

نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز به روش Thin film layer و ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن

بهشاد نوح دوست^۱، نگین نوری^{۲*}، حسن گندمی نصرآبادی^۳، افشین آخوندزاده بستی^۴

۱. دانشجوی تخصصی گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استادیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴. استاد گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: nnoori@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۴/۶/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۴/۱۰/۱۳)

چکیده

استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله عصاره چای سبز در آماده‌سازی مواد غذایی و صنایع داروسازی محدود می‌باشد. کپسولاسیون مواد در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک سیستم محافظتی از ترکیبات طبیعی در طی فراوری و نگهداری آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم عصاره چای سبز و همچنین محتوای فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH و خاصیت ضد میکروبی به روش چاهک بر علیه باکتری‌های باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریم 138 فازتایپ ۲، اشریشیا کولای O₁₅₇:H₇ و لیستریا مونوسیتوژنز تعیین شد. میانگین قطر نانولیپوزوم‌ها حدود $1/9 \pm 44/7$ نانومتر و شاخص پلی‌دیسپرسیته $0/14 \pm 0/203$ بود. بازده محصورسازی نانولیپوزوم چای سبز تحت شرایط بهینه ۹۷٪ به‌دست آمد. فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز به‌طور معنی‌داری پس از کپسوله کردن در نانولیپوزوم افزایش یافت ($P < 0/05$). بیشترین فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم چای سبز مربوط به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز با منطقه مهار رشد ۱۶/۲ میلی‌متر بود، درحالی‌که باکتری اشریشیا کولای با هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متری مقاوم‌ترین باکتری شناسایی شد. علاوه بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی چای سبز پس از کپسولاسیون در نانولیپوزوم به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0/05$). به‌طوری‌که میزان IC₅₀ آن به ۱/۷۸ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت که نانوکپسولاسیون به‌طور مؤثری تأثیرات مفید عصاره چای سبز از جمله خواص ضد میکروبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش می‌دهد. لذا جهت افزایش پایداری ترکیبات طبیعی در طی فرایندهای مختلف پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: عصاره چای سبز، کپسولاسیون نانولیپوزومی، فیلم نازک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی

مقدمه

امروزه، ترکیبات طبیعی به دلیل داشتن خواص مفید و نداشتن عوارض جانبی مواد شیمیایی مشابه، مورد توجه مصرف‌کنندگان قرار گرفته و به همان میزان، استفاده از این ترکیبات در صنایع غذایی به عنوان مواد ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان و نگهدارنده روبه افزایش است.

چای سبز با نام علمی (*Camellia sinensis*) یکی از رایج‌ترین گیاهان دارویی پر مصرف در جهان است که در محصولات آرایشی، دارویی و غذایی کاربرد دارد. این گیاه حاوی مقادیر بالایی از پلی‌فنول‌ها می‌باشد که کاتچین‌ها از پلی‌فنول‌های اصلی آن به شمار می‌آید و از بین آن‌ها اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات ترکیب اصلی و فعال آن از نظر بیولوژی می‌باشد (Yang and Koo, 1997). ترکیبات پلی‌فنلی (کاتچین) در چای سبز بیشتر از چای سیاه (چای سبز اکسید شده) می‌باشد. اثرات سلامت‌بخش چای سبز عبارتند از: کاهش خطرات بیماری‌های قلبی عروقی، کاهش بروز بعضی از سرطان‌ها، ضد فشار خون، کنترل وزن بدن به علت کاهش اشتها، خاصیت پری‌بیوتیکی، ضد میکروبی و ضد ویروسی، محافظت در برابر اشعه ماورای بنفش خورشید، افزایش تراکم استخوان و تأثیر مثبت بر عملکرد سیستم عصبی (Donsi et al., 2011).

در سال‌های اخیر، چای سبز به دلیل خواص مفید آن از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، جایگاه مناسبی در صنایع غذایی و دارویی به خود اختصاص داده است (Su et al., 2008; Zou et al., 2014). پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز، با دادن اتم هیدروژن، توانایی غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد،

مختل کردن واکنش‌های زنجیره اکسیداسیون را داشته و

کاهش اثرات مخرب اکسیداسیون دارند.

گزارشات متناقضی در مورد فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز بر علیه باکتری‌های پاتوژن وجود دارد. هارا و ایشیگامی گزارش کرده‌اند که *سالمونلا تیفی-موریوم* و *کمپیلوباکتر ژورثنی* به عصاره چای سبز مقاوم بوده در حالی که سایرین حساسیت *سالمونلا تیفی-موریوم* را به عصاره آبی چای سبز بیان کرده‌اند (Hara and Ishigami, 1989). از سوی دیگر، به‌رغم اثرات سودمند، ترکیبات چای سبز فراهمی زیستی پایینی دارند و همچنین ناپایدار بودن در طی فرایند تولید و نگهداری و عدم تحمل شرایط نامساعد محیطی باعث محدودیت استفاده از آن می‌شود (Huang et al., 2011). بنابراین استفاده از روش‌های جدید جهت محافظت انتخابی ترکیبات طبیعی در طی پروسه تولید و نگهداری، ضروری به نظر می‌رسد. به همین منظور، روش‌های متفاوتی مانند کپسوله کردن ترکیبات اصلی، نظیر نانوذرات (Liang et al., 2011)، میکروذرات (Lu et al., 2011)، لیپوزوم‌ها (Gülseren et al., 2012, Gülseren and Corredig, 2013) و... پیشنهاد شده است.

نانوکپسولاسیون یکی از روش‌های نوین جهت افزایش پایداری فیزیکی ترکیبات فعال زیستی، محافظت این ترکیبات در مقابل عوامل نامساعد محیطی و اثرات تداخلی ترکیبات غذایی، می‌باشد. این روش شامل دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها بوده که منجر به ایجاد ساختارهایی در اندازه نانو شده (اغلب ۱۰۰ نانومتر یا کمتر) که باعث حفظ خواص آن نیز می‌گردد. از نانوکپسولاسیون به عنوان یک تکنولوژی نوین در بسته‌بندی مواد فعال به اندازه‌های کوچک با استفاده از

به ۱۰ وزنی/حجمی، ۱۰۰ درجه سلسیوس) تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه همراه با هم‌زدن جوشانده و به‌وسیله فیلتراسیون ذرات جامد آن گرفته شد. عصاره حاصله در آن با حرارت ۶۰ درجه سلسیوس خشک گردید و در ۴ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده ذخیره شد (Molan *et al.*, 2009).

- تهیه نانولیپوزوم حاوی عصاره آبی چای سبز:

مقادیر مناسبی از لسیتین، کلسترول DSP-mPEG 2000 (۱ و ۲ دی استرول فسفاتیدیل اتانول آمین - متیل - پلی اتیلن گلیکول کونژوگه - ۲۰۰۰ (سدیم + نمک)) (Nanocs, USA) در ۵ میلی لیتر اتانول (Carlo erba, France) حل شده و پس از انتقال به بالن ته گرد به دستگاه روتاری تحت خلا (IKA, Germany) با دمای ۵۰ درجه سلسیوس متصل گردید. بعد از تبخیر حلال، لایه نازک فاز لیپیدی در سطح داخلی بالن ته گرد دیده شد که به‌وسیله پمپ خلاء خشک گردید (Camarillo, CA, USA). سپس فاز آبی که حاوی ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه به‌همراه عصاره چای سبز می‌باشد، به بالن اضافه و مجدداً به دستگاه روتاری بدون خلأ در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌منظور حل شدن کامل فاز لیپیدی در فاز آبی متصل شد، و در نهایت سوسپانسیون لیپوزومی تشکیل گردید (Fang *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2008). سپس به‌منظور کاهش اندازه و تولید نانولیپوزوم‌ها در سایز مناسب از دستگاه سونیکاسیون (mesonix sonicator, USA) یا امواج مافوق صوت برای ۳۰ دقیقه استفاده گردید.

تکنیک‌هایی مانند نانوکمپوزیت، نانوامولسیفیکاسیون، نانوساختارها و در نهایت فراهم کردن محصول نهایی فراسودمند که آزادسازی کنترل شده هسته را در بر می‌گیرد، استفاده می‌شود. ترکیبات نانوکپسوله به‌دلیل اندازه کمتر از سلولشان فعالیت زیستی بالاتری دارند. همچنین از این روش جهت حفاظت از ترکیبات فعال در مقابل عوامل محیطی مانند اکسیژن، نور، رطوبت و pH نیز استفاده می‌شود. یکی از انواع نانوساختارها، لیپوزوم‌ها هستند. لیپوزوم‌ها در واقع وزیکول‌های ریز و توخالی دارای یک یا چند غشا لیپیدی دولایه هستند که در مرکز آنها هسته مایعی قرار دارد و می‌توانند مواد فعال را در فضای درونی خود به دام بیندازند. کپسولاسیون توسط لیپوزوم‌ها از مواد فعال زیستی در مقابل هضم در دستگاه گوارش محافظت کرده، میزان جذب گوارشی را افزایش داده، که در نهایت باعث افزایش فراهمی زیستی و فعالیت زیستی آن‌ها می‌شود (Takahashi *et al.*, 2005). سازگاری زیستی، سایزهای وزیکولی مختلف و شارژ سطحی، از ویژگی‌های نانولیپوزوم‌ها می‌باشد (Lee *et al.*, 2005). یکی از روش‌های تولید لیپوزوم‌ها، تهیه فیلم نازکی از مواد و سپس تبدیل آن به اندازه و مقیاس نانو توسط شکستن با امواج مافوق صوت است. هدف از این مطالعه نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز به روش فیلم نازک و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیه عصاره آبی چای سبز

برگ‌های چای سبز از مزارعی از استان گیلان در شمال ایران جمع‌آوری شد. عصاره آبی چای سبز با مخلوط کردن برگ‌های چای خرد شده در آب مقطر (۱)

- خواص فیزیکی - شیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی

در این مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی عصاره چای سبز نانولیپوزومی، از جمله میزان محصورسازی، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی میزان محصورسازی عصاره چای سبز در نانولیپوزومها و همچنین جدا کردن عصاره آزاد از نانولیپوزومها از روش دیالیز به شرح زیر استفاده شد (Trota *et al.*, 2002; Fočo *et al.*, 2005). ابتدا ۳ میلی لیتر محلول لیپوزومی حاوی عصاره را در یک کیسه دیالیز استات سلولز (۱۲۰۰۰ وزن مولکولی، کانادا) ریخته و در ۸۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه غوطه ور شد. سپس با سرعت ۳۰ دور در دقیقه به مخلوط و نمونه‌های گرفته شده از محلول اصلی در فواصل زمانی مشخص، با حجم مساوی از حلال تازه جایگزین و در نهایت میزان عصاره چای سبز آزاد در ۲۷۰ نانومتر خوانده شد (Shimadzu, Markham, Canada).

این آزمایش هنگامی که میزان غلظت عصاره در برداشت‌های متوالی از محلول ثابت گردید، متوقف و سپس درصد کپسولاسیون و بازده با توجه به معادله زیر تعیین گردید:

$$\text{محصورسازی} = \frac{(\text{عصاره آزاد شده}) - (\text{مقدار کل عصاره})}{(\text{مقدار کل عصاره})} \times 100\%$$

ذرات نانولیپوزوم توسط دستگاه (Dynamic laser (Brookhaven Instruments DLS light scattering Corporation, USA) اندازه‌گیری و پتانسیل زتا نیز با دستگاه اندازه‌گیری زتا (Malvern Instruments, England, UK) تعیین شد. آزمایشات با سه تکرار برای هر نمونه انجام شد. همچنین ریخت‌شناسی

نانولیپوزوم‌های چای سبز توسط میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردید.

- ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

توانایی آنتی‌اکسیدانی محلول چای سبز (دادن اتم هیدروژن یا الکترون)، قبل و بعد از کپسوله کردن در نانولیپوزوم، با ارزیابی کاهش رنگ بنفش محلول متانولی DPPH اندازه‌گیری شد. این ارزیابی اسپکتوفتومتری با استفاده از رادیکال مقاوم DPPH به- عنوان معرف بر طبق روش بوریتز و بوکار انجام شد (Burits and Bucar, 2000).

مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی (غلظت‌های مختلف) به ۵ میکرولیتر محلول DPPH (محلول متانولی ۰/۰/۰۰۴) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب آن در مقابل متانول خالص در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و در آخر درصد مهار رادیکال نمونه بر طبق فرمول ذکر شده محاسبه گردید.

$I\% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100$
در این فرمول A_{blank} میزان جذب گروه کنترل (شامل همه اجزا به‌غیر از ترکیب مورد آزمایش) و A_{sample} میزان جذب مواد مورد آزمایش را نشان می‌دهند. نتایج به‌صورت IC_{50} (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به ۵۰ درصد مقدار اولیه برسد) گزارش شده است.

- محتوای فنولی کل

تعیین ترکیبات فنولی موجود در عصاره چای سبز، قبل و بعد از کپسولاسیون نانولیپوزومی توسط روش پیشنهادی باروس و همکاران، انجام شد (Barros *et al.*, 2007). جهت تعیین فنول کل، ۱ میلی لیتر از عصاره (۵

ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. همه پلیت‌ها از نظر میزان عدم رشد در اطراف چاهک بررسی شد. این آزمایشات ۲ بار تکرار شده و نتایج (میلی‌متر ناحیه مهار رشد) به صورت میانگین اعلام گردید (Tepe et al., 2004)

- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌های حاصل از اثر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی از نرم‌افزار SPSS 19.0 استفاده گردید و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار با استفاده از تست یک طرفه ANOVA بیان شد. مقایسه بین داده‌های مختلف و اختلاف معنی‌دار آن‌ها، با استفاده از تست Tukey انجام شد ($P < 0/05$).

یافته‌ها

- خواص فیزیکیوشیمیایی و مورفولوژی

خصوصیات و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و بازده کپسولاسیون مورد ارزیابی انجام گرفت. در شکل شماره (۱) مورفولوژی (الف) و اندازه نانولیپوزوم (ب) عصاره چای سبز، توسط میکروسکوپ الکترونی و DLS نشان داده شده است که لیپوزوم‌های بدست آمده، وزیکول‌هایی با اشکال کروی هستند که پراکندگی مناسبی دارند. میانگین قطر ذرات $44/7$ نانومتر و شاخص پراکندگی $0/203 \pm 0/014$ می‌باشد. پتانسیل زتا -12 میلی‌ولت و بازده نانوکپسولاسیون 97% می‌باشد.

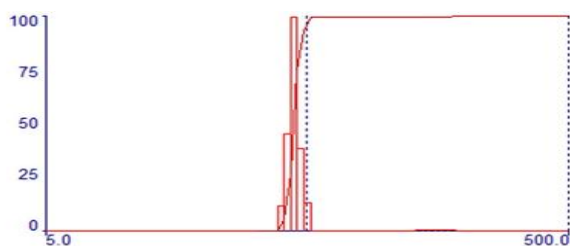
میلی‌گرم/میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (Merck, Germany) ترکیب شده، بعد از ۳ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم (7.5%) (Merck, Germany) w/v به مخلوط افزوده شد و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد.

جذب نمونه‌ها پس از ۹۰ دقیقه قراردادن نمونه‌ها در دمای اتاق و محیط تاریک با دستگاه اسپکتروفوتومتر ماورای بنفش در ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک (متانول) خوانده شد. مقادیر فنول کل عصاره با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک اسید/گرم عصاره اندازه‌گیری شد.

- ارزیابی عملکرد ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی به وسیله روش چاهک بر طبق روش (NCCLS, 1999) انجام شد. این آزمایش بر روی ۴ میکروارگانیزم بیماری‌زا مطرح در مواد غذایی انجام گردید: باسیلوس سرئوس (ATCC, 11778)، سالمونلا تیپی موریوم ۱۳۸ فاژتایپ ۲، اشریشیا کولای O₁₅₇:H₇ و لیستریا مونوسایتوزنز (ATCC19118).

همه میکروارگانیزم‌ها به محیط (BHI brain heart infusion broth) براث تلقیح شده و برای رسیدن به میزان 10^6 CFU/ml (colony-forming unit/milliliter) در محلول سالین رقیق شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از آن‌ها به صورت سطحی در پلیت‌های نوترینت آگار کشت داده شد. بعد از کشت، چاهک‌هایی (۸ میلی‌متری) در آگار ایجاد شده و این چاهک‌ها با ۷۰ میکرولیتر از ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی پر گردید. پلیت‌های آماده به مدت ۲۴



(الف)

شکل (۱) - الف: اندازه ذرات بدست آمده بر اساس غلظت



(ب)

شکل (۱) - ب: عکس میکروسکوپ الکترونی نانولیپوزوم چای سبز

یافت، به طوری که IC ۵۰ عصاره چای سبز نانولیپوزومی به $۱/۷۸ \pm ۰/۳$ میکروگرم بر میلی لیتر کاهش یافت.

- محتوای فنولی کل

در این مطالعه، محتوای فنولی کل عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی ارزیابی شد. همان طور که در جدول (۱) نشان داده شده است، محتوای فنولی کل در عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی، به ترتیب $۲۹/۶۵ \pm ۱/۵$ و $۸۸/۸۶ \pm ۳/۸۴$ میلی گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره بود.

- عملکرد آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی براساس میزان مهار DPPH و با اصطلاح IC₅₀ در جدول (۱) آمده است. مقدار IC ۵۰ عصاره چای سبز آزاد برابر با $۱۲/۴۹ \pm ۰/۶$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره چای سبز به طور معنی داری بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم افزایش

جدول (۱) - میانگین محتوای فنولی کل (میلی گرم اسید گالیک / گرم عصاره) و فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH (میزان IC₅₀ بر حسب میکروگرم / میلی لیتر) عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

نمونه	محتوی فنولی کامل	IC ₅₀
عصاره چای سبز آزاد	$۲۹/۶۵ \pm ۱/۵^*$	$۱۲/۴۹ \pm ۰/۶$
عصاره چای سبز نانولیپوزومی	$۸۸/۸۶ \pm ۳/۸۴$	$۱/۷۸ \pm ۰/۳$

* انحراف معیار \pm میانگین

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر تفاوت آماری معنی دار می باشد ($P < ۰/۰۵$).

- عملکرد ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

فعالیت ضد میکروبی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر علیه ۴ باکتری پاتوژن مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج مربوطه در جدول (۲) گزارش شده است. عصاره چای سبز آزاد در مقابل همه باکتری‌های مورد آزمایش، نقش بازدارندگی از خود نشان داد. در بین باکتری‌ها *سالمونلا تیفی موریوم* منطقه عدم رشد بیشتری (۱۲/۳ میلی‌متر) در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشته، در

حالی که *باسیلوس سرئوس* کمترین حساسیت را نشان داد. فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز بعد از کپسوله کردن در نانولیپوزوم به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین و قویترین فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز نانولیپوزومی در برابر *لیستریا مونوسییتوزنز* با منطقه مهار رشد ۱۶/۲ میلی‌متری بود، در صورتی که *اشریشیا کلای* با منطقه عدم رشد ۱۴ میلی‌متری، بیشترین مقاومت را داشته است.

جدول (۲) - فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی (بر حسب میلی‌متر ناحیه مهار رشد)

گونه باکتری	منطقه بدون رشد	
	عصاره چای سبز آزاد	عصاره چای سبز نانولیپوزومی
<i>لیستریا مونوسییتوزنز</i>	۱۰/۹۲ ± ۰/۰۵	۱۶/۲ ± ۰/۰۱
<i>باسیلوس سرئوس</i>	۱۰/۶۱ ± ۰/۰۲	۱۵/۶ ± ۰/۰۳
<i>سالمونلا تیفی موریوم</i>	۱۲/۳ ± ۱/۳	۱۵/۷ ± ۰/۵
<i>اشریشیا کلای O157: H7</i>	۱۲/۱ ± ۰/۰۳	۱۴ ± ۰/۹

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند سایز ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان محصورسازی ارزیابی شد. بر طبق نتایج منتج شده از روش DLS، وزیکول‌ها پراکندگی قابل قبولی داشتند و شاخص پراکندگی پایینی به دست آمد. در مطالعات پیشین که پلی‌فنول‌های چای سبز را با روش‌های مختلفی مانند هموزنیزه کردن با فشار بالا، روش فیلم نازک و ترکیب تزریق اتانل و فشار بالا نانوکپسوله کرده‌اند میانگین اندازه ذرات به دست آمده به ترتیب کمتر از ۱۰۰ (Gulseren and Corredig, 2013)،

۱۶۰/۴ (Lu et al., 2011) و ۶۶/۸ (Zou et al., 2014) نانومتر بود. در حالی که در مطالعه حاضر قطر به دست آمده ۴۴/۷ نانومتر و ۴/۵ برابر کمتر از اندازه استاندارد ذرات نانو (۲۰۰ نانومتر) می‌باشد. احتمالاً این تفاوت در اندازه ذرات به میزان نیروی مکانیکی به کار رفته بستگی دارد که در صورت استفاده از نیروی بیشتر، ذرات کوچکتری حاصل می‌گردد. همچنین استفاده از اتانل می‌تواند باعث تغییر بار سیستم شده و درجه پایداری استری را تغییر دهد که منجر به کاهش سایز ذرات می‌شود (Heurtault et al., 2003). بار سطحی و در نتیجه پایداری نانوذرات توسط پتانسیل زتا سنجیده می‌شود که یک پارامتر مهم در انعکاس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری بیولوژیکی نانوذرات تولید

محصورسازی بالا یکی از بهترین روش‌ها جهت تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی می‌باشد (Fang et al., 2006). همچنین تحقیقات مختلف بیانگر این است که ترکیبات فنلی که از عوامل موثر در چای سبز می‌باشند با بازده بیشتری در لیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی محصور می‌گردند، زیرا در این حالت تراوایی غشاء نانولیپوزوم‌ها نسبت به حالتی که بار سطحی نانولیپوزوم‌ها مثبت یا خنثی باشد، حداقل است (Fang et al., 2006).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی از طریق ارزیابی میزان حذف رادیکالی DPPH انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو نوع عصاره آزاد و نانولیپوزومی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند که البته بعد از نانوکپسولاسیون افزایش معنی‌داری داشت. در گزارشات آمده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز به ترکیبات فنولی خاص، مواد معدنی آن و ویتامین‌ها ارتباط دارد (Namita et al., 2012). در همین راستا، اسپینگو و همکاران نشان دادند که تکنولوژی کپسولاسیون نانولیپوزومی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی را در مقابل اکسیداسیون لیپیدی، از طریق پخش شدن بهتر آن در محیط و در دسترس قرار دادن هرچه بیشتر، بهبود می‌دهد (Spigno et al., 2013).

همچنین، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که محتوای فنولی کل عصاره چای سبز نانولیپوزومی از عصاره چای سبز آزاد بیشتر است. این دستاورد می‌تواند علت فعالیت آنتی‌رادیکالی بالاتر عصاره چای سبز نانولیپوزومی را در مقایسه با عصاره چای سبز آزاد توجیه کند. لاکسیمون-راما و همکاران بیان کردند که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

شده در سوسپانسیون می‌باشد. پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های چای سبز ۱۲/۶ - میلی ولت و به ترتیب بیشتر و کمتر از نتایج به دست آمده از مطالعات زو و همکاران و نیز لو و همکاران بوده که به ترتیب برابر با ۶/۱۶ - و ۶۷/۲ - میلی ولت گزارش شده است (Lu et al., 2014, Zou et al., 2011). علت تفاوت در پتانسیل زتا به نوع فسفولیپید و کلسترول به کار رفته در تولید نانولیپوزوم بستگی دارد، چون این دو ماده از ترکیبات اصلی نانولیپوزوم‌ها هستند. ثابت شده است که سوسپانسیون‌ها با پتانسیل زتای بیشتر، به دلیل دافعه بین ذرات باردار، پایدارتر بوده و بنابراین در برابر تمایلشان به تجمع مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند (Heurtault et al., 2003). همچنین در مطالعه‌ای مانسروی و همکاران نشان دادند که لیپوزوم‌ها با بار منفی نسبت به بار مثبت قابلیت بهتری جهت حفظ مواد درونی خود دارند (Manosroi et al., 2002).

میزان محصورسازی یکی از فاکتورهای تعیین کننده در استفاده نانولیپوزوم‌ها در صنعت می‌باشد و عواملی مانند مواد دیواره، ساختمان کپسول و واکنش بین مواد موجود در دیواره و درون هسته تاثیر گذار می‌باشند. در این مطالعه میزان محصورسازی عصاره چای سبز نانولیپوزومی تولید شده در شرایط بهینه، ۹۷ درصد بوده که بالاتر از بازده ۷۸/۵ درصدی گزارش شده توسط زو و همکاران می‌باشد (Zou et al., 2014). فان و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز نشان دادند که فاکتورهای مختلفی مانند استفاده از مقادیر مناسب کلسترول و لیپید باعث افزایش میزان محصورسازی و نیز پایداری نانوذره‌ها می‌شود (Fan et al., 2008). به همین دلیل استفاده از روش فنگ و همکاران به دلیل داشتن بازده

اظهار کردند که استفاده از نانولیپوزوم‌ها می‌تواند انتقال سلولی و رهاسازی ترکیبات فعال را درون سلول‌های باکتری بهبود بخشد (Liolios *et al.*, 2009). این می‌تواند به دلیل واکنش بین نانولیپوزوم‌ها و سلول‌های باکتری باشد که از راه‌های مختلفی مانند نقل و انتقالات درون غشایی، رهایش تماسی، اتصال و الحاق، جذب و فاگوسیتوز انجام می‌گردد (Zou *et al.*, 2014). اما از سویی زو و همکاران چنین بیان کرده‌اند که فعالیت ضد میکروبی مواد بیولوژیک توسط نانوکپسولاسیون به دلیل ممانعت از رهایش مواد اصلی از درون نانولیپوزوم‌ها، واکنش با پروتئین‌ها و تشکیل رسوب، کاهش می‌یابد (Zou *et al.*, 2014).

در مجموع یافته‌های این تحقیق نشان داد که نانوکپسولاسیون به‌طور مؤثری تأثیرات مفید عصاره چای سبز از جمله خواص ضد میکروبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش می‌دهد. لذا استفاده از نانوکپسولاسیون لیپوزومی به عنوان یک روش جدید جهت افزایش پایداری ترکیبات طبیعی در طی فرایندهای مختلف پیشنهاد می‌گردد.

و محتوای فنولی عصاره‌های گیاهان، میوه‌ها و ... ارتباط خطی وجود دارد (Luximon-Ramma *et al.*, 2002). البته از سوی دیگر، یانگ و همکاران بیان کردند که فعالیت حذف رادیکالی DPPH ویتامین C از طریق کپسولاسیون نانولیپوزومی تغییری نمی‌کند (Yang and Koo, 1997).

در این تحقیق فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر علیه گونه‌های بیماری‌زای چند باکتری مطرح در مواد غذایی آزمایش شد. خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد در مطالعات مختلفی بیان شده است (Hara, 1989, Yamamoto *et al.*, 2000, Amarowicz *et al.*, 1997). در مطالعات مختلف ناز و همکاران و نیز فان و همکاران بیان کردند که پلی‌فنول‌ها نقش مهمی در رسوب پروتئینی و ممانعت از فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها دارند (Naz *et al.*, 2007, Fan *et al.*, 2008). براساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. لیولیس و همکاران

منابع

- Amarowicz, R., Pegg, R. and Bautista, D. (2000). Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli* K₁₂. *Food/Nahrung*, 44: 60-62.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L.M. and Ferreira, I.C. (2007). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8766-8771.
- Burits, M. and Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 323-328.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M. and Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1908-1914.

- Elabbadi, A., Jeckelmann, N., Haefliger, O.P. and Ouali, L. (2011). Complexation/encapsulation of green tea polyphenols in mixed calcium carbonate and phosphate micro-particles. *Journal of Microencapsulation*, 28: 1-9.
- Fan, M., Xu, S., Xia, S. and Zhang, X. (2008). Preparation of solidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology*, 227: 167-174.
- Fang, J.Y., Hung, C.F., Hwang, T.L. and Huang, Y.L. (2005). Physicochemical characteristics and in vivo deposition of liposome-encapsulated tea catechins by topical and intratumor administrations. *Journal of Drug Targeting*, 13: 19-27.
- Fang, J.-Y., Lee, W.-R., Shen, S.-C. and Huang, Y.-L. (2006). Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. *Journal of dermatological science*, 42: 101-109.
- Fang, Y.P., Tsai, Y.H., Wu, P.C. and Huang, Y.B. (2008). Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 356: 144-152.
- Fočo, A., Gašperlin, M. and Kristl, J. (2005). Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *International Journal of Pharmaceutics*, 291: 21-29.
- Gülseren, İ., Guri, A. and Corredig, M. (2012). Encapsulation of tea polyphenols in nanoliposomes prepared with milk phospholipids and their effect on the viability of HT-29 human carcinoma cells. *Food Digestion*, 3: 36-45.
- Gülseren, I. and Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 3242-3251.
- Hara, Y. (1989). Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria (Studies on antibacterial effects of tea polyphenols Part III). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36: 996-999.
- Hara, Y. and Ishigami, T. (1989). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 36: 996-999.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E. and Benoit, J.P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24: 4283-4300.
- Huang, Y.B., Tsai, M.J., Wu, P.C., Tsai, Y.H., Wu, Y.H. and Fang, J.Y. (2011). Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin. *Journal of Drug Targeting*, 19: 709-718.
- Lee, C.M., Lee, H.C. and Lee, K.Y. (2005). O-palmitoylcurdlan sulfate (OPCurS)-coated liposomes for oral drug delivery. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 255-259.
- Liang, J., Li, F., Fang, Y., Yang, W., An, X., Zhao, L., *et al.* (2011). Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82: 297-301.
- Liolios, C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J. and Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus L.* and in vitro antimicrobial activity. *Food chemistry*, 112: 77-83.

- Lu, Q., Li, D.C. and Jiang, J.G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 13004-13011.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A. and Aruoma, O.I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5042-5047.
- Manosroi, A., Podjanasoonthon, K. and Manosroi, J. (2002). Stability and release of topical tranexamic acid liposome formulations. *Journal of Cosmetic Science*, 53: 375-386.
- Molan, A., Flanagan, J., Wei, W. and Moughan, P. (2009). Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemistry*, 114: 829-835.
- Namita, P., Mukesh, R. and Vijay, K.J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology*, 6: 52-59.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. and Sayeed, S. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72: 341-345.
- NCCLS (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 3rd International Supplement: M100-S109.
- Spigno, G., Donsì, F., Amendola, D., Sessa, M., Ferrari, G. and De Faveri, D.M. (2013). Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. *Journal of Food Engineering*, 114: 207-214.
- Su, P., Henriksson, A., Nilsson, C. and Mitchell, H. (2008). Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1837-1842.
- Takahashi, M., Inafuku, K.i., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T., *et al.* (2005). Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of oleo science*, 56: 35-42.
- Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., *et al.* (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 84: 519-525.
- Trotta, M., Peira, E., Debernardi, F. and Gallarate, M. (2002). Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*, 241: 319-327.
- Yamamoto, T., Juneja, L.R. and Kim, M. (1997). Chemistry and applications of green tea, CRC press.
- Yang, T. and Koo, M. (1997). Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacological Research*, 35: 505-512.
- Zou, L.q., Liu, W., Liu, W., Liang, R., Li, T., Liu, C., *et al.* (2014). Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 934-941.

Nanoencapsulation of green tea extract by thin film layer method and its properties

Noudoost, B.¹, Noori, N.^{2*}, Gandomi, H.³, Akhondzadeh Basti, A.⁴

1. Ph.D student of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Associate Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

*Corresponding author email: nnoori@ut.ac.ir
(Received: 2015/9/12 Accepted: 2016/1/3)

Abstract

The application of natural compounds including green tea extract (GTE) in food preparation and pharmaceutical industries is limited. Encapsulation in nanoliposomes could be used as a delivery system to protect these compounds during processing and storage. In this study physicochemical characterization, total phenol content and antibacterial and antioxidant activity of green tea extract encapsulated in nanoliposomes were evaluated. GTE was encapsulated in liposomes by thin film layer method and reached to nanoscale with sonication. The antioxidant activity of nanoliposomal GTE was estimated by DPPH assay. The antibacterial activity of nanoliposomal GTE against *Bacillus cereus* (ATCC11778), *Salmonella typhimurium* 138 phage type 2, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* (ATCC19118) was determined using well diffusion technique. The mean diameter of nanoliposomes was about 44.7 ± 1.9 nm and had 0.203 ± 0.014 polydispersity index. Entrapment efficiency of nanoliposomal GTE under the optimum conditions was 97%. Antibacterial activity of GTE was significantly increased after encapsulation in nanoliposomes. The strongest antibacterial activity of nanoliposomal GTE was seen against *L. monocytogenes* with an inhibition zone of 16.2 mm while *E. coli* was the most resistance strain with an inhibition zone of 14 mm. Furthermore, the antioxidant activity of GTE was significantly increased after nanoliposome encapsulation since the IC50 value of nanoliposomal GTE was decreased to 1.78 $\mu\text{g/ml}$. Nanoencapsulation effectively enhanced beneficial properties of GTE including antimicrobial and antioxidant activities.

Keywords: Green tea extract; Nanoliposome encapsulation; Antioxidant activity; Antibacterial activity