

## اثر شرایط تولید بر بازده و ویژگی نیوزوم های حاوی رنگدانه کانتاگزانتین طبیعی

مریم رواقی<sup>۱</sup>، سید هادی رضوی<sup>۲\*</sup>، سید محمد موسوی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۵)

### چکیده

در این مقاله کانتاگزانتین توسط باکتری *Dietzia natronolimnaea* HS-1 تولید و پس از استخراج توسط نیوزوم درون پوشانی شد. اثر دور روتاری اوپراتور (۱۰۰ و ۱۵۰ rpm)، غلظت رنگدانه (۰، ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر)، مقدار پلی اتیلن گلیکول (۰، ۱۰، ۲۰ و ۴۰٪)، نوع حلال (اتانول و کلروفرم)، نوع سورفکتانت (توین ۶۰ و ۸۰ و اسپن ۶۰ و ۸۰) و نسبت سورفکتانت به کلسترول بر حسب میکرومول (۱۰۰:۱۰۰، ۸۰:۱۲۰ و ۶۰:۱۴۰) بر بازده و ویژگی های نیوزوم تعیین شد. نتایج نشان داد دور ۱۵۰ rpm، غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کانتاگزانتین، غلظت ۲۰٪ پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و نسبت سورفکتانت به کلسترول ۱۰۰:۱۰۰ نیوزومهایی با بازده بالاتر و اندازه کوچکتر ایجاد کرد. به کارگیری اسپن ۶۰ با بازده مشابه اسپن ۸۰ اما با اندازه‌های کوچکتر و یکنواخت تر از آن و حلال اتانول به عنوان بهترین گزینه برای تولید نیوزوم های کانتاگزانتین پیشنهاد شد.

واژه‌های کلیدی: *Dietzia natronolimnaea* HS-1، کانتاگزانتین، سورفکتانت، نیوزوم.

### مقدمه

کاروتنوئیدها فراوان ترین طبقه از رنگدانه های طبیعی هستند (Palozza et al., 2006; Khoo et al., 2012) که به کارگیری آنها به عنوان افزودنی یا مکمل در خوراک دام، ماده رنگی خوراکی طبیعی، مکمل غذایی و اخیراً در محصولات آرایشی و دارویی مورد توجه قرار گرفته است (Jaswir et al., 2011). کانتاگزانتین با ساختار  $\beta$  و  $\beta$ -کاروتن ۴ و ۴'-دی آن یک گزانتوفیل است که توانایی تولید رنگ و عملکرد آنتی اکسیدانی دارد (Clark et al., 1999). سنتز شیمیایی این رنگدانه نیازمند سطح کنترل بالاست و ممکن است محصولاتی با اثرات جانبی نامطلوب ایجاد شود (Esfahani-Mashhour et al., 2009)؛ از این رو امروزه استفاده از رنگدانه های طبیعی مورد توجه مصرف کنندگان قرار گرفته است (Santos et al., 2010). در سال های اخیر استفاده از منابع میکروبی به دلیل عدم تأثیر تنوع جغرافیایی و فصلی بر تولید و امکان به کارگیری ضایعات کشاورزی و صنعتی به عنوان سوپسترا مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. باکتری *Dietzia natronolimnaea* یک باکتری گرم مثبت، کاتالاز مثبت،

اکسیداز منفی با کلنی های نارنجی است. *Dietzia natronolimnaea* HS-1 به عنوان تولید کننده رنگدانه کانتاگزانتین، برای اولین بار حین غربالگری میکروارگانیسم های مولد رنگدانه جداسازی و شناسایی شد (Razavi, 2004).

آنتی اکسیدان ها حین فراوری دستخوش تجزیه می شوند و استفاده از آنها به صورت آزاد به علت عدم عبور از غشای سلولی باعث حذف سریع از جریان خون می شود (Mozafari et al., 2006). درون پوشانی یک ابزار مهم در افزایش ماندگاری و حفاظت از اجزاء حساس غذایی در برابر رطوبت، اکسیداسیون، حرارت، نور و شرایط فراوری است (Santos et al., 2010). امروزه استفاده از سیستم های وزیکولی مانند لیپوزوم و نیوزوم جهت درون پوشانی مواد حساس مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Gangwar et al., 2012). لیپوزوم ها و نیوزوم ها ساختارهایی یک یا چند لایه مشابه غشای سلولی تولید می کنند و از این رو می‌توانند به درون پوشانی و افزایش پایداری مواد آب دوست و آب گریز و رهایش کنترل شده آنها در مجاورت سلول های بدن کمک کنند (Ulrich, 2002). این سیستم های وزیکولی بر پایه آب هستند و با افزایش قابلیت حل شدن مواد آب گریز کاربرد آنها را در صنایع مختلف بهبود می بخشند

\* نویسنده مسئول: srazavi@ut.ac.ir

بازده و ویژگی های نیوزوم تعیین شد.

## مواد و روش ها

### مواد

استونیتریل، متانول، دی کلرومتان، توپین ۸۰، توپین ۶۰، پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰، کلسترول، اتانول، سدیم دی هیدروژن فسفات، دی سدیم هیدروژن فسفات، گلوکز، عصاره مخمر، کلرید سدیم، عصاره مالت از شرکت مرک آلمان، آگار از شرکت دیفکو آمریکا، پپتون از شرکت های مدیا هند، اسپین ۸۰، اسپین ۶۰ از شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا و پروتامین سولفات از شرکت داروسازی سی پی انگلیس تأمین شد.

### تولید رنگدانه

باکتری *Dietzia natronolimnaea* HS-1 (DSM 44860) در پلیت های حاوی محیط کشت عصاره مخمر/مالت آگار (۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار به ازای هر لیتر) کشت شد و پس از ۴ روز گرمخانه گذاری در دمای  $28 \pm 1$  درجه سلسیوس به انکوباتور ۴ درجه سلسیوس جهت نگهداری انتقال یافت. کشت خالص باکتری از محیط کشت عصاره مخمر/مالت آگار به ارلن مایر با حجم ۵۰۰ سی سی حاوی ۲۰۰ سی سی محیط کشت گلوکز/پپتون/عصاره مخمر (۱۰ گرم گلوکز، ۱۰ گرم پپتون، ۶ گرم عصاره مخمر به ازای هر لیتر) منتقل شده و در انکوباتور شیکردار با سرعت چرخش ۱۸۰ rpm و دمای  $28 \pm 1$  درجه سلسیوس به مدت ۱۵۰ ساعت قرار گرفت. ۱۰ میلی لیتر از این محیط کشت با سرعت  $6000 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ شد. رسوب (توده زیستی) دو بار با ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی شستشو و مجدد سانتریفوژ شد. توده زیستی حاوی رنگدانه در ۳ میلی لیتر اتانول خالص پخش و پس از ۲ دقیقه قرار دادن در حمام آب ۴۵ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه ورتکس شد. به منظور جداسازی رنگدانه حل شده در اتانول از توده زیستی مجدداً سانتریفوژ انجام و این فرایند جهت استخراج کامل رنگدانه تا سه مرحله ادامه یافت. این محلول به منظور کاهش حجم و سهولت استفاده در مراحل بعدی در روتاری اوپراتور تحت خلأ در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شد. مقدار کانتاگزانتین با اندازه گیری جذب در طول موج ۴۷۴ نانومتر که با  $\lambda_{max}$  کانتاگزانتین استاندارد مطابقت دارد اندازه گیری و کاروتنوئید کل طبق فرمول ذیل محاسبه شد (Esfahani-Mashhour et al., 2009; Gharibzahedi et al., 2012).

(Mujoriya et al., 2011). استفاده از فسفولیپیدهای سنتزی گران است در حالی که فسفولیپیدهای طبیعی درجات خلوص متفاوتی دارند (Kopermsub et al., 2010; Marianecchi et al., 2011); از این رو به کارگیری نیوزوم ها مورد توجه قرار گرفته است.

نیوزوم ها وزیکول های تولید شده از هیدراسیون کلسترول، اجزاء پایدار کننده و سورفکتانت های غیر یونی هستند (Sosnik et al., 2010; Mahale et al., 2012) که در محیط مائی انتهای آب دوست سورفکتانت غیر یونی به سمت خارج و بخش آب گریز به سمت یکدیگر قرار گرفته و بدین ترتیب ساختارهای دو لایه ایجاد می شوند (Tarekegn et al., 2010). سورفکتانت غیر یونی گزینه مناسبی جهت استفاده به عنوان پوسته وزیکول ها در کاربردهای غذایی است (Kopermsub et al., 2011). توپین<sup>۱</sup> و اسپین<sup>۲</sup> طبقه ای از سورفکتانت های غیر یونی هستند که به دلیل خصوصیات قابل توجه همچون زیست تخریب پذیری، سازگاری زیستی، سمیت کم و دسترسی آسان در صنایع غذایی و دارویی کاربرد دارند (Tavano et al., 2011). امروزه استفاده از نیوزوم ها به دلیل مزایای فراوان مورد توجه محققان قرار گرفته است با این وجود بیشتر تحقیقات صورت گرفته به کاربرد آنها در زمینه های پزشکی و دارویی پرداخته اند (Cózar-Bernal et al., 2013; Tavano et al., 2011; Jiang et al., 2008; Aggarwal & Kaur, 2005; Cortesi et al., 2007; Li et al., 2011).

گرچه تاکنون گزارشی مبنی بر پایداری رنگدانه کانتاگزانتین به روش درون پوشانی توسط نیوزوم مشاهده نشده است اما تحقیقات نشان داده که درون پوشانی توسط نیوزوم می تواند نقش موثری در پایداری ترکیبات مختلف و رهایش آنها داشته باشد. به علاوه استفاده از سورفکتانت های غیر یونی به عنوان پوسته نیوزوم ها در کاربردهای غذایی در مقایسه با لیپوزوم ها هزینه پایین تر و پایداری شیمیایی بهتری دارند. هدف از این پژوهش، بررسی امکان درون پوشانی رنگدانه طبیعی کانتاگزانتین حاصل از باکتری *Dietzia natronolimnaea* HS-1 در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از نیوزوم به عنوان یک روش پیشنهادی جهت افزایش قابلیت رنگدانه در کاربردهای غذایی بود؛ بدین ترتیب تأثیر شرایط تولید همچون دور روتاری اوپراتور، غلظت رنگدانه، مقدار پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰، نوع حلال، نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت به کلسترول بر

1. Tween  
2. Span

منجر به رسوب در دوره‌های پایین تر سانتیفریژ می شود (Yang & Guo, 2014). رسوب نیوزومی جهت تخریب پوشش در اتانول خالص حل شد و پس از ورتکس کردن به منظور آزادسازی کامل کانتاگزانتین و حل شدن آن در اتانول مجدد سانتیفریژ شد. مقدار کانتاگزانتین موجود در اتانول توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۴ نانومتر تعیین شد. بازده درون پوشانی کانتاگزانتین در نیوزوم ها بر حسب درصد مطابق فرمول ذیل قابل محاسبه است:

(رابطه ۲)

$$\times \frac{\text{کانتاگزانتین اندازه گیری شده پس از تخریب پوشش نیوزومی}}{\text{کل کانتاگزانتین}} = \text{بازده درون پوشانی (درصد)} \times 100$$

### آنالیز اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات نمونه های نیوزومی در دمای محیط و با آنالایزر اندازه ذره تفرق لیزر<sup>۲</sup> مورد بررسی قرار گرفت و میانگین قطر ذره یا میانگین ساتر<sup>۳</sup> (D<sub>32</sub>) و شاخص چند اندازه‌گیری<sup>۴</sup> نمونه ها توسط دستگاه مطابق فرمول های ذیل محاسبه و تعیین شد.

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$\text{Span} = \frac{d(v, 90) - d(v, 10)}{d(v, 50)} \quad (\text{رابطه ۴})$$

در فرمول های مذکور d<sub>i</sub> قطر ذره i ام، n<sub>i</sub> تعداد ذره i ام و  $\sum$  مجموع ذرات است. d(v, 90) بیانگر میانگین قطری است که ۹۰٪ ذرات کوچک تر از آن است، d(v, 10) بیانگر میانگین قطری است که ۱۰٪ ذرات کوچک تر از آن است و d(v, 50) بیانگر میانگین قطری است که ۵۰٪ ذرات کوچک تر از آن است.

### ویژگی های میکروسکوپی نمونه

یک قطره از دیسپرسیون نیوزومی روی لام قرار گرفت و خصوصیات مورفولوژیکی نمونه از نظر شکل و اندازه تقریبی توسط میکروسکوپ نوری تعیین شد.

### تأثیر شرایط تولید بر بازده و خصوصیات نیوزوم ها

از آن جا که بررسی همزمان تمام فاکتورها منجر به افزایش اثرات متقابل بین متغیرها و پیچیدگی روابط آن ها می گردد از این رو در ابتدا با توجه به مقالات موجود فرض هایی مطرح شد و در نهایت این فرض ها با شرایط جدید مورد کنترل قرار گرفت.

$$T_c \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} \right) = \frac{A_{474} \times V_s \times 10^9}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100} \quad (\text{رابطه ۱})$$

مطابق فرمول A<sub>474</sub> جذب ماکزیمم، V<sub>s</sub> حجم محلول نمونه و A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> ضریب جذب مخصوص برای محلول ۱٪ (در اتانول، A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>=۲۲۰۰) است (Gharibzahedi et al., 2012). جهت اندازه گیری کانتاگزانتین از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۱</sup> استفاده شد (Razavi et al., 2006). دستگاه HPLC استفاده شده مجهز به دکتور ماوراء بنفش- مرئی K-2600 و پمپ K-1000 بود. جداسازی رنگدانه تولیدی در دمای اتاق با ستون Nucleosil 100 C<sub>18</sub> (125 mm×4.0 mm) مجهز به پیش ستون (5×4.0 mm) از همان جنس ستون اصلی انجام شد. مخلوط استونیتریل:متانول:دی کلرومتان با نسبت حجمی ۷:۲۲:۷۱ و سرعت ۱ میلی لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک مورد استفاده قرار گرفت.

### تولید نیوزوم

نیوزوم ها به روش هیدراسیون فیلم نازک جهت درون پوشانی رنگدانه کانتاگزانتین تولید شد. مخلوط سورفکتانت و کلسترول با نسبت معین و حرارت دهی اندک در ۱۰ میلی لیتر حلال حل شد و همراه با پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و کانتاگزانتین به بالن ته گرد ۲۵۰ میلی لیتری انتقال یافت. حلال آلی به کمک روتاری اوپراتور خلأ در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حذف شد تا فیلم نازکی روی دیواره بالن تشکیل شود (Palozza et al., 2006; Mokhtar et al., 2008; Lancrajan et al., 2001). حلال باقیمانده در آن تحت خلأ به مدت ۸ ساعت در دمای اتاق تبخیر شد. فیلم تولیدی روی جداره بالن با افزودن بافر فسفات (۱۰ میلی لیتر، pH=۷/۴، ۰/۱ میلی مولار) هیدراته و توسط اولترائوراکس (۱۰ دقیقه ۱۳۵۰۰ rpm) هموژنیزه شد (Palozza et al., 2006; Pinteá et al., 2005). تمام نمونه ها تا زمان آزمون (۲۴ ساعت بعد) در شیشه های قهوه ای رنگ و دمای یخچال نگهداری شدند.

### تعیین بازده

جهت تعیین بازده درون پوشانی، نمونه پس از افزودن ۵۰ میکرولیتر پروتامین سولفات به ازای هر میلی لیتر به مدت یک ساعت در ۱۸۰۰×g و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتیفریژ شد تا کانتاگزانتین آزاد (فاز شناور) از نیوزوم ها (رسوب) جدا شود. پروتامین سولفات نوعی ماکرومولکول پلی کاتیونی و متشکل از اسیدهای آمینه بازی است که توسط برهم کنش الکترواستاتیک در سطح جذب شده و با افزایش دانسیته ذرات

2.Laser diffraction particle size analyzer

3.Sauter mean

4.Span

1.High Performance Liquid Chromatography

استفاده شد. مقایسه دو میانگین با آزمون t و مقایسه بیش از دو میانگین با آزمون دانکن در نرم افزار SAS 9.1 صورت گرفت.

## نتایج و بحث

### تولید و آنالیز رنگدانه کانتاگزانتین

در این پژوهش به منظور تولید رنگدانه کانتاگزانتین از باکتری *Dietzia ntronolimnaea* HS-1 استفاده شد. آنالیز اولیه رنگدانه کانتاگزانتین تولید شده توسط *Dietzia ntronolimnaea* HS-1 نشان داد که مقدار کانتاگزانتین تولید شده توسط این باکتری بیش از ۹۰ درصد رنگدانه کارتنوئید تولیدی را تشکیل داده است. نتایج به دست آمده با یافته های سایر محققان همخوانی داشت ( Khodaiyan et al., 2008; Razavi & Marc, 2006; Hojjati et al., 2012).

### اثر دور روتاری بر ویژگی های نیوزوم

جهت بررسی اثر دور روتاری اوپراتور دو دور ۱۰۰ rpm و ۱۵۰ rpm که دوره های متداول مورد استفاده در مقالات مرتبط با این زمینه است استفاده شد (Abdelbary & El-gendy, 2008; Bansal et al., 2013; Firthouse et al., 2011; Ruckmani & Sankar, 2010). نیوزوم ها با نسبت مولی ۱۰۰:۱۰۰ سورفکتانت (اسپن ۶۰) به کلسترو و حلال اتانول تولید شدند. مطابق بررسی های صورت گرفته و مقالات چاپ شده اسپن ۶۰ با دمای گذار فازی بالا و HLB<sup>۱</sup> پایین چه از نظر تولید وزیکول های کروی با توزیع اندازه یکنواخت و چه از نظر تکرارپذیری در مورد مقدار ماده محبوس مورد توجه قرار گرفته است (Akhilesh et al., 2012)؛ از این رو آزمون های اولیه با اسپن ۶۰ انجام شد. در تولید نیوزوم از حلال های متفاوتی استفاده شده است که در این مطالعه با توجه به خطرات کمتر اتانول به عنوان حلال در صنایع غذایی از این ماده استفاده شد. نتایج نشان داد دور روتاری اوپراتور اثر معنی داری بر قطر میانگین نیوزوم های تولیدی در سطح اطمینان ۹۵٪ داشت (جدول ۱). استفاده از دور ۱۰۰ rpm در روتاری اوپراتور باعث افزایش ضخامت لایه تشکیل شده در بالن شد و این امر اندازه ذرات نیوزوم های حاصله را تا ۹/۳۵ میکرون افزایش داد. بدین ترتیب دور روتاری اوپراتور برای ادامه مراحل کار در سرعت ۱۵۰ rpm تنظیم شد. Waddad et al. (2013) نیز از دور ۱۵۰ rpm به علت تولید لایه ای یکنواخت برای تشکیل نیوزوم های اسپن ۶۰ استفاده کردند.

### اثر دور روتاری اوپراتور

نیوزوم ها با نسبت ۱۰۰:۱۰۰ میکرومول کلسترو به سورفکتانت (اسپن ۶۰) در ۱۰ میلی لیتر حلال اتانول (بدون کانتاگزانتین و پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰) تولید شد و اثر دور روتاری (۱۵۰ rpm و ۱۰۰) بر قطر و شاخص چند اندازه گیری نیوزوم ها مورد بررسی قرار گرفت. دور بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

### اثر غلظت رنگدانه

نیوزوم ها با اسپن ۶۰ و کلسترو با نسبت ۱۰۰:۱۰۰ میکرومول و ۱۰ میلی لیتر حلال اتانول تولید شد و اثر غلظت رنگدانه (۰، ۱ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر) بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازه گیری مورد بررسی قرار گرفت. غلظت رنگدانه بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

### اثر مقدار پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰

نیوزوم ها با نسبت ۱۰۰:۱۰۰ میکرومول اسپن ۶۰ و کلسترو حاوی کانتاگزانتین با حلال اتانول و با افزودن غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (۰، ۰/۱ و ۰/۲) تولید و اثر مقدار پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ بر بازده و ویژگی های نیوزوم مورد بررسی قرار گرفت. غلظت پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

### اثر نوع حلال

نمونه های نیوزومی در شرایط یکسان (نسبت ۱۰۰:۱۰۰ میکرومول اسپن ۶۰ و کلسترو حاوی کانتاگزانتین و پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰) تولید و اثر نوع حلال (اتانول و کلروفرم) بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازه گیری تعیین شد. اثر نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت به کلسترو

نیوزوم ها با استفاده از سه نسبت ۱۰۰:۱۰۰، ۸۰:۱۲۰ و ۶۰:۱۴۰ میکرومول از سورفکتانت های توپین ۶۰ و ۸۰ و اسپن ۶۰ و ۸۰ و کلسترو حاوی کانتاگزانتین، پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و حلال اتانول تولید شد و اثر نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت: کلسترو بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازه گیری نمونه ها بررسی شد. نمونه های تولید شده از سورفکتانت های مختلف با نسبت سورفکتانت به کلسترو بهینه تحت مشاهدات میکروسکوپی قرار گرفت.

### تجزیه و تحلیل اطلاعات

تولید نیوزوم ها بر اساس یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و در مورد اثر نوع و نسبت سورفکتانت به کلسترو از یک طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمون فاکتوریل ۳×۴ با داشتن ۴ نوع سورفکتانت و سه نسبت سورفکتانت به کلسترو

جدول ۱- اثر دور روتاری بر ویژگی نیوزوم ها\*

دور روتاری (rpm)	مقدار اسپین ۶۰ (میکرومول)	مقدار کلاسترول (میکرومول)	قطر میانگین (میکرون)	چند اندازگی
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹/۳۵±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۳/۰۲±۰/۰۶ <sup>a</sup>
۱۵۰	۱۰۰	۱۰۰	۴/۸۶±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۳/۱۱±۰/۰۶ <sup>a</sup>

\* نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش شده و حروف غیرمشابه در ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین داده ها است (P&lt;۰/۰۵).

## اثر غلظت رنگدانه بر بازده و ویژگی های نیوزوم

اثر غلظت رنگدانه بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازگی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که در نیوزوم های تولید شده با اسپین ۶۰ و کلاسترول با نسبت ۱۰۰:۱۰۰، حلال اتانول و دور روتاری ۱۵۰ rpm غلظت رنگدانه تأثیر معنی داری بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازگی داشت (P<۰/۰۵). افزایش غلظت رنگدانه کانتاگزانتین تا ۲ میکروگرم بر میلی لیتر باعث افزایش بازده تا ۵۳/۴۳٪ شد. مطالعات اولیه نشان داد افزودن مقادیر بیشتر رنگدانه تأثیر چندانی بر بازده نداشت. طبق نظر محققان گرانتوفیلها احتمالاً با تأثیر بر دینامیک غشا منجر به کاهش نفوذپذیری غشا می شوند (Socaciua et al., 1999). کانتاگزانتین نیز به عنوان یک رنگدانه آب گریز احتمالاً بین زنجیره های آب گریز سورفکتانت قرار گرفته و سختی غشا را افزایش می دهد؛ بدین ترتیب افزایش غلظت رنگدانه تا ۲ میکروگرم بر میلی لیتر، نیوزوم هایی با اندازه کوچک تر و توزیع یکنواخت تر ایجاد کرد.

اثر مقدار پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ بر بازده و ویژگی های نیوزوم نیوزوم ها با نسبت ۱۰۰:۱۰۰ اسپین ۶۰ به کلاسترول، حلال

اتانول، ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کانتاگزانتین (۲۰ میکروگرم در ۱۰ میلی لیتر)، دور روتاری ۱۵۰ rpm و غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (۰، ۰/۱ و ۰/۲) تولید شدند. نتایج نشان داد حضور پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ تأثیر معنی داری بر بازده، اندازه و شاخص چند اندازگی داشت (P<۰/۰۵). افزودن ۰/۲ پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ به طور معنی داری باعث افزایش بازده (۸۰/۹۹٪)، کاهش اندازه (۲/۲۳ میکرون) و افزایش یکنواختی (شاخص چند اندازگی ۱/۳۰) در سطح اطمینان ۹۵٪ شد (جدول ۳). پلی اتیلن گلیکول یک پلیمر آب دوست است که با گروه های سر<sup>۱</sup> سورفکتانت بر هم کنش داده و در اطراف نیوزوم ها قرار می گیرد. به علاوه پلی اتیلن گلیکول باعث جداسازی فیزیکی غشاهای وزیکولی شده و طی زمان منجر به پایداری استری می گردد (Elliott, 2009). احتمالاً حضور این ماده در اطراف نیوزوم ها باعث می شود یک لایه آب اطراف نیوزوم ها را فراگرفته و بدین ترتیب کانتاگزانتین با خاصیت آبریزی در بین زنجیره های آب گریز سورفکتانت تثبیت شود.

1 - Head group

جدول ۲- اثر غلظت رنگدانه بر بازده و ویژگی نیوزوم ها

مقدار اسپین ۶۰* (میکرومول)	مقدار کلاسترول (میکرومول)	غلظت رنگدانه (میکروگرم بر میلی لیتر)	قطر میانگین (میکرون)	چند اندازگی	بازده (درصد)
۱۰۰	۱۰۰	۰	۴/۸۶±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۳/۱۱±۰/۰۶ <sup>a</sup>	۰ <sup>c</sup>
۱۰۰	۱۰۰	۱	۳/۸۵±۰/۰۵ <sup>b</sup>	۲/۶۶±۰/۰۷ <sup>b</sup>	۴۴/۶±۳/۶ <sup>b</sup>
۱۰۰	۱۰۰	۲	۳/۴۷±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۲/۴۱±۰/۰۷ <sup>c</sup>	۵۳/۴±۲/۹ <sup>a</sup>

\* نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش شده و حروف غیرمشابه در ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین داده ها است (P&lt;۰/۰۵).

جدول ۳- اثر پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ بر بازده و ویژگی های نیوزوم\*

مقدار اسپین ۶۰ (میکرومول)	مقدار کلاسترول (میکرومول)	غلظت رنگدانه (میکروگرم بر میلی لیتر)	پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (درصد)	قطر میانگین (میکرون)	چند اندازگی	بازده (درصد)
۱۰۰	۱۰۰	۲	۰	۳/۴۷±۰/۰۳ <sup>a</sup>	۲/۴۱±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۵۳/۴±۲/۹ <sup>c</sup>
۱۰۰	۱۰۰	۲	۰/۱	۲/۷۵±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۲/۱۶±۰/۰۶ <sup>b</sup>	۶۷/۳±۲/۷ <sup>b</sup>
۱۰۰	۱۰۰	۲	۰/۲	۲/۲۳±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۱/۳۰±۰/۱۰ <sup>c</sup>	۸۱/۰±۱/۶ <sup>a</sup>

\* نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش شده و حروف غیرمشابه در ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین داده ها است (P&lt;۰/۰۵).

کرد (جدول ۴). با توجه به این نکته که اتانول یکی از پرکاربردترین و در عین حال کم خطرترین حلال ها در صنایع غذایی است و به علاوه بازده درون پوشانی کانتاگزانتین مشابهی در مقایسه با کلروفرم ایجاد کرد، استفاده از اتانول برای ادامه کار پیشنهاد شد.

### اثر نوع حلال بر بازده و ویژگی های نیوزوم

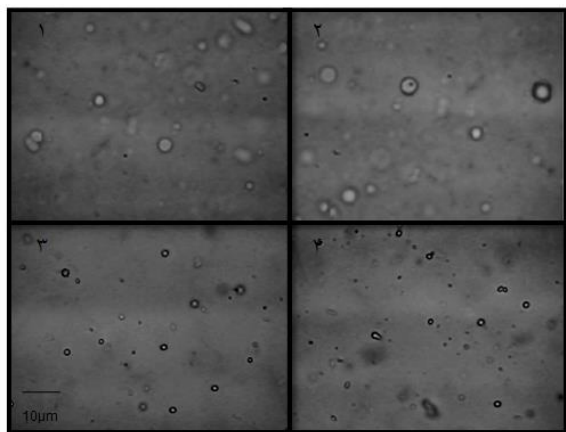
نتایج نشان داد که نوع حلال اعم از کلروفرم و اتانول در شرایط یکسان (نسبت ۱۰۰:۱۰۰ اسپن ۶۰ به کلسترول، ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کانتاگزانتین، دور روتاری ۱۵۰ rpm و ۰/۲٪ پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰) تأثیر معنی داری بر بازده نداشت ( $P < 0.05$ )؛ با این وجود کلروفرم نیوزوم های کوچک تری ایجاد

جدول ۴- اثر نوع حلال بر بازده و ویژگی نیوزوم ها\*

نوع حلال	مقدار اسپن ۶۰ (میکرومول)	مقدار کلسترول (میکرومول)	غلظت رنگدانه (میکروگرم بر میلی لیتر)	پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (درصد)	قطر میانگین (میکرون)	چند اندازگی	بازده (درصد)
کلروفرم	۱۰۰	۱۰۰	۲	۰/۲	۱/۵۷±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۱/۳۲±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۸۲/۳±۱/۹ <sup>a</sup>
اتانول	۱۰۰	۱۰۰	۲	۰/۲	۲/۳۳±۰/۰۲ <sup>a</sup>	۱/۳۰±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۸۱/۰±۱/۶ <sup>a</sup>

\* نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش شده و حروف غیرمشابه در ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین داده ها است ( $P < 0.05$ ).

اسپن ۸۰ وجود نداشت و به علاوه نیوزوم های تولید شده توسط اسپن ۶۰ کوچک تر و یکنواخت تر بود، به کارگیری اسپن ۶۰ جهت تولید نیوزوم های حاوی کانتاگزانتین گزینه بهتری محسوب شد. نیوزوم های تولید شده از نسبت سورفکتانت به کلسترول ۱۰۰:۱۰۰ اندازه کوچک تر و شاخص چند اندازگی بیشتری را نشان داد. افزایش غلظت کلسترول با افزایش نظم ساختارهای دو لایه و الحاق بهتر کانتاگزانتین در نیوزوم منجر به کاهش اندازه شد. طبق مطالعات سایر پژوهشگران افزایش غلظت کلسترول تا سطحی مشخص باعث کاهش سیالیت و افزایش سختی غشای نیوزوم به دلیل نظم دهی ساختارهای دو لایه می شود. افزودن بیش از حد کلسترول منجر به کاهش بازده به دلیل رقابت در قرارگیری کلسترول و ماده مورد نظر در غشاهای دولایه شده و این امر نظم ساختاری غشا را بر هم می زند (Waddad et al., 2013; Mokhtar et al., 2008). سخت شدن غشا به دلیل حضور کلسترول و کانتاگزانتین احتمالاً عاملی است که مانع از کاهش یکنواخت اندازه ذرات حین هموژنیزاسیون شده و در نهایت شاخص چند اندازگی را افزایش داد.



شکل ۳- ویژگی های میکروسکوپی نمونه های نیوزوم توپین ۸۰ (۱)، توپین

۶۰ (۲)، اسپن ۶۰ (۳) و اسپن ۸۰ (۴)

### اثر نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت: کلسترول بر بازده و ویژگی های نیوزوم

نیوزوم ها با استفاده از نسبت های متفاوت سورفکتانت به کلسترول، ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کانتاگزانتین، دور روتاری ۱۵۰ rpm، ۰/۲٪ پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و حلال اتانول تولید شدند. نتایج نشان داد که نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت: کلسترول اثر متقابل معنی داری بر بازده داشتند ( $P < 0.05$ ). نیوزوم های تولید شده از اسپن ۸۰ با نسبت سورفکتانت به کلسترول ۱۰۰:۱۰۰ با مقدار ۸۲/۱۶ بیشترین درصد بازده را داشت (جدول ۵). کانتاگزانتین یک ماده آب گریز است و کاهش HLB به درون پوشانی این ماده کمک می کند؛ بدین ترتیب نیوزوم های تولید شده از سورفکتانت های با HLB پایین تر کارایی درون پوشانی بالاتری داشتند. کلسترول ساختار صفحه ای دارد و افزایش غلظت کلسترول در فرمول باعث افزایش نظم ساختارهای دو لایه می شود (Elliott, 2009)، این امر احتمالاً به الحاق کانتاگزانتین در نیوزوم کمک کرده و بازده را افزایش می دهد.

نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت: کلسترول اثر معنی داری بر قطر میانگین و شاخص چند اندازگی نمونه های نیوزومی در سطح اطمینان ۹۵ درصد داشت. نیوزوم های تولید شده از اسپن ۶۰ کوچکترین اندازه ذرات و کمترین شاخص چند اندازگی را داشت. نتایج نشان داد با کاهش HLB و افزایش آب گریزی، اندازه ذرات کاهش یافته و نیوزوم هایی با اندازه یکنواخت تر ایجاد شد. میانگین اندازه نیوزوم ها با افزایش HLB سورفکتانت افزایش یافت که این امر به دلیل کاهش انرژی آزاد سطحی با افزایش آب گریزی سورفکتانت بود (Akhilesh, 2012). با این وجود اسپن ۸۰ تمایل زیادی به تولید تجمعات داشته و این امر منجر به افزایش اندازه و افزایش شاخص چند اندازگی شد. از آن جا که تفاوت چندانی بین بازده اسپن ۶۰ و

جدول ۵- اثر نوع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت: کلسترول بر بازده و ویژگی های نیوزوم\*

نوع سورفکتانت	HL B	سورفکتانت: کلسترول (میکرومول)	قطر میانگین (میکرون)	چند اندازگی	بازده (درصد)
تویین ۸۰ (پلی اکسی اتیلن سوربیتان مونو اولئات)	۱۵	۱۰۰:۱۰۰	۴/۵۲±۰/۱۸	۱/۴۸±۰/۱۳	۳۳/۴±۱/۰ <sup>h</sup>
		۱۲۰:۸۰	۴/۶۹±۰/۱۷	۱/۴۴±۰/۰۷	۲۶/۰±۲/۴ <sup>i</sup>
		۱۴۰:۶۰	۴/۹۶±۰/۱۹	۱/۱۹±۰/۱۳	۲۱/۰±۲/۹ <sup>j</sup>
تویین ۶۰ (پلی اکسی اتیلن سوربیتان مونو استئارات)	۱۴/۹	۱۰۰:۱۰۰	۴/۴۲±۰/۳۰	۱/۵۰±۰/۰۵	۴۱/۳±۱/۱ <sup>g</sup>
		۱۲۰:۸۰	۴/۳۲±۰/۱۶	۱/۴۲±۰/۱۲	۲۶/۵±۲/۵ <sup>i</sup>
		۱۴۰:۶۰	۴/۸۶±۰/۱۹	۱/۲۵±۰/۲۰	۱۹/۹±۶/۱ <sup>k</sup>
اسپن ۶۰ (سوربیتان مونو استئارات)	۴/۷	۱۰۰:۱۰۰	۲/۲۳±۰/۰۲	۱/۳۰±۰/۱۰	۸۱/۰±۱/۶ <sup>b</sup>
		۱۲۰:۸۰	۲/۳۹±۰/۰۱	۱/۱۷±۰/۰۳	۸۰/۰±۶/۸ <sup>c</sup>
		۱۴۰:۶۰	۲/۴۶±۰/۰۳	۱/۰۵±۰/۰۴	۶۸/۴±۳/۵ <sup>f</sup>
اسپن ۸۰ (سوربیتان مونو اولئات)	۴/۳	۱۰۰:۱۰۰	۳/۷۴±۰/۰۸	۲/۴۷±۰/۴۲	۸۲/۲±۰/۴ <sup>a</sup>
		۱۲۰:۸۰	۳/۷۵±۰/۱۳	۲/۵۱±۰/۱۷	۷۵/۶±۳/۱ <sup>d</sup>
		۱۴۰:۶۰	۳/۹۹±۰/۱۷	۱/۹۹±۰/۱۴	۶۹/۷±۶/۰ <sup>e</sup>
P نوع سورفکتانت			<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
P سورفکتانت: کلسترول			<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	<۰/۰۰۰۱
P اثر متقابل			۰/۲۸۲۸	۰/۴۹۴۰	۰/۰۳۸۳

\* نتایج به صورت میانگین سه تکرار گزارش شده و حروف غیر مشابه در ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین داده ها است (P&lt;۰/۰۵).

### بررسی خصوصیات میکروسکوپی نمونه

تصویر میکروسکوپی نمونه های تولید شده با انواع سورفکتانت و نسبت سورفکتانت به کلسترول ۱۰۰:۱۰۰ در شکل ۱ آورده شده است. نیوزوم های تولید شده شکلی کروی داشتند و به خوبی در محیط پراکنده شده اند. نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی با داده های قطر میانگین همخوانی داشت. نیوزوم های تولید شده با تویین (نمونه ۱ و ۲) اندازه بزرگتری نسبت به اسپن (نمونه ۳ و ۴) داشت. همان طور که در شکل ۱ نیز مشخص است نمونه های نیوزومی تولید شده از اسپن ۸۰ (نمونه ۴) تمایل بیشتری به تولید تجمعات داشت که این امر منجر به ناپایداری طی زمان شد.

### نتیجه گیری کلی

کانتاگزانتین رنگدانه ای نارنجی با ویژگی های آنتی اکسیدانی است که نسبت به شرایط محیطی حساس بوده و تخریب می شود؛ از این رو استفاده از تکنیک های درون پوشانی به عنوان روشی جهت افزایش پایداری این ترکیب اهمیت دارد. نیوزوم ها به دلیل ایجاد ساختارهای دولایه مشابه سلول می توانند پایداری و دسترسی بیولوژیکی به مواد حساس را بیش از

میسل ها افزایش دهند و به علاوه هزینه تولید کمتر و ویژگی های یکنواخت تری نسبت به لیپوزوم ها دارند؛ از این رو در این تحقیق شرایط مطلوب جهت تولید نیوزوم های حاوی کانتاگزانتین طبیعی به عنوان روشی توانمند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بکارگیری دور ۱۵۰، ۲ میکروگرم بر میلی لیتر کانتاگزانتین، ۰/۲٪ پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰، به کارگیری حلال اتانول و اسپن ۶۰ با نسبت سورفکتانت به کلسترول ۱۰۰:۱۰۰ نیوزوم هایی با بازده مطلوب و اندازه مناسب تولید کرد. بکارگیری نیوزوم ها با فرمولاسیون و شرایط تولید مناسب به علت بازده درون پوشانی بالا و مطلوب می تواند به عنوان روشی مؤثر جهت حفاظت از کانتاگزانتین در صنایع غذایی مطرح شود و این امر نیازمند تحقیقات گسترده است.

### سپاسگزاری

برخود لازم می دانیم از صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری و همچنین قطب علمی فناوری های نوین به منظور تولید غذاها و نوشیدنی های فراسودمند و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر حمایت های مادی و معنوی تشکر و قدردانی نماییم.

### REFERENCES

Abdelbary, G. & El-gendy, N. (2008). Niosome-Encapsulated Gentamicin for Ophthalmic

Controlled Delivery, *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 9(3), 740-747.

- Aggarwal, D. & Kaur, I. P. (2005). Improved pharmacodynamics of timolol maleate from a mucoadhesive niosomal ophthalmic drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 155–159.
- Akhilesh, D. Bini K. B. & Kamath, J. V. (2012). Review on span-60 based non-ionic surfactant vesicles (niosomes) as novel drug delivery, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(1), 6-12.
- Bansal, S. Aggarwal, G. Chandel, P. & Harikumar, S. L. (2013). Design and development of cefdinir niosomes for oral delivery. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 5(4), 318–325.
- Clark, T. H. Faustman, C. Chan, W. K. M. Furr, H. C. & Riesen, J.W. (1999). Canthaxanthin as an antioxidant in a liposome model system and in minced patties from rainbow trout, *Journal of Food Science*, 64(6), 982-986.
- Cortesi, R. Esposito, E. Corradini, F. Sivieri, E. Drechsler, M. Rossi, A. Scaturin, A. & Menegatti, E. (2007). Non-phospholipid vesicles as carriers for peptides and proteins: production, characterization and stability studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 339, 52–60.
- Cózar-Bernal, M.J. Rabasco, A.M. González-Rodríguez, M.L. (2013). Development and Validation of a high performance chromatographic method for determining Sumatriptan in niosomes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 251–260.
- Elliott, J. A. (2009). *PEGylation of Niosomes*, PhD dissertation, University of South Florida.
- Esfahani-Mashhour, M. Moravej, V. Mehrabani-Yeganeh, H. & Razavi, S. H. (2009). Evaluation of coloring potential of *Dietzia natronolimnaea* biomass as source of canthaxanthin for egg yolk pigmentation, *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 22(2), 254 – 259.
- Firhouse, P. U. M. Halith, S. M. Wahab, S. U. Sirajudeen, M. & Mohideen. S. K. (2011). Formulation and Evaluation of Miconazole Niosomes, *International Journal of PharmTech Research*, 3(2), 1019-1022.
- Gangwar, M. Singh, R. Goel, RK & Nath, G. (2012). Recent advances in various emerging vesicular systems: an overview, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S1176-S1188.
- Gharibzahedi, S. M. T. Razavi, S. H. Mousavi, S. M. & Moayedi, V. (2012). High efficiency canthaxanthin production by a novel mutant isolated from *Dietzia natronolimnaea* HS-1 using central composite design analysis, *Industrial Crops and Products*, 40, 345–354.
- Hojjati, M. Razavi, S. H. Rezaei, K. & Gilani, K. (2012). Stabilization of canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 with spray drying microencapsulation, *Journal of Food Science*, 51 (9), 2134-2140.
- Jaswir, I. Noviendri, D. Hasrini, R. F. & Octavianti, F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33), 7119-7131.
- Jiang, H. L. Kang, M. L. Quan, J. S. Kang, S. G. Akaike, T. Yoo, H. S. & Cho, C. S. (2008). The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization, *Biomaterials*, 29, 1931-1939
- Khodaiyan, F. Razavi, S. H. & Mousavi, S. M. (2008). Optimization of canthaxanthin production by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 from cheese whey using statistical experimental methods, *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 415-422.
- Khoo, H. E. Prasad, K. N. Kong, K. W. Jiang, Y. & Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables, *Molecules*, 16, 1710-1738.
- Kopermsub, P. Mayen, V. & Warin, C. (2011). Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement, *Food Research International*, 44, 605–612.
- Lancrajan, I. Diehl, H. A. Socaciu, C. Engelke, M. & Zorn-Kruppa, M. (2001). Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and  $\beta$ -cyclodextrins, *Chemistry and Physics of Lipids*, 112, 1-10.
- Li, N. Peng, L. H. Chen, X. Nakagawa, S. & Gao, J. Q. (2011). Transcutaneous vaccines: novel advances in technology and delivery for overcoming the barriers, *Vaccine*, 29, 6179–6190.
- Mahale, N. B. Thakkar, P. D. Mali, R. G. Walunj, D.R. & Chaudhari, S.R. (2012). Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems — an overview, *Advances in Colloid and Interface Science*, 183–184, 46–54.
- Marianecchi, C. Paolino, D. Celia, C. Fresta, M. Carafa, M. & Alhaique, F. (2010). Non-Ionic Surfactant Vesicles in Pulmonary Glucocorticoid Delivery: Characterization and interaction with human lung fibroblasts, *Journal of Controlled Release*, 147, 127–135.
- Mokhtar, M. Sammour, O. A. Hammad, M. A. & Megrab, N. A. (2008). Effect of some formulation parameters on Flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes, *International Journal of Pharmaceutics*, 361, 104–111.
- Mozafari, M. R. Flanagan, J. Matia-Merino, L. Awati, A. Omri, A. Suntres, Z. E. & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2038–2045.
- Mujoriya, R. Z. Dhamande, K. & Bodla, R. B. (2011). Niosomal drug delivery system – a review,



- International Journal of Applied Pharmaceutics*, 3(3), 7-10.
- Palozza, P. Muzzalupo, R. Trombino, S. Valdannini, A. & Picci, N. (2006). Solubilization and stabilization of  $\beta$ -carotene in niosomes: delivery to cultured cells, *Chemistry and Physics of Lipids*, 139, 32-42.
- Pintea, A. Diehl, H. A. Momeu, C. Aberle, L. & Socaciu, C. (2005). Incorporation of carotenoid esters into liposomes, *Biophysical Chemistry*, 118, 7 - 14.
- Razavi, S. H. (2004). *Détermination de conditions de mise en oeuvre d'une souche nouvellement isolée de Sporobolomyces ruberrimus pour la production de torularhodine*. Ph.D. dissertation. Institut national polytechnique de lorraine-Laboratoire des science de génie chimique, Nancy, France.
- Razavi, S. H. & Marc, I. (2006). Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25(3), 59-64.
- Razavi, S. H. Blanchard, F. & Marc, I. (2006). UV-HPLC / APCI-MS method for separation and identification of the carotenoids produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25(2), 1-10.
- Ruckmani, K. & Sankar, V. (2010). Formulation and optimization of Zidovudine niosomes, *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 11(3), 1119-1127.
- Santos, D. T. & Meireles, M. A. A. (2010). Carotenoid pigments encapsulation: fundamentals, techniques and recent trends, *The Open Chemical Engineering Journal*, 4, 42-50.
- Socaciua, C. Lausch, C. & Diehl, H. A. (1999). Carotenoids in DPPC vesicles: membrane dynamics, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55 (11), 2289-2297.
- Sosnik, A. Carcaboso, A. M. Glisoni, R. J. Moretton, M. A. & Chiappetta, D. A. (2010). New old challenges in tuberculosis: potentially effective nanotechnologies in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 547-559.
- Tarekegn, A. Joseph, N. M. Palani, S. Zacharia, A. & Ayenew, Z. (2010). Niosomes in targeted drug delivery: some recent advances, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(9), 1-8.
- Tavano, L. Alfano, P. Muzzalupo, R. & de Cindio, B. (2011). Niosomes vs microemulsions: new carriers for topical delivery of Capsaicin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87, 333-339.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles, *Bioscience Reports*, 22(2), 129-150.
- Verma, S. Singh, S. K. Syan, N. Mathur, P. & Valecha, V. (2010). Nanoparticle vesicular systems: A versatile tool for drug delivery, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(2), 496-509.
- Waddad, A. Y. Abbad, S. Yu, F. Munyendoa, W. L. L. Jing, W. Lv, H. & Zhou, J. (2013). Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants, *International Journal of Pharmaceutics*, 456(2), 446-458.
- Yang, S. & Guo, Y. (2014). Preparation of lomustine-iohexol compound liposomes and the determination of entrapment efficiency, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(1), 402-407.