تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی (Zatariamultiflora Boiss) با روش سطح پاسخ

مهین ابراهیمی خوسفی
کیانوش خسروی دارانی*
هدایت حسینی
شیدا اعرابی
رزیتا کمیلی فنود
پالیز کوهی کمالی

دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

امروزه گرایش به مصرف مواد غذایی طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده رونق روزافزونی یافته و از سامانه‌های کلوئیدی مختلف میکروکپسول، میکروکره، نانوامولسیون و لیپوزوم برای ریزپوشانی و افزایش پایداری آن‌ها استفاده شده است. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی شرایط تهیه لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی تولید شده به روش مظفری با استفاده از روش سطح پاسخ و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی آن با اسانس آزاد است.بررسی عوامل مؤثر بر کارایی ریزپوشانی در لیپوزوم به روش طرح مرکب مرکزی با ۳۰ آزمایش برای ۴ متغیر در ۵ سطح انجام شد. درصد وزنی فسفاتیدیل‌کولین (۳ ،۱)، نسبت وزنی اسانس به فسفاتیدیل‌کولین (۱، ۰/۲۵)، دما (°C۵۰-۳۰) و زمان فرایند (۶۰، ۲۰ دقیقه) به عنوان متغیرهای مستقل و درصد ریزپوشانی به عنوان متغیر وابسته یا پاسخ لحاظ شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس روغنی آویشن شیرازی با استفاده از روش رقت‌سازی با لوله در نقاط بهینه تهیه لیپوزوم و در حالت آزاد تعیین شد. نتایج برای تخمین ضرایب مدل و یافتن شرایط بهینه تهیه لیپوزوم با حداکثر درصد ریزپوشانی مطالعه شدند.یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که درصد فسفاتیدیل‌کولین مهم‌ترین پارامتر تأثیرگذار بر درصد ریزپوشانی است. بیشترین کارایی ریزپوشانی با لیپوزوم با فسفاتیدیل‌کولین به میزان ۲/۵٪، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین (۰/۸۱)، دما (C۳۵°) و زمان ۴۲ دقیقه به دست آمد. در نقطه بهینه درصد ریزپوشانی ۵۴/۴٪ تخمین زده شد که با انجام آزمایش تکمیلی تأیید شد. اسانس روغنی ریزپوشانی شده خاصیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با اسانس آزاد علیه H۷:E. coli O۱۵۷نشان داد. در پژوهش حاضر، اسانس گیاهی آویشن شیرازی برای اولین بار در لیپوزوم به روش مظفری و بدون استفاده از حلال‌های آلی ریزپوشانی شد. خاصیت ضد باکتریایی اسانس روغنی ریزپوشانی شده در لیپوزوم در مقایسه با حالت آزاد افزایش معنی‌داری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم، ریزپوشانی، اسانس روغنی، روش سطح پاسخ

Archive of SID

مقدمه

بی تردید غذا یکی از مهم‌ترین نیازهای انسان به شمار آمده و تأمین غذای سالم با سلامت جامعه در ارتباط است. با توجه به افزایش بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی، که منجر به مشکلات اجتماعی و اقتصادی بسیار می‌گردد، لزوم تلاشی دائم برای تولید مواد غذایی ایمن‌تر و یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدیدتر روشن خواهد گشت. یکی از روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی ساخت بشر در غذاست(1). با این وجود امروزه بر کاهش استفاده از این روشها تأکید می‌شود، زیرا از یک رو مصرف‌کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشندو از سوی دیگر خاصیت سرطانزایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است. از این رو فشار بر روی صنایع غذایی برای جایگزینی سریع نگهدارنده‌های شیمیایی و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی یکی

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۸

* Correspondent Author Email Address: k.khosravi@sbmu.ac.ir

www.SID.ir

از رویکردهای جدید در جهت ارتقاء سلامت میکروبی غذاها و به دنبال آن افزایش سطح سلامت عمومی جوامع می‌باشد (2,3). از جمله ترکیبات طبیعی که می‌توانند به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی به کار روند اسانس‌های روغنی هستند.

عصاره و اسانس‌های روغنی[1] به دست آمده از گیاهان معطر دارای خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضداکسایشی، و ضدسرطانی بوده و قادر هستند رشد پاتوژن‌ها و تولید سم توسط ریزسازواره‌ها را کنترل کنند. اسانس‌های روغنی شامل ترکیبات فنلی، ترپنی، الکل‌های آلیفاتیک، آلدئید، کتون، اسیدها و ایزوفلاونوئید است. این ترکیبات به خصوص مواد فنلی، عامل اصلی خصوصیات ضدمیکروبی و ضد اکسایشی اسانس‌ها هستند (۴). چون اسانس‌های گیاهی در بسیاری از مواد غذایی جهت ایجاد طعم مطبوع به کار برده می‌شوند، وجود همزمان خواص ضدمیکروبی آنها می‌تواند استفاده از آنها را بدین منظور ترغیب نماید. اداره غذا و داروی آمریکا نیز استفاده از اسانس‌های روغنی را به عنوان افزودنیهای غذایی که عموما بی‌خطر هستند به رسمیت شناخته است[2] (۵). سازوکار اثر ضدباکتریایی اسانس‌های روغنی به خاصیت آب‌گریزی آنها برمی‌گردد که موجب نفوذ این مواد به فسفولیپیدهای غشاء سلول باکتری‌ها شده و سبب اختلال در ساختمان آنها و افزایش نفوذپذیری می‌گردد. این مسئله موجب خروج و نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلولی شده که در نهایت مرگ سلول را در بر خواهد داشت. در مواردی اسانس‌ها بر روی آنزیم‌های مسئول تولید انرژی یا سنتز ترکیبات ساختمانی سلولی نیز مؤثرمی‌باشند (4,6).

در میان گیاهان دارویی آویشن که گیاهی چندساله و متعلق به تیره نعناییان[3] می‌باشد یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان دارویی است (۷). آویشن شیرازی با نام علمی Zatariamultiflora Boiss گونه‌ای است که متعلق به جنس زاتاریا می‌باشد و بومی ایران، افغانستان و پاکستان است. از این گیاه در طب سنتی به عنوان ضدعفونی‌کننده[4]، ضدالتهاب[5] و ضدتشنج[6] یاد شده است و به عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی کاربرد فراوانی دارد (۸). آویشن شیرازی دارای اثر ضدمیکروبی و آنتی اکسیدانی می‌باشد که این اثر به طور عمده مربوط به ترکیبات فنلی آن است (۴). متأسفانه بیشتر ترکیبات طبیعی از نظر بیولوژیکی ناپایدار هستند، به مقدار کم در آب محلول هستند و به طور ضعیفی به مکان‌های هدف متصل می‌شوند.

اخیراً روش‌های جدیدی معرفی شده است تا پایداری و زیست دسترسی آنها را افزایش دهند که از جمله آنها محصور کردن در لیپوزوم است (۹). لیپوزوم‌ها ذرات کروی با یک یا چند غشای دولایه‌ای هستند که از تجمع مولکول‌های چربی یا فسفولیپید و با صرف انرژی در محیط آبی تشکیل می‌شوند (۱۰). در ساختار لیپوزومها عمدتاً از انواع فسفولیپیدها و بخصوص از فسفاتیدیلکولینبه عنوان مهمترین فسفولیپید موجود در تخم‌مرغ و لوبیای سویا استفاده می‌شود. این ترکیب به دلیل هم‌اندازه بودن سر و دم، باعث به‌وجود آمدن ساختاری یکنواخت در لیپوزوم می‌شود (۱۱). از جمله مزیت‌های لیپوزوم‌ها این است که آنها از ترکیباتی ساخته شده‌اند که برای سلامتی انسان مفیدند. تحقیقات اخیر در مورد عملکردهای بیولوژیکی فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها، فواید متعددی را برای سلامتی از جمله حفاظت از کبد، تقویت حافظه و جلوگیری از جذب کلسترول ذکر کرده‌اند (۱۲).

تولید لیپوزوم به روش‌های متعددی صورت می‌گیرد که در اکثر این روشها از حلال‌های غیر غذایی و درجنت‌ها استفاده می‌شود که این حلال‌ها نه تنها بر ساختار و پایداری مواد محصور شده تأثیر می‌گذارند، بلکه تا انتهای عملیات ریزپوشانی باقی مانده و باعث سمی شدن و ناپایداری سامانه لیپوزومی می‌شوند. اما با روش حرارتی می‌توان آماده سازی لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها را در یک مرحله، با یک دستگاه، بدون حضور حلال‌های سمی در کمتر از یک ساعت انجام داد. این روش که به ثبت اروپایی رسیده مقرون به صرفه بوده و قادر است لیپوزوم‌ها را به کمک پراکنده سازی و ذخیره سازی با استفاده از تجهیزات ساده، تولید نماید (۱۳). این روش عمدتا در راستای تولید ترکیبات دارویی به کار گرفته شده است، البته در تحقیقاتی از این روش جهت پوشش‌دار کردن نیسین (۱۲)، اسیدهای چرب غیراشباع (۱۴) و آنزیم پروتئاز(۱۵) برای کاربرد در مواد غذایی استفاده شده است.

تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از روش مظفری برای ریزپوشانی اسانس روغنی در لیپوزوم ارائه نشده است. در این تحقیق، عوامل مؤثر بر درصد ریزپوشانی به روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی بهینه سازی شدند.

1. Essential Oils
2. Generally Recognized As Safe
3.Lamiaceae
4. Anti-nociceptive
5. Anti-inflammatory
6. Anti-spasmodic

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روشها

مواد شیمیایی

اسانس روغنی آویشن شیرازی از شرکت باریج اسانسکاشان، فسفاتیدیل‌کولین از شرکت ORGANICS ACROS بلژیک، گلیسرول، تریتون X-100 و توئین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، معرف فولین، سدیم کربنات و استاندارد اسیدگالیک از شرکت سیگما خریداری شدند.

- **تعیین ترکیبات تام فنلی اسانس[7]:** مقدار کل ترکیبات فنلی طبق روشDorman و همکاران(۲۰۰۳)با استفاده از معرف فولین و اسید گالیک بعنوان استاندارد انجام شد. به محلول عصاره(۱۰۰ میکرولیتر)، آب مقطر(۷ میلی لیتر) و معرف فولین(۰/۵ میلی لیتر) اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم(۲٪ حجمی/وزنی) و۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از مخلوط کردن به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب آن در ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد (۱۶).

- **تهیه لیپوزوم به روش مظفری**

۳۰ نمونه لیپوزوم حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی برای بهینه سازی فرایند بر اساس طرح مرکب مرکزی(جدول ۲) و به روش مظفری تهیه شدند.اجزاء لیپوزومی شامل فسفاتیدیل‌کولین و اسانس روغنی آویشن شیرازی (با نسبت‌های وزنی مختلف) به وسیله افزودن آب دیونیزه و گلیسرول (۳٪ حجمی / حجمی) هیدراته شدند . در مرحله بعد توسط دستگاه همزن در دماها و زمان‌های مختلف با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه با یکدیگر مخلوط شدند. به منظور پایداری محلول لیپوزومی به دست آمده، به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت و سپس در یخچال در دمای C°۴ نگهداری شدند(۱۲، ۱۷).

- **روش تعیین درصد کارایی محصورسازی[8] لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی(EE%)**

ابتدا با استفاده از محلول آبی توئین ۸۰(۰/۵٪ حجمی/حجمی) از اسانس روغنی آویشن شیرازی به تفکیک رقت‌های۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۱۵۶، ۰/۰۰۷۸و ۰/۰۰۳۹ تهیه شد و سپس نمودار استاندارد تغییرات غلظت اسانس روغنی در برابر تغییرات جذبی آن در طول موج ۲۷۴ نانومتر رسم شد. وزیکول‌های حاوی اسانس روغنی با استفاده از سانتریفوژ در g×۲۰۰۰۰ به مدت نیم ساعت جدا شدند و محلول رویی و رسوب با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. سپس با استفاده از یک میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ درصد تریتون X-۱۰۰ غشاء نانولیپوزومها در یک میلی‌لیتر محلول نانولیپوزومی شکسته شده و اسانس روغنی موجود در آن آزاد شد. با توجه به یکسان سازی شرایط بایستی به یک میلی‌لیتر از محلول رویی نیز یک میلی‌لیتر تریتون ۰/۰۲ درصد افزوده شود و میزان اسانس روغنی در محلول رویی محاسبه شود. جهت محاسبه درصد پوشش‌دار کردن اسانس روغنی از فرمول زیر استفاده شد(۱۵).

فرمول (۱)

$$\%EE = \frac{P}{S+P} \times ۱۰۰$$

که در آن P میزان اسانس روغنی در رسوب و S میزان اسانس روغنی در محلول رویی است.

- **بررسی ابعاد لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی مناسب سازی شده**

میانگین اندازه ذرات و چگونگی توزیع اندازه لیپوزوم‌ها با استفاده از تکنولوژی پراکنش نور دینامیک[9] (DLS) مورد مطالعه قرار گرفت. ضریب پلی دیسپرسیتی ذرات لیپوزوم با استفاده از این دستگاه در محدوده ۰,۰ برای سیستم‌های مونودیسپرس و ۱,۰ برای دیسپرسیون‌های با ذرات پلی‌دیسپرس می‌باشد (۱۲).

- **روش اندازه گیری حدأقل غلظت مهارکنندگی[10] و کشندگی[11] محلول لیپوزومی حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی و فرم آزاد آن:**

7. Total phenolic content
8. Encapsulation Efficiency
9. Dynamic Light Scattering
10. Minimum Inhibitory Concentration
11. Minimum Bactericidal Concentration

Archive of SID
www.SID.ir

برای انجام این بخش از روش رقت‌سازی با لوله استفاده شد. این روش یکی از دقیق ترین روش‌هایی است که برای تعیین حساسیت باکتری‌ها نسبت به مواد ضدمیکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حالت آزاد غلظت‌های متوالی اسانس روغنی آویشن شیرازی در محیط کشت براث عصاره گوشت (۰، ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸درصد) حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۸۰ تهیه شد. در حالت ریزپوشانی نیز، سوسپانسیون‌های لیپوزومی در حالت بهینه در غلظت‌های بالا تهیه شدند. به هریک از رقت‌های تهیه شده از آویشن شیرازی در دوحالت آزاد و ریزپوشانی، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی تهیه شده (به غلظت نهایی۵×۱۰۵cfu/ml) اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شدند و کدورت و عدم کدورت در لوله‌ها بررسی شد. اولین لوله ای که کدورتی در آن مشاهده نشد به عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، از رقت‌هایی که در آن‌ها کدورت مشخصی ایجاد نشده باشد به میزان ۰/۱ میلی لیتر با روش پخش یکنواخت در محیط ائوزین متیلن بلوکشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در صورت عدم رشد، نتیجه به صورت MBC گزارش می‌شود (۱۹,۱۸).

- **تجزیه و تحلیل آماری**

بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای درصد فسفاتیدیل‌کولین، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین، دما و زمان فرایند بر درصد ریزپوشانی اسانس روغنی در لیپوزوم هدف اصلی این پژوهش بود. روش سطح پاسخ۱۲ به جهت یافتن حالت بهینه فاکتورها انتخاب شد که نشان دهنده چگونگی تأثیر فاکتورها بر نتایج آزمایشات است. این در حالی است که آثار متقابل فاکتورهای مزبور را نیز در بر می‌گیرد. در این طرح ابتدا بر اساس آزمایشات مقدماتی، دامنه تغییرات فاکتورها برای درصد فسفاتیدیل‌کولین (۳-۱٪)، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین (۱-۰/۲۵)، دما (۵۰-۳۰°C) و زمان (۶۰-۲۰دقیقه) در ۵ سطح انتخاب شدند. در این طرح، درصد فسفاتیدیل‌کولین با نماد X۱، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین با نماد X۲، دمای فرایند با نماد X۳ و زمان فرایند با نماد X۴ چهار متغیر مستقل و درصد ریزپوشانی (EE٪) متغیر وابسته است (جدول۱).

جدول ۱- نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آنها

متغیرهای مستقل	محدوده و سطوح متغیرها				
	+α	+۱	۰	-۱	-α
درصدفسفاتیدیل‌کولین	۳	۲/۵	۲	۱/۵	۱
نسبت وزنی اسانس به‌فسفاتیدیل‌کولین	۱	۰/۸۱	۰/۶۳	۰/۴۴	۰/۲۵
دمای فرایند (°C)	۵۰	۴۵	۴۰	۳۵	۳۰
زمان فرایند (min)	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰

با استفاده از روش ۱۳CCD و با کمک نرم افزار Expert Design (Version ۷,۰,۰)و سطوح در نظر گرفته شده برای هر یک از متغیرها، آزمایشات طراحی و چیدمان آن‌ها مطابق جدول ۲ انجام شد. و درصد ریزپوشانی اسانس روغنی در لیپوزوم به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. در روش RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر، جداگانه بیان می‌نماید که در فرمول زیر قابل مشاهده است:

$$b0+ \Sigma\ bi\ xi+ \Sigma\ bii\ xi2 + \Sigma\ b\ ij\ xixj = Y$$ فرمول(۲)

در معادله ذکر شده Y پاسخ پیش بینی شده، b۰ضریب ثابت، bi اثرات خطی، bii اثر مربعات، bijاثرات متقابل، xiو xj متغیرهای مستقل کدبندی شده هستند.

12. Response Surface Methodology
13. Central Composite Design

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲. ماتریس طرح مرکب مرکزی به علاوه نتایج به دست آمده از انجام آزمایش‌ها

شماره آزمایش	درصدفسفاتیدیل‌کولین	نسبت وزنی اسانس روغنی به لسیتین	زمان فرایند	دمای فرایند	درصد ریزپوشانی
۱	۲	۰/۶۳	۲۰	۴۰	۴۵
۲	۲/۵	۰/۸۱	۵۰	۴۵	۴۵/۷
۳	۲	۰/۶۳	۴۰	۳۰	۴۷/۲
۴	۱/۵	۰/۴۴	۵۰	۴۵	۳۱
۵	۲	۰/۶۳	۴۰	۵۰	۳۶/۹
۶	۲/۵	۰/۴۴	۵۰	۳۵	۴۲
۷	۱/۵	۰/۸۱	۵۰	۴۵	۳۶
۸	۲/۵	۰/۴۴	۵۰	۴۵	۳۱/۴
۹	۲/۵	۰/۸۱	۳۰	۴۵	۵۰
۱۰	۳	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۹/۴
۱۱	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۲
۱۲	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۴
۱۳	۱/۵	۰/۴۴	۳۰	۴۵	۲۹
۱۴	۲/۵	۰/۴۴	۳۰	۳۵	۴۸/۳
۱۵	۲	۱	۴۰	۴۰	۳۹/۴
۱۶	۲/۵	۰/۸۱	۵۰	۳۵	۵۸
۱۷	۲	۰/۶۳	۶۰	۴۰	۴۳
۱۸	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۶
۱۹	۱/۵	۰/۸۱	۵۰	۳۵	۳۷/۹
۲۰	۱/۵	۰/۸۱	۳۰	۳۵	۳۸/۹
۲۱	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۱/۸
۲۲	۱/۵	۰/۴۴	۵۰	۳۵	۳۵
۲۳	۱	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۲۹/۵
۲۴	۲/۵	۰/۸۱	۳۰	۳۵	۵۲/۹
۲۵	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۳
۲۶	۲/۵	۰/۴۴	۳۰	۴۵	۳۵/۵
۲۷	۲	۰/۲۵	۴۰	۴۰	۳۰/۴
۲۸	۱/۵	۰/۸۱	۳۰	۴۵	۳۲
۲۹	۱/۵	۰/۴۴	۳۰	۳۵	۳۹
۳۰	۲	۰/۶۳	۴۰	۴۰	۴۸

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

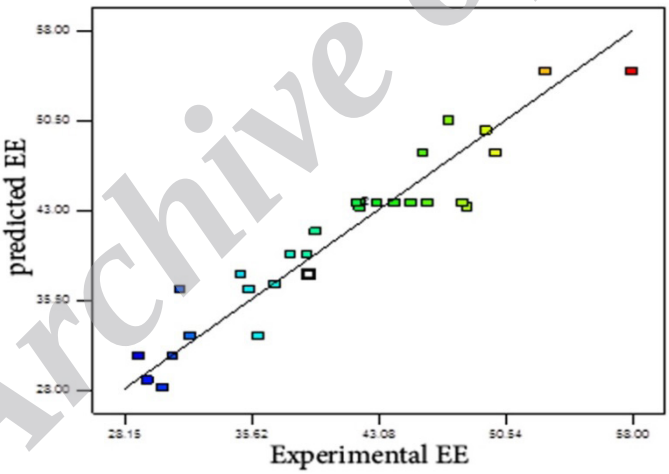
نتایج تعیین ترکیبات تام فنلی: گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنلی نقش مهمی در فعالیت ضداکسیدانی و ضدمیکروبیاسانس‌های روغنی دارند (4).میزان ترکیبات تام فنلی اسانس روغنی آویشن شیرازی به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از واکنش‌گر فولین سیوکالته و اسیدگالیک به عنوان استاندارد تعیین شد. ترکیبات تام فنلی در این اسانس ۳۵۵ میلی‌گرم اسیدگالیک در یک میلی‌لیتر نمونه به دست آمد.در مطالعه‌ای که توسط زنگی‌آبادی و همکاران انجام شد میزان TPC در اسانس آویشن شیرازی، ۳۲۲ میلی‌گرم اسید گالیک در یک میلی‌لیتر نمونه به دست آمد(۲۰). تفاوت در این مقادیر می‌تواند ناشی از تفاوت در روش تولید، فصل برداشت و منابع جغرافیایی باشد(۴).

- **نتایج بهینه سازی عوامل مؤثر بر درصد ریزپوشانی اسانس روغنی در لیپوزوم با استفاده از روش سطح پاسخ:**

مطابق آنچه در قسمت مواد و روش‌ها گفته شد، آزمایشات طبق جدول طراحی شده به روش CCD، با در نظر گرفتن ۴ متغیر در ۵ سطح برابر با ۳۰ آزمایش همراه با ۶ تکرار در نقطه مرکزی برای کاهش خطا انجام شد. پاسخ‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Design Expert (7.0.0 Version) تحلیل شد. پس از رگرسیون درجه دوم، معادله زیر برای ارزیابی پاسخ بر حسب مقادیر کد شده به دست آمد:

$$\%EE = +۴۳/۶۱ + ۵/۲۱\,X_1 + ۳/۲۶\,X_2 - ۳/۴۱X_3 + ۲/۴۱X_1X_2 - ۱/۱X_1^2 - ۲/۲۳X_2^2$$

میزان انطباق مدل روی داده‌های واقعی توسط ضریب تعیین R2 و R2-Adjusted نشان داده می‌شود. R2=0.90 و Adjusted R2=0.87 رابطه قوی بین داده‌های واقعی و مدل پیشنهاد شده را نشان می‌دهد و منطبق شدن خوب مدل را روی داده‌های واقعی بیان می‌کند (شکل۱).



شکل۱-نتایج درصد کپسول پوشانی پیش بینی شده در مقابل درصدکپسول پوشانی تجربی

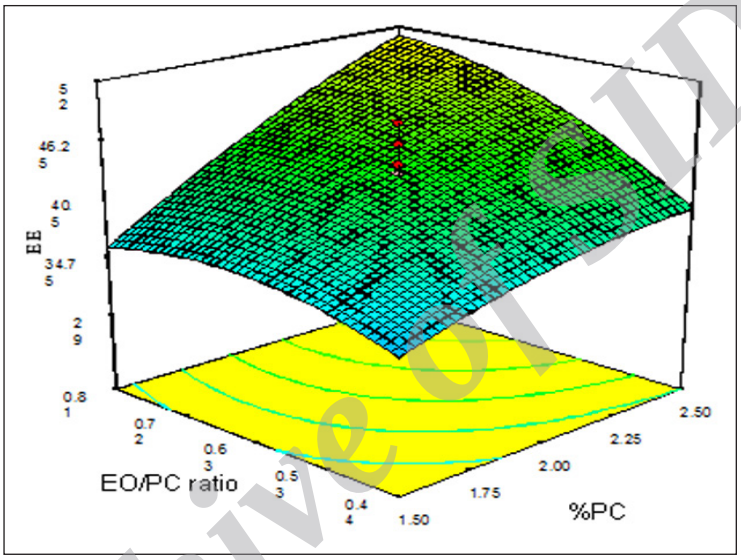
جدول۳- آنالیز واریانس‌هایی ریزپوشانی لیپوزوم حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی با استفاده از طرح مرکب مرکزی

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	ارزش p	ارزش F
مدل	۶	۴۳/۱۴۳۸	۰۰۰/۰	۱۹/۳۵
X_1	۱	۶۴۸/۹۶	۰/۰۰۰	۹۵/۲۵
X_2	۱	۲۵۴/۸	۰/۰۰۰	۳۷/۴
X_3	۱	۲۷۸/۸	۰/۰۰۰	۴۰/۹۲
X_1X_2	۱	۹۳/۱۲	۰/۰۰۱۲	۱۳/۶۷
X_1^2	۱	۳۴/۲۲	۰/۰۳۵	۵/۰۲
X_2^2	۱	۱۴۲/۰۱	۰/۰۰۰	۲۰/۸۴
عدم برازش	۱۸	۹۷/۱۲۶	۴۶۳۲/۰	۱۹/۱

Archive of SID
www.SID.ir

همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، خطا در عدم برازش معنی‌دار نمی‌باشد و ارزش P و F آن به ترتیب برابر با ۰/۴۶ و ۱/۱۹است. سه متغیر مستقل درصد فسفاتیدیل‌کولین (X1)، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین (X2) و دمای فرایند (X3) به صورت خطی بر درصد ریزپوشانی لیپوزوم حاوی اسانس روغنی مؤثر هستند. در بین آن‌ها درصد فسفاتیدیل‌کولین با ضریب ۵/۲۱ بیشترین تأثیر را به طور مستقیم بر درصد ریزپوشانی لیپوزوم حاوی اسانس روغنی دارد. در پی آن به ترتیب متغیر نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین با ضریب ۳/۲۶ ، به طور مستقیم، و متغیر دمای فرایند با ضریب۳/۴۱-، به طور معکوس، با درصد ریزپوشانی اسانس روغنی ارتباط دارند.درمورد اثرات تداخلی دوگانه متغیرهای مورد آزمایش بر متغیر وابسته، در حالت زیر تأثیر معنی دار مشاهده شد:

درصد فسفاتیدیل‌کولین× نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین (p/۰۰۱۲=). شکل ۲ اثر تداخلی معنی دار متغیرهای X۱ و X۲ را نشان می‌دهد.



شکل۲- نمودار سه بعدی مربوط به درصدفسفاتیدیل‌کولین-نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین

همان طور که مشاهده می‌شود، با افزایش هم‌زمان درصد فسفاتیدیل‌کولین ونسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین ، مقدار پاسخ افزایش می‌یابد. به طوری که بر هم کنش این دو متغیر، معنی دار بود و بیشترین پاسخ در نقطه درصد فسفاتیدیل‌کولین۲/۵٪ و نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین۰/۸۱ به دست امد. همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، با افزایش درصد فسفاتیدیل‌کولین میزان ریزپوشانی اسانس روغنی افزایش می‌یابد. بنابراین با افزایش درصد فسفاتیدیل‌کولین در روش تولید لیپوزوم به روش حرارتی، می‌توان درصد ریزپوشانی راافزایش داد. تحقیقات با استفاده از طراحی سطح پاسخ نشان داده است که با افزایش درصد فسفاتیدیل‌کولین به عنوان ترکیب تشکیل دهنده لیپوزوم، درصد ریزپوشانی ترکیب نوبیلی سایدا۱۴ درون لیپوزوم تولید شده به روش لایه نازک – اولتراسونیکاسیون افزایش می‌یابد (۲۱). هم چنین با افزایش میزان اسانس روغنی درصد ریزپوشانی افزایش می‌یابد به این دلیل که اسانس روغنی بیشتری می‌تواند درون لیپوزوم‌ها کپسوله شود که با نتایج تحقیقی که توسط Fangو همکاران، همچنین Varona و همکاران انجام شده است، هماهنگی دارد (۲۲,۲۳). دمای فرایند به‌طور معکوس بر درصد ریزپوشانی لیپوزوم حاوی اسانس روغنی اثر دارد و با افزایش دما، مقدار متغیر پاسخ کاهش می‌یابد. دما اثردوگانه‌ای بر درصد ریزپوشانی دارد. با افزایش دما، مایع شدن ذرات پودری فسفاتیدیل‌کولین و تشکیل لیپوزوم بیشتر می‌شود. در نتیجه ممکن است اسانس روغنی بیشتری درون لیپوزوم محبوس شود. اما با به‌کارگیری دمای بالا به علت فراریت اسانس روغنی، ریزپوشانی کاهش می‌یابد و در دمای بالا احتمالا فراریت اسانس و کاهش فعالیت آن با شدت بیشتری نسبت به تشکیل لیپوزوم اتفاق می‌افتد. به طوریکه بیشترین پاسخ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ملاحظه می‌شود (۲۴).

14. Nobiliside

Archive of SID
www.SID.ir

بهینه سازی پاسخ

بهینه‌سازی پاسخ با استفاده از نرم افزار Expert Design (Version ۷,۰,۰) برای رسیدن به حدأکثر خروجی انجام شد. مقادیر به دست آمده از فرایند بهینه‌سازی برای متغیرهای درصد فسفاتیدیل‌کولین، نسبت وزنی اسانس روغنی به لستین، دمای فرایند و زمان فرایند به ترتیب ۲/۵٪، ۰،۳۵/۸۱ C° و ۴۲ دقیقه بود و مقدار پیش بینی شده برای متغیر پاسخ ۵۴/۴ ٪ بود. به منظور بررسی تطابق نتایج عملی با مقادیر تئوری پیش بینی شده، آزمایش تأیید کننده در شرایط بهینه انجام شد. نتایج این آزمایش در جدول ۴ آورده شده است.با توجه به روش به کار گرفته شده میانگین اندازه ذرات لیپوزوم‌های تهیه شده معادل ۰/۲۲۰ ± ۲۷۲/۲ با توزیع ۰/۱۵۸ تعیین شد.

جدول۴- مقادیر پیش بینی شده و تجربی پاسخ در شرایط بهینه

متغیر پاسخ	مقدار پیش بینی شده	مقدار تجربی
درصد ریزپوشانی	٪۵۴/۴	۰.۲±٪۵۳.۵

- **نتایج اندازه گیری ابعاد لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی شیرازی مناسب سازی شده:**

- **نتایج اندازه گیری حدأقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی لیپوزومهای تهیه شده حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی و فرم آزادآن**

اشریشیا کلی انتروهموراژیک HV:O۱۵۷باکتری گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری است و دوز بیماری‌زایی آن پایین و حدود ۵۰-۵ریزاندامگان است (۲۵). این باکتری یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد اسهال خونی می‌باشد که با تولید وروتوکسین یا شیگاتوکسین (Stx) قادر به ایجاد اسهال خونی یا کولیت هموراژیک بوده و در موارد حاد منجر به ایجاد سندروم اورمیک همولیتیک می‌شود (۲۶).
تحقیقات زیادی در مورد خصوصیات بازدارندگی اسانس آویشن شیرازی بر باکتری‌های بیماری‌زا یاعامل فساد موادغذایی صورت گرفته است (27،۲۸). اما با وجود این جنبه‌های جالب توجه، مطالعات کمی در مورد وارد کردن اسانس‌های روغنی در لیپوزوم‌ها و کمتر از آن مرتبط با کاربردهای غذایی وجود دارد. بنابراین در این تحقیق، خواص ضدمیکروبی اسانس روغنی آویشن شیرازی در محیط کشت براث عصاره گوشت علیه *E. coli*O157:H7 به عنوان یکی از پاتوژن‌های غذازاد مهم قبل و بعد از ریزپوشانی در لیپوزوم بررسی شد.
نتایج تحقیق نشان داد که مقدار MIC اسانس روغنی آویشن شیرازی علیه *E. coli*O۱۵۷ :HVبرای حالت محصور در لیپوزوم‌ها معادل۰/۰۲ درصد و میزان MBCآن ۰/۰۴ درصد بوده و نصف مقادیر آن‌ها در فرم آزاد می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که خاصیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی عصاره‌های گیاهی و اسانس‌های روغنی بعد از ریزپوشانی در لیپوزوم‌ها افزایش یافته است (۳۱, ۳۰, ۲۹). لیپوزوم‌ها می‌توانند با سلول‌ها به روش‌های زیادی واکنش دهند که سازوکار میانکنش به نوع سلول (ترکیب دیواره سلولی/ غشا)، هم چنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی غشای لیپوزوم بستگی دارد.استفاده از فرمولاسیون لیپوزوم انتقال سلولی و آزاد سازی ترکیبات فعال داخل سلول را افزایش می‌دهد و بدین ترتیب اثر ضد باکتریایی این ترکیبات تقویت می‌گردد (۳۲).

نتیجه گیری

در بررسی تأثیر متغیرهای فرایند بر درصد ریزپوشانی لیپوزوم‌های حاوی اسانس روغنی آویشن شیرازی تولید شده به روش مظفری نشان داده شد سه متغیر درصد فسفاتیدیل‌کولین، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین و دمای فرایند بر درصد کپسول پوشانی لیپوزوم مؤثرند. نتایج نشان داد که درصد فسفاتیدیل‌کولین مهم ترین پارامتر تأثیرگذار بر درصد ریزپوشانی است. نقاط بهینه تهیه لیپوزوم عبارتند از: درصد فسفاتیدیل‌کولین (۲/۵٪)، نسبت وزنی اسانس روغنی به فسفاتیدیل‌کولین (۰/۸۱)، دما (C°۳۵) و زمان ۴۲ دقیقه. در این نقاط بهینه درصد ریزپوشانی ۴/۵۴٪ تخمین زده شد که با انجام آزمایش تکمیلی تأیید شد. اسانس روغنی ریزپوشانی‌شده خاصیت ضدباکتریایی بیشتری در مقایسه با اسانس آزاد علیه *E. coli*O۱۵۷ :HVنشان داد. افزایش فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی این ترکیبات بعد از محصور کردن در لیپوزوم می‌تواند استفاده از آن‌ها را به عنوان نگهدارنده قوی نه تنها در صنعت غذا، بلکه در لوازم آرایشی و داروسازی ارتقاء دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. AkhondzadehBasti, A., Misaghi, A. &Khaschabi, D. Growth response and modeling of the effects of Zatariamultiflora Boiss. essential oil, pH and temperature on Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus. J. LWT. 40(2007), 973-981.
2. Brul, S., Coote, P. Preservative agents in foods,mode of action and microbial resistancemechanism. Int. J. Food Microbiol. 50(1999), 1-17.
3. Tajkarimi,MM., Ibrahim, SA. &Cliver, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food-a review.Int. J. Food control. 21(2010), 1199-1218.
4. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. Int. J. Food Microbiol. 94(2004), 223 -253.
5. Farhangfar, A., Tajik, H., RazaviRohani, SM., Moradi, M. &Aliakbarlu, J.Combined Influence of the Clove Essential oil and Grape Seed Extract on the Spoilage Related Bacteria of Buffalo Patties during the Storage at 8°C. J. Food Technol. Res. 21(2011),105-116.
6. Holley, RA., Patel, D. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. J. Food Microbiol. 22(2005), 273 -2 92.
7. Naghibi, F., Mosaddegh, M., MohammadiMotamed, S. &Ghorbani, A. Labiatae family in folk medicine in iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian J. Pharm. Res. 2(2005), 63-79.
8. Hosseinzadeh, H., Ramezani,M., Salmani,G.Anti-nociceptive,anti- inflammatory and acute toxicity effects of ZatariamultifloraBoissextracts in mice and rats. J.Ethnopharmacol. 73(2000), 379-385.
9. Liolios, CC., Gortzi, O., Lalas, S., et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of Origanumdictamnus L. and in vitro antimicrobial activity. J. Food Chem. 112(2009), 77–83.
10. Mozafari, MR., Johnson, C., Hatziantoniou, S., Demetzos, C.Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. J. Liposome Res. 18(2008), 309–327.
11. Mohammadi, M., Jahadi, M., Ehsani, MR., Khosravi-Darani, K. Application of liposome nano carrier in cheese production and ripening. Iran J.Nutr. Sci. Food Technol.7(2013), 25-34.
12. Colas, JC., Shi, W., Rao, VSNM., Omri, A., Mozafari, MR., Singh, H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterialtargeting. Micron. 38(2007), 841-847.
13. Khosravi-Darani ,K ,.Mozafari ,MR.Nanoliposomes: therapeutic and industrial applications .National Nutrition and Food technology Research Institute publication. .17-74,(2011)
14. Rasti ,B ,.Jinap ,S ,.Mozafari ,MR ,.Abd-Manap ,MY. Optimization on preparation condition of poly unsaturated fatty acids nanoliposome prepared by mozafari method .J. Liposome Res.1-7 ,(2013) .
15. Vafabakhsh ,Z ,.Khosravi-Darani,K ,.Khajeh,Kh,.Jahadi, M ,.Komeili ,K ,.Mortazavian AM.Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposomes. Biochem. Eng. J. 72(2013), 11-17.
16. Dorman,HJD.,Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, MJ.Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. J. Food Chem. 83(2003), 255-262.
17. Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, MR., Yazid, AM. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. J. Food Chem. 135(2012), 2761-2770.
18. Hosseinzade, A., Mohajerfar, T., AkhondzadehBasti, A., Khanjari, A., Gandomi, H., Misaghi, A., Sadeghi, S. Determination of minimum inhibitory concentration(MIC) of lysozyme and ZatariamultifloraBoiss. essential oil on E. coli O157:H7. J Med. Plants. 8(2011), 208-217.
19. Rukholm, G., Mugabe, C., Azghani,AO.,Omri, A. Antibacterial activity of liposomal gentamicin against Pseudomonas aeruginosa: a time–kill study. Int. J. Antimicrob Agent. 27(2006), 247-252.
20. Zangiabadi, M ,.Sahari,MA,.Barzegar ,M ,.NaghdiBadi, H .Zatariamultifloraand BuniumpersicumEssential Oils as Two Natural Antioxidants. J. Med. Plants. 11(2011), 8-21.
21. Xiong, Y., Guo, D., Wang, L.,Zheng, X., Zhang, Y., Chen, J. Development of nobiliside A loaded liposomal formulation using response surface methodology. Int. J. Pharm. 371(2009), 197-203.
22. Varona ,S ,.Martı´n ,A ,.´Cocero ,MJ .Liposomal incorporation of Lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas saturated solutions .Int .Eng .Chem .Res.2097 –2088 ,(2011)50 .
23. Fang ,J ,.Guan ,R ,.Ri ,C ,.Liu,M,.Ye ,X ,.Jiang ,J. Optimization of Fabrication Parameters to Prepare Tea Catechin-Loaded Liposomes using Response Surface Methodology .Adv .J .Food Sci .Technol.29-35 ,(2013)5 .
24. Jahadi ,M ,.Khosravi-Darani ,K ,.Ehsani ,MR ,.Mozafari, MR ,.Saboury ,AA,.Seydahmadian ,F,.Vafabakhsh Z. Evaluating the Effects of Process Variables on Protease-loaded Nano-liposome ProductionbyPlackett-Burman Design for Utilizing in Cheese Ripening Acceleration. Asian J .Chem.3891-3894 ,(2012)24 .
25. Betts,CD .Controlling E.coliO157:H7. J Nutr and Food Sci. 30(2002), 183–186.
26. Mehdizadeh, M., Eskandari. S., Zavar, M., Pirouz, B. The importance of E.coli O157:H7 in foodborne infection. J. Kerman Univ. Med .Sci.15(2008), 353-361.
27. Misaghi, A., Basti, AA. Effect of ZatariamultifloraBoiss. Essential oil and nisin on Bacilluscereus ATCC 11778. J. Food control. 18(2007), 1043 -104 9.
28. Basti,AA.,Misaghi, A., Khaschabi, D. Growth response and modeling of the effects ofZatariamultifloraBoiss.

Archive of SID

www.SID.ir

Essential oil, pH and temperature on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus. J.Lebensm-WissTechnol. 40(2007), 973 -9 81.

29. Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis,J . Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of thymus spp. Extracts before and after encapsulation in liposomes. J. Food Protect. 69(2006), 2998-3005.
30. Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J.Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Origanumdictamnus Extracts before and after Encapsulation in Liposomes. J. Molecules. 12(2007), 932-945.
31. Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of Myrtuscommunisextract before and after encapsulation in liposomes. J. Eur. Food Res. Technol. 226(2008), 583-590.
32. Shoji, Y., Nakashima, H. Nutraceutics and delivery systems. J. Drug Target. 12(2004), 385–391.
33. Production of ZatariamultifloraBoiss Essential Oil Nanoliposomes by Response Surface Methodology
34. Mahin Ebrahimi Khoosfi[1], Kianoush Khosravi-Darani[2], HedayatHosseini[3], SheidaArabi[4], RozitaKomeili, PalizKoohi –Kamali[5]
35. M.Sc. in Food Sciences and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
36. Corresponding author: Associate Prof., Research Dept. of Food Technology Research, National Nutrition and FoodTechnology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of MedicalSciences
37. Associate Prof., Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition & Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
38. M.Sc. in food Science and Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Islamic Azad University
39. Researcher, Research Dept. of Food Technology Research, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Archive of SID

www.SID.ir