

بهینه‌سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی لیپوزوم‌های حاوی نایسین

سمیرا تیزچنگ^۱، محمود صوتی خیابانی^{۲*}، رضا رضایی مکرم^۳، بابک قنبرزاده^۴، یوسف جوادزاده^۵

۱. دانش آموخته گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲. استادیار و عضو هیئت علمی گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳. استادیار و عضو هیئت علمی گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴. دانشیار و عضو هیئت علمی گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۵. دانشیار و عضو هیئت علمی گروه فارماسیتوتیکس، گروه فارماسیتوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(تاریخ دریافت: 92/8/10، تاریخ پذیرش: 92/10/29)

چکیده

نایسین به‌عنوان ماده ضد میکروبی در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای متعددی دارد. در فرم آزاد، به دلیل واکنش با قند احیاکننده و به‌طور غیراختصاصی با باندشدن بر لیپیدها و پروتئین‌ها خاصیت ضد میکروبی آن کاهش می‌یابد. برای غلبه بر این محدودیت، درون‌پوشانی نایسین با استفاده از لیپوزوم گزارش شده است. لیپوزوم‌ها به دلیل امکان درون‌پوشانی مواد محلول در آب، محلول در چربی و هم‌چنین زیست تخریب‌پذیری، قابلیت استفاده گسترده در صنایع غذایی را دارند. هدف این کار تحقیقی، بهینه‌سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی لیپوزوم‌های حاوی نایسین است.

در این تحقیق، از روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تولید لیپوزوم‌ها به روش گرمایی استفاده شد. طرح مرکب مرکزی شامل 18 آزمایش با در نظر گرفتن سه متغیر، غلظت فسفولیپید (0/14 تا 2/14 گرم)، سرعت فرایند (500 تا 1360 دور در دقیقه) و زمان فرایند (30 تا 90 دقیقه) و بررسی اثرات این متغیرها روی اندازه ذرات لیپوزوم‌ها، ارزیابی شد. سپس، کارایی درون‌پوشانی، آزمون‌های گرماسنجی اسکنی افتراقی و میکروسکوپ الکترونی گذاره برای نمونه بهینه شده، انجام گرفت. مقادیر بهینه متغیرهای غلظت فسفولیپید، سرعت فرایند و دمای فرایند در بهینه‌سازی، به ترتیب 2/14 گرم، 930 دور در دقیقه و 90 دقیقه بود. نتایج حاصل از گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC)، تشکیل ساختارهای جدید را نشان داد و کارایی درون‌پوشانی کپسول‌های لیپوزومی حاوی نایسین، 30٪ محاسبه گردید.

در این مطالعه لیپوزوم‌های حاوی نایسین، به‌طور موفقیت آمیزی با روش گرمایی تولید شدند و نتایج حاصل از گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC) و میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) تأییدی بر تشکیل ساختار لیپوزوم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کارایی درون‌پوشانی، گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC)، میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، نانولیپوزوم، روش حرارتی، روش سطح پاسخ

1- مقدمه

باکتریوسین را در شبکه ماده غذایی تضمین کند [7-8]. لیپوزوم‌ها ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی بوده و به محض قرارگرفتن در محیط آبی به صورت سازمان یافته به فرم غشاهای دولایه‌ای تجمع می‌یابند [9]. لیپوزوم‌ها می‌توانند به دلیل سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی، کاربردهای گوناگونی در صنعت داروسازی، آرایشی و بهداشتی و صنایع غذایی داشته باشند [4]. از روش‌های تولید لیپوزوم می‌توان به روش‌های مکانیکی نظیر: سونیکاسیون؛ هموژنیزاسیون و ریزسیال‌سازی و از روش‌های غیرمکانیکی می‌توان به تبخیر فاز معکوس، تخلیه ترکیب میسلی لیپید - دترجنت، خشک‌کردن انجمادی و روش حرارتی یا روش مظفری اشاره کرد. در اغلب روش‌های مکانیکی برای تهیه لیپوزوم‌ها، از حلال آلی فرار مثل کلروفرم و یا متانول استفاده می‌شود که البته مقادیر کمی از این مواد مضر در فاز لیپیدی و یا فاز آبی لیپوزوم باقی می‌ماند و خروج آن به‌طور عملی ممکن نیست. این مشکل امکان استفاده از این نوع حامل را برای اهداف کلینیکی محدود می‌کند. از این رو نسل دومی از لیپوزوم‌های آنیونی ساخته شده که تولید آن بدون استفاده از مواد مضر و با به‌کارگیری حرارت صورت می‌گیرد (روش حرارتی) [10]. تحقیقات زیادی در رابطه با روش حرارتی انجام شده‌است. کولاس و همکاران، با استفاده از روش حرارتی و با در نظر گرفتن نسبت‌هایی متفاوت فسفولیپید، لیپوزوم‌هایی با توزیع ذرات باریک‌تر، راندمان درون‌پوشانی بالا و پایداری بالا طی زمان و هدف‌گیری بهتر سلول باکتری تولید کردند [11] هم‌چنین لاریدی و همکاران، در تحقیقی میزان درون‌پوشانی لیپوزوم‌های حاوی نایسین z را بررسی کردند و فاکتورهای موثر بر میزان احتباس (pH، غلظت محلول نایسین z و غلظت کلسترول در غشاهای لیپیدی) را ارزیابی کردند. این تحقیق نشان داد، pH محلول آبی حاوی نایسین z، تأثیر قابل توجهی بر روی میزان نایسین درون‌پوشانی شده داشت. بالاترین میزان احتباس در pH بین 2 تا 3 بود هم‌چنین نتایج حاصل از افزایش غلظت نایسین (تا 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد، افزایش غلظت باعث افزایش میزان درون‌پوشانی شده و طبق این نتایج، نایسین تا حداکثر غلظت 5 میلی‌گرم، روی غشای لیپیدی قابل تثبیت شدن بود. هم‌چنین در این تحقیق، به نقش کلسترول

به‌منظور حفظ بقا در محیط طبیعی و رقابت بر سر منابع با سایر میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها ترکیب‌های ضد میکروبی تولید می‌کنند که منجر به مهار یا کشته‌شدن سوش‌های رقیب می‌شود. این ترکیبات به‌طور مشخص شامل دو گروه باکتریوسین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که اساس طبقه‌بندی آن‌ها بر پایه مکانیسم بیوسنتز است [1]. باکتریوسین‌ها پپتیدهای سنتزی یا پروتئین‌هایی با فعالیت ضد میکروبی هستند که توسط گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند [2]. باکتریوسین‌ها در مقابل حرارت، pH پایین، حلال‌های آلی ضعیف، سرما و یخ، نمک‌ها و آنزیم‌ها مقاوم بوده و در نتیجه قابلیت استفاده در سیستم‌های غذایی را دارند [3]. باکتریوسین‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی، سالم و طبیعی توسط آنزیم‌های پروتئاز دستگاه گوارش و روده بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی، سریع هضم و تجزیه می‌گردند. بنابراین می‌توان از این ترکیبات به‌عنوان یک مانع اصلی جهت کنترل عوامل بیماری‌زایی ناشی از مواد غذایی نام برد. شناخته‌ترین باکتریوسینی که نه تنها از نظر اقتصادی بلکه از نظر علمی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرد، نایسین است [2]. نایسین پلی‌پپتید ضدباکتریایی با 34 اسید آمینه، دارای وزن مولکولی 3/5 کیلودالتون بوده که توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود [4-5]. در سال 1998 سازمان غذا و دارو آمریکا نایسین را به‌عنوان یک ماده‌ی ایمن¹ برای استفاده در صنایع غذایی معرفی کرد و پس از آن نیز توسط اتحادیه اروپا مورد تأیید قرار گرفت. اکنون بیش از 50 سال است که در بیش از 50 کشور در سراسر دنیا نایسین به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده می‌شود [6]. استفاده از نایسین در فرم آزاد در محصولات لبنی به‌دلیل عدم پخش یکنواخت و مصرف بیش‌تر اقتصادی نبوده هم‌چنین بر تولید اسید و آرومای باکتری‌های آغازگر در محصولی مانند پنیر، اثر بازدارندگی دارد. ترکیب این ماده در محصولات لبنی با سایر اجزای مواد غذایی نظیر چربی و پروتئین موجب کاهش فعالیت ضد میکروبی آن می‌شود. به‌منظور حل مشکلات مذکور، درون‌پوشانی نایسین در گویچه‌های فسفولیپیدی (لیپوزوم) می‌تواند راهکار مناسب باشد. این تکنیک می‌تواند توزیع مناسب و پایداری

1. GRAS (Generally Recognized as Safe)

و دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد جهت نگهداری طی زمان نیز پرداخته شد، نتایج نشان داد افزایش محتوای کلسترول در

2- مواد و روش‌ها

در این پژوهش، فسفولیپید گرانولی با نام تجاری، ال - آلفا- لیتین با درجه خلوص 99٪ از شرکت Across آمریکا، کلسترول پودری با خلوص 95٪ از شرکت Aldrich، آمریکا، نایسین پودری با نام تجاری Valisin از شرکت Mayasan ترکیه و گلیسرول با درجه خلوص 80٪ به همراه مواد شیمیایی جهت تهیه بافر از شرکت Merck، آلمان، تهیه شدند.

2-1- تهیه لیپوزوم

ابتدا فسفولیپید با 50 میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH≈6)، و کلسترول با 50 میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH≈6)، جدا از هم، به مدت یک ساعت تحت دمای محیط هیدراته شدند. کلسترول هیدراته‌شده در حمام روغنی در دمای 110 درجه‌ی سیلسیوس و زیر هم‌زن (1370 دور در دقیقه) به‌طور کامل ذوب شد [15]. سپس فسفولیپید و کلسترول ذوب‌شده به همراه نایسین (5 میلی‌گرم در 10 میلی‌لیتر)، در بن ماری (W350B) در دمای 60 درجه سانتی‌گراد، با هم مخلوط و تحت نیروی برشی دستگاه هم‌زن مغناطیسی (Jenwey1000، ساخت انگلستان) (مقادیر دور هم‌زن: 500، 930، 1186 و 1360 دور در دقیقه می‌باشد) قرار گرفت. به‌منظور پایداری، فرمولاسیون لیپوزومی به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس در یخچال در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد [4 و 16].

2-2- تعیین اندازه ذرات

به‌منظور مطالعه اندازه ذرات نمونه‌ها، از دستگاه سنجش اندازه ذرات (Shimadzu, Sald 1100, Japan) استفاده شد. اندازه نمونه‌های تهیه شده، بعد از یک ساعت نگهداری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و متوسط اندازه ذرات بر اساس قطر حجمی توسط این دستگاه تعیین شد (معادله 1). تمامی نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند [17].

$$D[\zeta, \sigma] = \frac{\sum n_i d_i^z}{\sum n_i d_i^z} \quad (1)$$

غشای لیپیدی تا 20٪ (وزنی وزنی) منجر به کاهش کارایی درون‌پوشانی‌شده و در نتایج پایداری لیپوزوم‌های حاوی نایسین z در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت 27 روز در محیط‌های مختلف شامل شیر با سطوح چربی متفاوت (1، 2 و 3/25٪) شیرپرس چرخ، آب‌پنیر شیرین و نمک فسفات بافر نشان داد، لیپوزوم‌ها از نظر اندازه ذرات پایدار بودند [12]. در تحقیقی، راستی و همکاران، با استفاده از روش مظفری و روش هیدراسیون لایه نازک، نانولیپوزوم‌های با استفاده از اسیدهای چرب دوکوزاهگزانوئیک¹ و ایکوزاپنتانوئیک² تولید کردند، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی گذاره نشان داد، در روش مظفری نانوذرات ساختار کروی داشتند در حالی‌که در روش لایه‌نازک به‌دلیل اعمال فشار و نیروی برشی زیاد نانوذرات ساختار کروی نداشتند. اندازه ذرات در نانولیپوزوم‌های تولیدشده به روش لایه‌نازک و روش حرارتی به‌ترتیب، 200 و 362 نانومتر بود و نمونه‌های حاصل از این دو روش طی زمان دو ماهه، اختلاف معنی‌داری از نظر اندازه ذرات نداشتند و نتایج حاصل از پتانسیل زتا در فرمولاسیون‌های لیپوزومی به روش هیدراسیون لایه‌نازک و روش مظفری به‌ترتیب 34/18- و 48/33- بود [13]. در تحقیقی دیگر وفابخش و همکاران، با استفاده از روش مظفری، نانولیپوزوم‌های حاوی آنزیم فلیورزیم³ را تولید کردند، در این تحقیق کارایی درون‌پوشانی 21/9٪ به‌دست آمد و نتایج نشان داد که درون‌پوشانی آنزیم در حامل لیپوزومی به نسبت آنزیم آزاد، مشکلات ناشی از افزودن مستقیم آنزیم به شیر یا لخته (مانند پروتئولیز زودرس که منجر به استحکام نا مطلوب لخته، تولید کم، از دست رفتن مقدار زیادی از آنزیم، افزایش قیمت محصول به علت نیاز به غلظت اولیه آنزیم و توزیع ضعیف آنزیم می‌شود) را در طول تولید پنیر کاهش می‌دهد [14]. با توجه به معایب روش‌های پیشین در تهیه لیپوزوم و همچنین به‌دلیل این‌که تاکنون مطالعاتی در مورد بهینه‌سازی تولید لیپوزوم به روش گرمایی با روش سطح پاسخ انجام نشده‌است از این‌رو در این تحقیق بهینه‌سازی و بررسی

1. DHA (Docosa Hexaenoic Acid)

2. EPA (Eicosa Pentaenoic Acid)

3. Flavourzyme

قطر ذرات، \bar{D} [3 و 4]: میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean.

2-4- کارایی درون پوشانی

برای تعیین کارایی درون پوشانی فرمولاسیون بهینه شده حاصل از مرحله ی قبل، ابتدا 300 میکرولیتر از فرمولاسیون لیپوزوم، به همراه 1200 میکرولیتر بافر داخل اپندورف تیوپ ریخته شد و بیست دقیقه توسط سانتریفیوژ با دور بالا 18407 (متر بر مجذور ثانیه) سانتریفیوژ گردید سپس روشناور (سوپر ناتانت) را به آرامی جدا کرده [8] و میزان پروتئین در فاز رسوب توسط کیت اندازه گیری پروتئین پروگالول رد¹ محاسبه شد. اساس آزمایش به این صورت است که، پروتئین‌ها در حضور پروگالول رد و مولبدات² تشکیل کمپلکس قرمز رنگ می‌دهند و رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اتو آنالیزور قابل اندازه گیری است [18].

سپس کارایی درون پوشانی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

(3)

$$\text{میزان ناپسین اندازه گیری شده در لیپوزوم} \times 100 = \frac{\text{کارایی درون پوشانی}}{\text{میزان اولیه ناپسین}}$$

2-5- گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC)

به منظور اندازه گیری گرماسنجی، بعد از منجمد کردن نمونه ی لیپوزوم (فرمولاسیون بهینه)، در فریزر -80 درجه سانتی گراد، نمونه های منجمد شده در دستگاه لیوفیلیزاتور (christ مدل ALPHA 1-4، ساخت کشور آلمان) به مدت 24 ساعت به طور کامل خشک شدند سپس اندازه گیری گرماسنجی در دستگاه DSC مدل Sald 2101-Shimadzu ساخت ژاپن، انجام

1. pyrogallol red
2. molybdate

2-3- بهینه سازی لیپوزوم‌ها حاوی ناپسین

در این تحقیق از طرح مرکب مرکزی (RSMCC0318) با 18 آزمایش که شامل 4 آزمایش در نقطه مرکزی است، به منظور بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورهای غلظت فسفولیپید، زمان فرایند و سرعت همزدن بر ویژگی اندازه ذرات استفاده گردید. اثرات تغییر پذیری غیرقابل توجه در پاسخ مشاهده شده، به علت عامل‌های خارجی به وسیله تصادفی کردن ترتیب آزمایش‌ها کاهش داده شد. متغیرهای مستقل طرح در پنج سطح (-1/682، -1، 0، +1، +1/682) شامل غلظت فسفولیپید (X_1 , %w/w) در سطوح (0/14 تا 2/14 گرم)، زمان فرایند، (X_2 , min) در سطوح (30 تا 90 دقیقه)، سرعت همزن، (X_3 , rpm) در سطوح (500 تا 1360 دور در دقیقه) بود (جدول 1) در حالی که متغیر وابسته اندازه ذرات بود.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SAS-9.1 استفاده شد. معادله چند جمله‌ای درجه دوم استفاده شده در تجزیه و تحلیل به صورت زیر است:

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

که در این فرمول Y متغیر وابسته یا پاسخ مدل، β_0 ، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیون برای عامل‌های ضریب ثابت (عرض از مبدأ)، ضریب اثر خطی، ضریب اثر درجه دوم و ضریب اثر متقابل هستند و X_i و X_j متغیرهای مستقل می‌باشند.

نوع متغیر	واحد	نماد ریاضی	سطوح کدبندی شده متغیر				
			+1/682	+1	0	-1	-1/682
ظلت فسفولیپید	mg	X_1	30	24	16	8	2
زمان فرآیند	min	X_2	90	78	60	42	30
سرعت به همزدن	rpm	X_3	1360	1186	930	674	500

جدول (1) نمایش متغیرهای مستقل فرایند و مقادیر آن‌ها

شد. کالیبراسیون دستگاه توسط ایندیوم صورت گرفت. ظرف آلومینیومی خالی به‌عنوان مرجع استفاده شد و نمونه‌های بهینه پرولیپوزوم (لیپوزوم‌های خشک شده) و نمونه‌های پودری (فسفولیپید، کلسترول و نایسین)، با وزن تقریبی 4 میلی‌گرم با سرعت 20°C/min در گستره دمایی 25 تا 300 درجه سانتی‌گراد اسکن شدند. از روی گرمانگاشت حاصل، نقطه ذوب ترکیبات تعیین شد [19].

2-6- آزمون میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به‌منظور بررسی مورفولوژی ذرات و تأیید اندازه ذرات، یک قطره از نمونه سوسپانسیونی ذرات لیپیدی بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM مدل Zeiss 100 KV، ساخت آلمان) تصویربرداری شد.

3- نتیجه‌ها و بحث

3-1- نتایج بهینه‌سازی لیپوزوم‌های حاوی نایسین

نتایج آزمایش‌های مرحله بهینه‌سازی تأثیر غلظت فسفولیپید، زمان فرایند و سرعت هم‌زدن روی میزان اندازه ذرات در جدول (2) آورده شده‌است. با توجه به جدول، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان اندازه ذرات به میزان 5220 و 410 نانومتر (در نمونه‌های شماره یک با مشخصات غلظت 7/6644(gr)، سرعت هم‌زدن 674(rpm)، زمان فرایند 42(min) و در نمونه یازده با مشخصات غلظت 2(gr)، سرعت هم‌زدن 930(rpm)، زمان فرایند 60(min) مشاهده شد. نتایج آنالیز واریانس متغیرهای مورد استفاده روی اندازه ذرات در جدول (3) قابل مشاهده است. با توجه به این جدول، تأثیر خطی غلظت فسفولیپید و سرعت به هم‌زدن و اثر درجه دوم غلظت فسفولیپید روی سایز ذرات معنی‌دار بود و مقادیر P برای مدل ($p < 0/01$) و برای عدم برازش (عدم تطابق داده‌ها با مدل) ($0/27$) تأییدی بر تطابق خوب مدل با داده‌های آزمایشی دارد. مقدار عددی ضریب تبیین R^2_{adj} برای مدل رگرسیونی به‌دست آمده 78٪ بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغیرهای مستقل (زمان هم‌زدن و سرعت هم‌زدن) و متغیر وابسته (اندازه

ذرات) را نشان داده و پیش‌بینی کند. مدل به‌دست آمده برای پیش‌بینی تأثیر سرعت هم‌زدن (X_1)، غلظت فسفولیپید (X_2)، زمان هم‌زدن (X_3) بر روی اندازه ذرات لیپوزوم (Y) با حذف عوامل غیرمعنی‌دار به‌صورت زیر به‌دست آمد

(4)

$$Y = 1.162194 - 1.315645X_1 - 0.445125X_3 + 0.554265X_1^2$$

با استفاده از مدل RSM درجه دو، برای کم‌ترین اندازه ذرات لیپوزوم، مقادیر بهینه غلظت فسفولیپید 14/2(گرم)، دور هم‌زدن 930 (دور در دقیقه) و زمان فرایند 90 (دقیقه) تعیین شد.

3-2- کارایی درون‌پوشانی

مقدار پروتئین موجود در فرمولاسیون بهینه لیپوزوم، بر اساس فرمول محاسبه شد و نتایج حاصل از میزان درون‌پوشانی، لیپوزوم‌های حاوی نایسین در حدود 30٪ محاسبه گردید. در پژوهشی که بر روی درون‌پوشانی نایسین با استفاده از فسفاتیدیل کولین خالص صورت گرفت، درصد درون‌پوشانی در فرمول‌های مختلف لیپوزومی در حدود 30٪ گزارش شد. هم‌چنین Wilkinson و همکاران، در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تأثیر افزودن کلسترول شامل: افزایش پایداری، کاهش نفوذپذیری و کاهش میزان درون‌پوشانی با فشرده‌تر کردن ساختار لیپوزوم، می‌باشد. با توجه به این‌که در این تحقیق از کلسترول نیز استفاده شده‌است، می‌توان یکی از عوامل کم بودن نسبی میزان درون‌پوشانی را، حضور کلسترول نام برد [21] هم‌چنین عوامل دیگری که در کاهش راندمان درون‌پوشانی نقش دارند شامل: ماهیت ماده و خلوص ماده‌ی درون‌پوشانی شده، است [22].

Laridi و همکاران و هم‌چنین Colas و همکاران، در خصوص ماهیت ماده‌ی درون‌پوشانی شده به این نکته اشاره کردند که به‌دلیل آب‌گریز بودن نایسین، نایسین در میان غشای دو لایه‌ای قرار می‌گیرد و اگر انرژی جهت کاهش اندازه ذرات اعمال شود، به‌دلیل اعمال تنش، میزان درون‌پوشانی کاهش

میانگین اندازه ذرات *	نمونه	میانگین اندازه ذرات *	نمونه
524±0/002	10	5022±0/065	1
410±0/001	11	4239±0/082	2
827±0/002	12	3692±0/011	3
2137±0/2 01	13	1302±0/145	4
660±0/001	14	631±0/002	5
770±0/030	15	431±0/003	6
798±0/007	16	571±0/001	7
830±0/008	17	547±0/003	8
990±0/006	18	3910±0/004	9

* میانگین اندازه ذرات برحسب نانومتر می‌باشد.

جدول (2) نمایش متغیر وابسته (میانگین اندازه ذرات)

P	F	میانگین مربعات (MS)	مجموع مربعات (SS)	درجه آزادی (df)	ضرایب رگرسیون	منبع تغییرات
0/0001**	46/4909	23/6389	23/6389	1	-1/315	X ₁
0/1970	1/9761	1/0047	1/0047	1	-0/271	X ₂
0/0499*	5/3217	2/7059	2/7059	1	-0/445	X ₃
0/0140**	5/6620	4/2472	4/2472	1	0/554	X ₁₂
0/0552	5/0248	2/5549	2/5549	1	0/565	X ₁ X ₂
0/1572	2/4346	1/2379	1/2379	1	0/393	X ₁ X ₃
0/7627	0/0975	0/04961	0/0496	1	0/062	X ₂₂
0/5579	0/3737	0/1900	0/1900	1	-0/154	X ₂ X ₃
0/0001**	13/5941	10/1973	30/5920	3	-	مدل
0/0006**	17/9295	9/1165	27/3495	3	-	اثر خطی
0/0605	3/7325	1/8978	5/6935	3	-	اثر درجه دوم
0/1235	2/6110	1/3276	3/9829	3	-	اثر متقابل
-	-	0/7501	10/5017	14	-	باقی مانده
0/2730	1/5286	0/9645	4/82278	5	-	عدم تطابق داده‌ها با مدل
-	-	0/6310	5/6790	9	-	خطای خالص
-	-	-	41/0937	17	-	کل

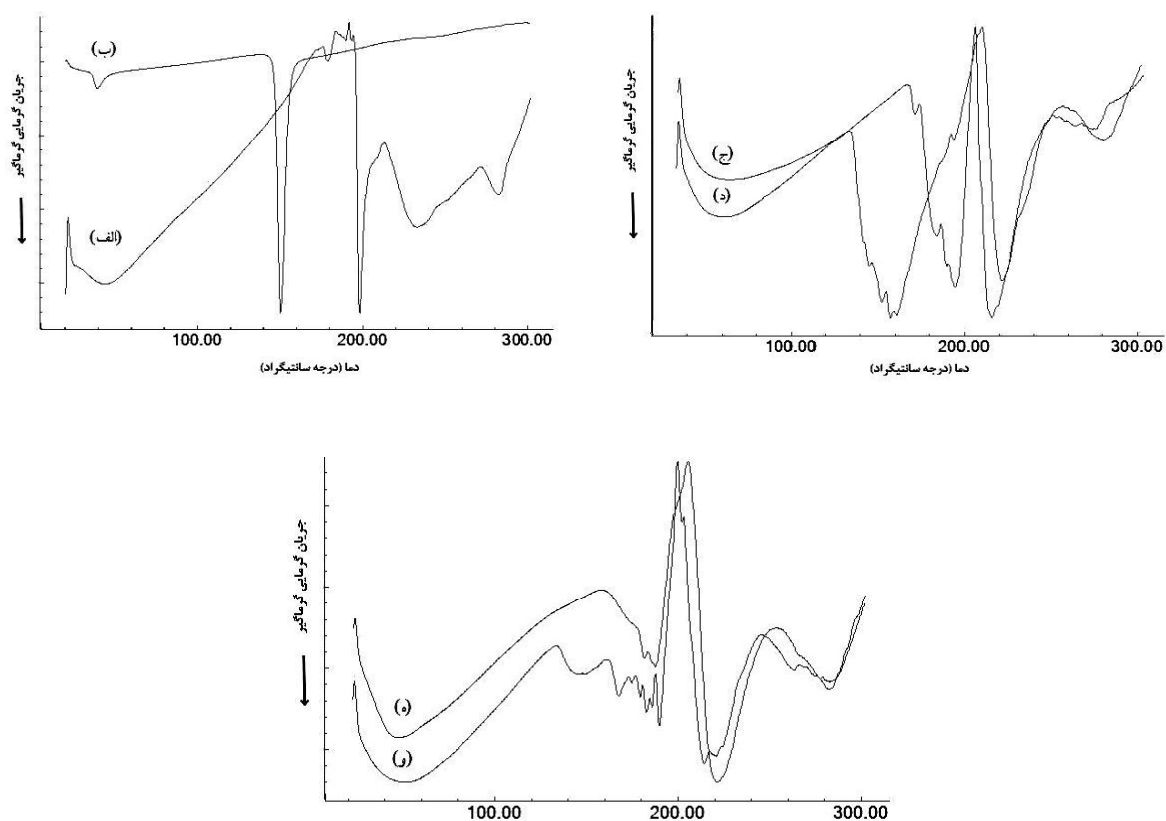
جدول (3) نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت فسفولپید، زمان هم‌زدن و سرعت هم‌زدن بر روی اندازه ذرات

آن به وجود می‌آورد، نیز بررسی گردید. شکل (1-الف) منحنی گرمایشی DSC مربوط به لستین پودری می‌باشد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود در نمونه لستین پودری دو پیک اندوترمیک مشاهده شد، پیک اندوترمیک اول در دمای 198 درجه سانتی‌گراد و پیک اندوترمیک دوم در دمای 233 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. وجود دو پیک اندوترمیک نشان دهنده دو نوع بلور در لستین پودری است. این دو نوع بلور می‌تواند به علت تشکیل دو نوع بلور چربی با نظم و ساختار بلوری و پایداری ترمودینامیکی متفاوت از یک ماده واحد باشد و یا به دلیل استفاده از لستین تجاری حاوی چندین نوع فسفولیپید باشد. با توجه به شکل (1-ب)، (منحنی مربوط به کلسترول پودری) پیک اندوترمیک ذوب در دمای 150/85 درجه سانتی‌گراد

می‌یابد. در خصوص خلوص ماده می‌توان به این مورد اشاره کرد که، خلوص ماده درون‌پوشانی شده و خلوص مواد مورد استفاده در فرمولاسیون بر بار سطحی، خصوصیات تراوایی، قابلیت انحصار و میزان درون‌پوشانی تأثیر خواهد گذاشت [11 و 12].

3-3- نتایج حاصل از بررسی گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC)

آنالیز DSC به منظور بررسی رفتار کریستالی نایسین، لستین، کلسترول و حالت توزیع نایسین (کریستالی، آمورف و پخش شده به صورت مولکولی) در ساختار لیپوزوم‌ها در فرمولاسیون بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت و هم‌چنین تداخل نایسین در حامل لیپوزومی و اثر آن بر ذرات و تغییراتی که در شبکه کریستالی



شکل (1) نتایج حاصل از بررسی گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC)
 (الف) لستین پودری، (ب) کلسترول پودری، (ج) لستین لیپوزومی، (د) لستین لیپوزومی حاوی کلسترول،
 (ه) لستین لیپوزومی حاوی نایسین، (و) لستین لیپوزومی حاوی نایسین و کلسترول

زنجیره‌ها نقش مهمی در تعیین ساختار دو لایه لیپیدی دارد. بسیاری از این فاکتورها با قرارگیری کلاسترول در ساختار تغییر می‌کند. همچنین آن‌ها معتقد بودند که حلقه تتراپیرولی کلاسترول تأثیر بی‌نظم‌کنندگی بر روی زنجیره‌های آسیل دارد [27]. نمونه حاوی لستین و نایسین لیپوزومی دارای دو پیک اندوترمیک می‌باشد (شکل 1-ه). پیک اندوترمیک اول در دمای 220 درجه سانتی‌گراد و پیک اندوترمیک دوم در دمای 190 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که نشان‌دهنده یک افزایش جزئی در دمای ذوب می‌باشد. با توجه به این‌که پودر نایسین پیک‌های تیز و بزرگی را نشان نداده‌است به نظر می‌رسد این امر می‌تواند مربوط به ساختاری تقریباً آمورف آن باشد ولی انتقال شیشه‌ای در دمای 186 و 216 درجه سانتی‌گراد قابل مشاهده است. نمونه حاوی لستین، کلاسترول و نایسین (شکل 1-و) دارای دو پیک اندوترمیک می‌باشد. پیک اندوترمیک اول در دمای 214 درجه سانتی‌گراد و پیک اندوترمیک دوم در دمای 189 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. کاهش در دمای ذوب نسبت به لیپوزوم حاوی نایسین نشان‌دهنده تأثیر کلاسترول است که به‌عنوان ناخالصی عمل کرده‌است.

3-4- میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)

به‌منظور بررسی مورفولوژی ذرات و تأیید اندازه ذرات، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه بهینه‌شده فاقد کلاسترول تهیه شد (شکل 2). تصویر مربوطه، وجود وزیکول‌های کروی شکل، یونی لاملا¹ با اندازه 180 نانومتر را نشان می‌دهد که این نتایج، نتایج حاصل از اندازه‌گیری ذرات با استفاده از دستگاه سنجش اندازه ذرات در فرمولاسیون بدون کلاسترول را تأیید می‌نماید.

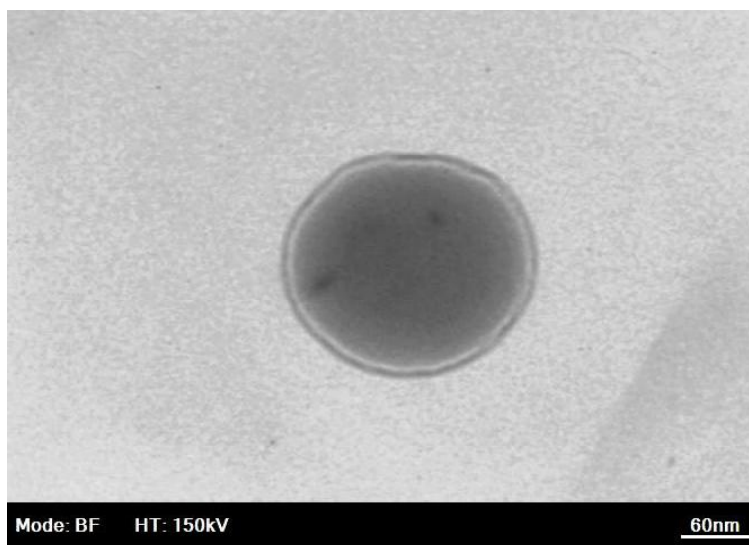
4- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، سرعت و زمان هم‌زدن تأثیر قابل توجهی در سایز ذرات دارد. نتایج حاصل از گرماسنجی اسکنی افتراقی و میکروسکوپ الکترونی گذاره تأییدی بر تشکیل لیپوزوم و نتایج درون‌پوشانی تأییدی در جهت استفاده از روش حرارتی در تشکیل لیپوزوم‌ها می‌باشد.

مشاهده شد. Rudra و همکاران، در تحقیقات خود دمای ذوب کلاسترول پودری را 149 درجه سانتی‌گراد گزارش کردند [23].

در مورد نمونه لستین لیپوزومی (شکل 1-ج) دو پیک اندوترمیک مشاهده شد، پیک اندوترمیک اول در دمای 218 درجه سانتی‌گراد و پیک اندوترمیک دوم در دمای 150 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. کاهش نقطه ذوب در اثر تشکیل لیپوزوم، می‌تواند ناشی از این باشد که در اثر تشکیل لیپوزوم‌ها اندازه ذرات نسبت به حالت توده کاهش می‌یابد و این کاهش اندازه ذرات موجب کاهش دمای ذوب می‌گردد. نتایج این تحقیق با نتایج Bunjes و Unruh مطابقت داشت. این دو محقق در تحقیقات خود به این نتیجه اشاره کردند که نقطه ذوب نانوذرات تولید شده، نسبت به توده مواد (لستین خالص) کمتر می‌باشد [24]. شکل (1-د) نشان می‌دهد که نمونه حاوی لستین و کلاسترول دارای دو پیک اندوترمیک می‌باشد. پیک اندوترمیک اول در دمای 211 درجه سانتی‌گراد و پیک اندوترمیک دوم در دمای 189 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. این امر نشان‌دهنده این است که با ورود کلاسترول به ساختار لیپوزومی دمای ذوب کاهش یافته است. احتمالاً کلاسترول به‌عنوان ناخالصی موجب تشکیل بلورهای ناقصی از لیپوزوم شده و این امر موجب کاهش دمای ذوب شده‌است. Chung و همکاران، تأثیر افزودن کلاسترول بر دمای انتقال فاز فسفاتیدیل کولین (10) C: (18) C (نوعی فسفاتیدیل کولین با ترکیبی از دو زنجیره آسیل نامتقارن) را بررسی کردند. نتایج نشان داد که با افزودن کلاسترول، آنتالپی کل و دمای انتقال فاز کاهش یافت و همچنین پهنای پیک انتقال افزایش یافته و در 25 درصد مولی کلاسترول به‌طور کامل حذف شد [25] همچنین Hung و همکاران، در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که گروه متیل انتهایی اسید چرب کلاسترول، موجب بی‌نظمی در ماتریکس لیپیدی می‌شود که این امر منجر به کاهش دمای انتقال فاز در دولایه به‌هم پیوسته ترکیبی از دو زنجیره آسیل می‌شود [26]. Darvis و همکاران، در تحقیقات خود در رابطه با فاکتورهای موثر در ساختار دولایه لیپیدی به این نتیجه رسیدند، فاکتورهایی از قبیل تفاوت در طول زنجیره، آرایش مولکولی، تعداد و موقعیت باندهای دو گانه و تفاوت در وضعیت قرارگیری

1. ULVS (Unilamellar Vesicles)



شکل (2) تصویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی گذاره

of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy. J.*, 18, 329–343.

[6] Bedg, D., Bundale, S., Mashitha, P., Rudra, J., Nashikkar, N., Upadhyay, A. (2011). Immunomodulatory efficacy of nisin a bacterial lantibiotic peptide. *Int. J. peptide. Sci.*, 17, 438-444.

[7] Phikunthong, K., Varissaporn, M., Warin, C. (2011). Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food. Res. Int.*, 44, 605–612.

[8] زایرزاده، ا.؛ مرتضوی، س.ع.؛ جعفری، م.ر.؛ افشارنژاد، س.؛ طباطبایی یزدی، ف.؛ نصیری محلاتی، م. (1390) بررسی اثر ضدباکتریایی نایسین به دو فرم آزاد و نانوانکپسوله در لیپوزوم بر ماندگاری و کاهش جمعیت لیستریایی پنیر سفید ایرانی فرآپالایش. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، شماره 3، ص 199 - 191.

[9] Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trend. Food. Sci. Technol.*, 12, 25–31.

[10] Mozafari, M., Flanagan, J., Matia-merino, L.,

منابع

[1] حمیدی، م.؛ موسوی نسب، س.د.؛ احمدی، ن.؛ بساطی، غ.؛ اولاد، غ.؛ سلیمیان، ج.؛ زرگر، م. (1391) سنتز پپتیدهای ضد میکروبی در باکتری‌ها. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. دوره بیستم، شماره چهارم، ص 158-170.

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

[3] Cheikh, Y., Pogori, N., Chen, W., Zhang, H. (2008). Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: From production to their application. *Int. J. Food. Microb.*, 125, 215-22.

[4] Da SilvaMalheiros, P., JonerDaroit, D., Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trend. Food. Sci. Technol.*, 21, 248-292.

[5] Sobrino-Lopez, A., Martín-Belloso, O. (2008). Use

- Clin. Chem.*, 32, 1551-1554.
- [19] Pople, P.V., Singh, K.K. (2011) Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 79, 82-94.
- [20] Benech, R., Kheadr, E. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Appl. Envi. Micro.*, 68, 3683-3690.
- [21] Wilkinson, M., Kilcawley, K. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy. J.*, 15, 817-830.
- [22] خسروی دارانی، ک؛ مظفری، م.ر. (1390). نانولیپوزومها، کاربردهای درمانی و صنعتی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی شهید بهشتی.
- [23] Rudra, A., Deepa, R.M., Ghosh, M.K., Ghosh, S., Mukherjee, B. (2010). Doxorubicin-loaded phosphatidylethanolamin econjugated nanoliposomes: in vitro characterization and their accumulation in liver, kidney, and lungs in rats. *Int. J. Nano.*, 5, 811- 823.
- [24] Bunjes, H., Unruh, T. (2007). Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 59, 379-402.
- [25] Chung, P.L.G., Choate D. (1989). Calorimetric studies of the effects of cholesterol on the phase transition of C (18): C (10) phosphatidylcholine. *Biophys. J.*, 55, 551-556.
- [26] Hung, C., Levin, I.W. (1983). Effect of lipid chain length inequivalence on the packing characteristics of bilayer assemblies. *J. Phys. Chem.*, 87, 1509-1513.
- [27] Davis, P.J., Keough, K.M.W. (1985). Chain arrangements in the gel state and the transition temperature of phosphatidylcholine. *Biophys. J.*, 48, 915-918.
- Awati, A. (2006). Recent trend in lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in food, *J. Sci. food. Agri.*, 86, 2038-2045.
- [11] Colas, J.C., Wanlong, S., Malleswara, V.S.N., Omri, A., Mozafari, M.R. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron.*, 38, 841-847.
- [12] Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuille-mard, J.C., Lacroix, C., Fliss, L. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *Int. Dairy. J.*, 13, 325-336.
- [13] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M., Yazid, A.M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food. Chm.*, 135, 2764-2770.
- [14] Vafabakhsh, Z., Khosravi-Darani, K., Khajeh, Kh., Jahadi, M., Komeili, R., Mortazavian, A.M. (2013). Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposomes. *Biochem. Eng. J.*, 72, 11-17.
- [15] Mozafari, M., Johnson, C., Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their application in food nanotechnology. *Int. J. Liposome. Res.*, 18, 308-336.
- [16] Mozafari, M., Mortazavi, S. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Int. J. Liposome. Res.*, 18, 309-327.
- [17] Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., Alonso, S., Chiaramoni, N.S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food. Res. Int.*, 44, 3039-3046.
- [18] Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, S. (1986) Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex. Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer.