار ملاحظه می‌شود، کاهش در اندازه ذرات در غلظت‌های بالا با زمان فرآیند حداکثر حاصل شده است. نتایج این تحقیق، با نتیجه بدست آمده توسط مظفری و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. این محققان در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با فراهم کردن زمان کافی برای تشکیل وزیکول‌های لیپیدی اندازه ذرات کاهش می‌یابد. همچنین کیانوش خسروی دارانی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود پی‌بردند که افزایش زمان فرآیند در دماهای فرآوری، موجب مایع شدن گرانول‌های لستین، در نتیجه قابلیت تشکیل لیپوزوم-ها در حد نانو و همچنین موجب افزایش راندمان انکپسولاسیون آنزیم‌ها نیز شده است. شکل (۱- ج) تاثیر سطوح مختلف دور همزدن و زمان فرآیند را بر روی میانگین اندازه ذرات لیپوزوم (نانومتر) را نشان می‌دهد.

الف



شکل۱- نمایش تاثیر (الف) غلظت و سرعت همزدن، (ب) غلظت و زمان فرآیند و (ج) دور همزدن و زمان فرآیند بر روی میانگین اندازه ذرات لیپوزوم

www.SID.ir

Archive of SID

همانطور که در نمودار ملاحظه می‌شود، در مقادیر زمانی ۳۰ تا ۸۰ دقیقه با دور همزدن بالا، کاهش در اندازه ذرات حاصل می‌شود. این نتایج با نتیجه بدست آمده توسط مظفری و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. این محققان در تحقیقات خود نشان دادند که انرژی لازم برای تولید گرانولهای لیپوزومی از حرارت‌دهی مخلوط حاصل می‌شود در حالی که همزدن مخلوط جهت توزیع همگن مواد تشکیل دهنده صورت می‌گیرد. به عبارت دیگر حرارت باعث دریافت انرژی توسط مولکولهای فسفولیپید و آرایش یافتن به شکل ساختارهای تک لایه یا به طور مستقیم تشکیل دولایه است. در حقیقت ساختارهای دو لایه از دریافت انرژی بیشتر توسط ساختارهای تک لایه ای به وجود می‌آیند.

نتایج حاصل از بررسی پایداری نانولیپوزوم‌ها در طی زمان

مطالعه بر روی پایداری اندازه ذرات به عنوان وسیله‌ای جهت تعیین خصوصیات سیستم‌های لیپوزومی استفاده می‌شود. سیستم‌های لیپوزومی که به خوبی فرموله شده‌اند، بایستی توزیع اندازهٔ ذرات باریک در گسترهٔ زیر یک میکرون داشته باشند (Heurtault *et al.*, 2003). نتایج اندازه گیری نمونه‌های در حد نانو در جدول(۳) آورده شده است.

نتایج تجزیه و تحلیل آماری تغییرات اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها طی زمان نشان داد که در مورد نمونه‌هایی با اندازه ذرات ۴۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر از زمان صفر تا دو ماه نگهداری در دمای یخچال از لحاظ اندازه ذرات اختلاف معنی‌داری با همدیگر نداشتند ($P > ۰/۰۵$) ولی در مورد نمونه‌هایی با اندازه ذرات بزرگتر از ۵۰۰ نانومتر این نمونه‌ها طی زمان دو ماهه اختلاف معنی‌داری با هم داشتند ($P < ۰/۰۵$) اما طی زمان یک ماهه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ($P > ۰/۰۵$). نتایج مقایسه میانگین نمونه‌ها نشان داد که نمونه‌های ۱۸،۱۷،۱۶،۱۵،۱۴ بیشترین اندازه ذرات و کمترین پایداری (طی یک ماه پایدار می‌باشند) را دارند ولی نمونه ها ۵ ، ۶، ۷، ۸، ۱۰و۱۱ کمترین اندازه ذرات و بیشترین پایداری را دارند. با توجه به نتایج حاصله، می‌توان دلیل کاهش پایداری با افزایش زمان را پدیده انبوهش و هم آمیختگی طی زمان اشاره نمود (Freitas *et al.*, 1998). با توجه به اینکه در فرمولاسیون لیپوزومی تهیه شده، بار سطح غشاء فسفولیپید منفی، نسبت مولی ثابت لستین-کلسترول(۹۰-۱۰) و دمای ۴°C جهت نگهداری بود. می‌توان دلایل پایداری فرمولاسیون لیپیدی طی زمان را به موارد زیر اشاره کرد:

جدول ۳- نمایش تاثیر زمان بر روی اندازه فرمولاسیونهای حاوی نانو لیپوزوم (نمونه‌های۵،۶،۷،۸،۱۰،۱۱،۱۲،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸)

زمان (روز) / نمونه	۰	۱۵	۳۰	٤٥	٦٠
۵	۰/۶۳±۰/۰۰۲^{a}	۰/۶۳±۰/۰۰۱^{a}	۰/۶۳ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۶۳۱±۰/۰۰۱^{ab}	۰/۶۳±۰/۰۰۲^{b}
۶	/۴۳ ±۰/۰۰۳^{a}	۰/۴۳ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۴۳ ±۰/۰۰۲^{a}	۰/۴۳ ±۰/۰۰۲^{a}	۰/۴۳±۰/۰۰۳^{a}
۷	۰/۵۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۷±۰/۰۰۲^{a}	۰/۵۷±۰/۰۰۲^{a}
۸	۰/۵۵±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۵ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۵±۰/۰۰۲^{a}	۰/۵۵±۰/۰۰۲^{a}	۰/۵۴۷±/۰۰۳^{a}
۱۰	۰/۵۳±۰/۰۰۳^{a}	۰/۵۳±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۳±۰/۰۰۱^{a}	۰/۵۲۵±۰/۰۰۲^{a}	/۵۲۵±۰/۰۰۱^{a}
۱۱	۰/۴۳±۰/۰۰۳^{a}	۰/۴۳۲±/۰۰۱^{a}	۰/۴۳۱±۰/۰۰۲^{a}	۰/۴۳۱±۰/۰۰۲^{a}	۰/۴۳±۰/۰۰۳^{a}
۱۲	۰/۸۳±۰/۰۰۲^{a}	۰/۸۲±۰/۰۰۳^{a}	۰/۸۳±۰/۰۰۱^{a}	۰/۸۴۳±۰/۰۰۵^{a}	۰/۸۴±۰/۰۰۶^{a}
۱۴	۰/۶۶±۰/۰۰۱^{a}	۰/۶۶±۰/۰۰۱^{a}	۰/۶۵±۰/۰۰۲^{a}	۰/۶۶±۰/۰۰۳^{a}	۰/۶۶±۰/۰۰۳^{a}
۱۵	۰/۷۷±۰/۰۰۲^{a}	۰/۷۷±۰/۰۰۱^{a}	۰/۷۷ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۷۸±۰/۰۰۱^{b}	۰/۷۸±۰/۰۰۲^{b}
۱۶	۰/۷۹±۰/۰۰۳^{a}	۰/۷۸±۰/۰۰۱^{a}	۰/۷۸±۰/۰۰۲^{a}	۰/۷۹±۰/۰۰۲^{b}	۰/۷۹±۰/۰۰۳^{b}
۱۷	۰/۸۳±۰/۰۰۱^{a}	۰/۸۳ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۸۳ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۸۴±/۰۰۲^{b}	۰/۸۴±/۰۰۲^{b}
۱۸	۰/۹۹±۰/۰۰۱^{a}	۰/۹۹ ±۰/۰۰۱^{a}	۰/۹۹ ±۰/۰۰۲^{b}	۱/۰۰۱±۰/۰۰۲^{b}	۱/۰۱±۰/۰۰۳^{b}

*میانگین‌هایی دارای حروف مشابه در یک ستون بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند

www.SID.ir

Archive of SID

الف) با توجه به اینکه در این تحقیق در ترکیب لیپیدی از کلسترول استفاده شده است و با افزودن کلسترول به علت برقراری پیوند با گروه کولین فسفولیپید و پر کردن فضاهای ایجاد شده توسط زنجیره‌های آسیل فسفاتیدیل کولین ساختار سفت‌تر می‌شود و وزیکول‌ها، پایداری بیشتری در برابر تنش‌های برشی وارد شده خواهند داشت (Caddeo *et al.,* 2008). بعلاوه افزودن کلسترول در فرمولاسیون ماندگاری مادهٔ کپسوله شده را تقویت می‌بخشد. به عبارت دیگر افزودن کلسترول به ساختار منجر به کاهش نفوذ پذیری غشای لیپوزومی می‌شود (کیانوش خسروی دارانی و محمدرضا مظفری، ۱۳۹۰).

ب) خلوص مواد اولیه نیز در تهیه لیپوزوم‌ها اهمیت بسیاری دارد به نحوی که وجود اندکی ناخالصی مانند اسیدهای چرب و یا سایر ناخالصی‌ها، فرآیند تهیه لیپوزوم را با مشکل مواجه ساخته و بر بار سطحی و خصوصیات تراوایی لیپوزوم و نیز قابلیت انحصار و انکپسولاسیون تاثیر خواهدگذاشت (Zimet *et al.,* 2009) نتایج کیانوش خسروی دارانی و محمدرضا مظفری (۱۳۹۰) برروی پایداری نشان داده که، لیپوزوم‌هایی که فاقد بار الکتریکی هستند، تمایل به تجمع دارند و با استفاده از لیپیدهایی باردار مثل فسفاتیدیل گلیسرول (حتی در pH اسیدی) می‌توان این تجمع را کند و یا از آن جلوگیری کرد.

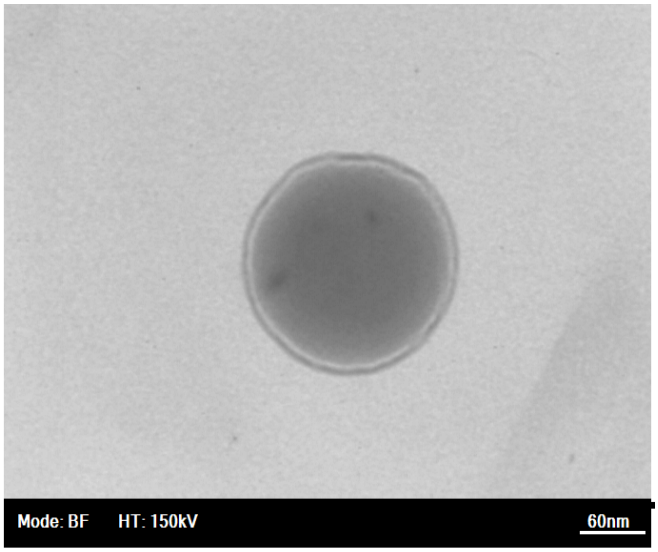
ج) دلیل دیگر پایداری لیپوزوم‌ها طی زمان را می‌توان به نگهداری فرمولاسیون لیپوزومی در تاریکی، دور از نور و دمای یخچال اشاره نمود. نور و اکسیژن نفوذپذیری غشا را افزایش داده و موجب افزایش رهاسازی حامل می‌شوند(Caddeo *et al.,* 2008). در واقع، دما و نور منجر به تغییر در ساختار لیپید، نرم شدن غشا و کاهش پتانسیل زتا می‌شوند که منجر به کاهش نیروی دافعه بین ذرات و توده‌ای شدن ذرات می‌شود. در واقع رابطه خطی بین لگاریتم سرعت هیدرولیز فسفولیپید و عکس دمای تشکیل لیپوزوم از فسفاتیدیل کولین وجود دارد (Freitas *et al.,* 1998). نتایج حاصل از نگهداری فرمولاسیون لیپوزومی، حاوی آهن در دمای ۴°C نشان داد که، پایداری لیپوزوم‌ها به بیش از دو ماه رسید در حالی که پایداری همان سیستم لیپوزومی در دمای اتاق به شدت کاهش یافت (Shuqin *et al.,* 2005).

کارایی درون پوشانی

مقدار پروتئین موجود در فرمولاسیون بهینه، براساس فرمول محاسبه و میزان درون پوشانی در حدود ۳۰٪ محاسبه گردید. در پژوهشی که زایرزاده و همکاران (۱۳۹۰)، انجام دادند میزان نایسین درون پوشانی را ۱۲/۴۹٪ و ۱۱/۷۲٪ گزارش کردند. در این پژوهش از عوامل تاثیرگذار در میزان درون‌پوشانی نایسین، به نوع فسفولیپید مورد استفاده و همچنین کاهش درصد محصورسازی را به اندازه نانوکپسول‌های لیپوزومی از طریق تاثیر شدیدتر نایسین بر تک لایه لیپوزومی، نسبت داده شد.

میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به منظور بررسی مورفولوژی ذرات، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه بهینه شده، تهیه شد (شکل۲). تصویر مربوطه وجود وزیکول-های کروی شکل یونی لاملار[1] با اندازه ۱۸۰ نانومتر را نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی گذاره

1- ULVS (Unilamellar Vesicles)

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

در پژوهشی که انجام شد معلوم گردید کـه از بـین متغییرهـای مـورد بررسی در فرآیند تولید نانولیپوزوم‌ها، دور همزن و زمان فرآینـد تـاثیر زیادی بر روی اندازه ذرات دارند همچنـین نتـایج حاصـل از پایـداری فیزیکی، به تاثیر سایز ذرات در حفظ پایداری طی زمان اشاره می‌کنـد به طوری که نمونه‌های کمتـر از ۵۰۰ نـانومتر در فرمولاسـیون‌هـای حاوی کلسترول، تحت دمای $4^{\circ}C$ بیشـترین پایـداری را نسـبت بـه نمونه هایی با اندازه بزرگتر، داشتند.

منابع

جعفری تپه، ه.، (۱۳۸۶)، بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم فیتاز به وسیله قارچ آسپرژیلوس فیکوم بر روی سبوس گندم در تخمیر حالت جامـد، پایـان نامه کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی (علوم و صنایع غذایی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

خسروی دارانی، ک. و مظفری، م.ر.، ۱۳۹۰، نانولیپوزوم‌ها: کاربردهای درمانی و صنعتی، انتشـارات دانشـگاه علـوم پزشـکی شـهید بهشـتی، انسـتیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، ۶۹ تا ۶۵.

زایرزاده، ا.، مرتضوی، س.ع.، جعفری، م.ر.، افشارنژاد، س.، طباطبایی یزدی، ف. و نصیری محلاتی، م.، ۱۳۹۰، بررسی اثـر ضـدباکتریایی نایسین به دو فرم آزاد و نانوانکپسوله در لیپوزوم بر مانـدگاری و کـاهش جمعیـت لیسـتریایی پنیـر سـفید ایرانـی فرآپـالایش، نشـریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۳، ۱۹۹ تا ۱۹۱.

مبصری، ص.، ملک زاده، ف.، پوربابایی، ا.ع. و جندقی، پ.، ۱۳۸۸، ارزیابی تأثیر نایسین روی کاهش غلظت نگهدارنده های شیمیایی مـواد غـذایی، مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ۳، ۲۰۰ تا ۱۹۷.

Colas, J.C., Wanlong. S., Malleswara, V.S.N., Omri, A. & Mozafari, M.R., 2007, Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. Micron, 38, 841–847.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A. & Degraeve, P., 2008, Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. Food Control, 19, 982–989.

Caddeo, C., Teskač, K., Sinico, C. & Kristl, J., 2008, Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. International Journal of Pharmaceutics, 363, 183-191.

Da silva Malheiros, P., Micheletto, Y.M.S. & Silveira, N.P.D., 2011, Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. Food Research International, 43, 1198–1203.

Freitas, C. M. & uller, R. H., 1998, Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. International Journal of Pharmaceutics, 168, 221–229.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. E. & Benoit, J. P., 2003, Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials, 24, 4283-4300.

Kallinteri, L.D., Kostoula, O.K. & Savvaidis, I.N., 2013, Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. Food Microbiology, 36, 176-181.

Mozafari, M., Reed, C., Rostron, C. and Piskin, E., 2002, Formation and characterization of non-toxic anionic liposomes for delivery of therapeutic agents to the pulmonary airways. Cellular and molecular biology letters, 72, 243 – 244.

Mozafari, M. & Mortazavi, S., 2005, an overview of manufacturing techniques. International Journal of Liposome Research, 18, 309-327.

Mozafari, M., Flanagan, J., Matia-merino, L. & Awati, A., 2006, Recent trend in lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in food. Journal of the science of food and agriculter, 86, 2038 – 2045.

Mozafari, M., Johnson, C. & Demetzos, C., 2008, Nanoliposomes and their application in food nanotechnology. International Journal of Liposome Research, 18, 308– 336.

Phikunthong, K., Varissaporn, M. & Warin, C., 2011, Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. Food Research International 44, 605–612.

Sobrino-Lopez, A. & Martın-Belloso, O., 2008, Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal, 18, 329–343.

Schrooyen, P. & kruif, G., 2001, microencapsulation: its application in nutrition. Trend in biotechnology, 60, 475- 479.

Shuqin, Xia. & Shiying, Xu., 2005, Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. Food Research International, 38, 289–296.

Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S. & Makino, S., 1986, Urinary protein as measured

www.SID.ir

Archive of SID

with a pyrogallol red-molybdate complex. Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clincal Chemistry, 32, 1551-1554.

Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, S., Yılmaz, S. & Aksoy, H., 2011, The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. Food and Chemical Toxicology, 49, 763–769.

Zimet, P. & Livney, Y. D., 2009, Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. Food Hydrocolloids, 23, 1120-1126.

www.SID.ir

Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 171-180

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۸۰-۱۷۱

Evaluation of factors affecting at preparation of nanoliposomes containing nisin using Response surface methodology

S.tizchang[1] –M. Sowit khiabani[2*] – R. Rezaie mokaram[3]

Received: 01-10-2013
Accepted: 07-10-2014

Abstract

Nisin has numerous applications as a natural preservative in foods, including dairy product, canned food, processed cheese and milk. Several studies demonstrated that proteolytic degradation and the interaction of nisin with food components might result in decreased its antimicrobial activity. Encapsulation of antimicrobial peptides into nanoliposomes may offer a potential alternative to protect antimicrobials, enhancing their efficacy and stability for food applications. In first stage of this research, Response Surface methodology was used for optimization of nanoliposomes produced by heating method. A central composite design (CCD) consisting of 18 experimental run with three independent variables: phospholipid concentration (2-30 mM), stirring speed (500-1360 rpm) and processing time (30-90 min) were used and their effects on size of nanliposome were evaluated.In the next stages, stability of nanoliposomes was investigated during 2 month. The optimum operating conditions obtained from the quadratic form of RSM model for particle size were phospholipids 30 (mM), stirring speed 930 (rpm) and process time 90 (min). The results of stability indicated that samples in the range of 400 to 500 nm were stable up to 2 month ($P > 0/05$) but samples larger than 500 nm were unstable during 2 month but stable up to 1 month($P < 0/05$).

Keywords: Antimicrobial peptides, Nisin, Encapsulation, Nano liposomes, Response surface methodology, Stability.

1,2,3- MSc. Student and Professors, Food Science And Technology, Tabriz University, Tabriz, Iran
(* - Corresponding Author Email: M.Sowti@tabriz.ac.ir)

www.SID.ir