www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۶، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۱۲-۴۰۳

JRIFST

نانولیپوزوم عصارۀ دانۀ انگورسیاه با فرمولاسیون جدید و کاربرد آن در دوغ

مهسا حمیدی[۱]، میرخلیل پیروزی‌فرد[۲*]، محمد علیزاده خالدآباد[۳]، هادی الماسی[۴]

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲ - دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
* نویسندۀ مسئول (mpirouzifard@yahoo.com)
۳ - استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴ - استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۲۱

واژه‌های کلیدی
دوغ
عصارۀ دانۀ انگورسیاه
فرمولاسیون جدید
کلسترول
نانولیپوزوم

چکیده

غنی‌سازی با مواد زیست‌فعال مانند ویتامین‌ها و ترکیبات فنلی و افزایش دسترس‌پذیری زیستی این مواد جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی ازجمله کاربردهای نانوتکنولوژی در صنایع غذایی است. در پژوهش حاضر اثر فسفولیپید (در نسبت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد) کلسترول و بتاسیتوسترول (هرکدام در نسبت‌های صفر تا ۵۰ درصد) با فاکتور عصارۀ هستۀ انگورسیاه (در ۵ سطح ۱۰۰، ۳۲۵، ۵۵۰، ۷۷۵ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) به‌منظور تولید نانولیپوزوم با فرمولاسیون جدید جهت به‌دام‌انداختن عصارۀ دانه‌های انگورسیاه در یک طرح آماری ترکیبی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین نانولیپوزوم‌های تولیدی در درون دوغ به‌منظور بررسی اثرات آنها همراه با ترکیبات فنلی روی پایداری فیزیکی و خصوصیات شیمیایی دوغ، افزوده گردید که نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز آماری داده‌ها در سطح معنی‌داری ($\alpha<۰/۰۵$) نشان داد که کاهش میزان عصارۀ مصرفی و کاهش نسبت فسفولیپید به بتاسیتوسترول موجب کاهش اندازۀ ذرات نانولیپوزوم و همچنین کاهش میزان دوفازشدن در نمونه‌های دوغ در طی زمان و کاهش سرعت رهاسازی عصاره‌ها از نانولیپوزوم‌ها و پایدارترشدن لیپوزوم‌ها شد. به‌طوری‌که در فرمولاسیون ۵۰:۵۰ رهاسازی کاهش پیدا کرده و به میزان (۷/۹ درصد) رسید. همچنین باتوجه‌به نتایج و اثرات منفی کلسترول به سلامتی، جایگزین‌کردن آن با ماده‌ای شبیه خود و سالم می‌توان سلامت را در جامعه بیشتر و بهتر نمود که ازاین‌جهت باتوجه‌به قابلیت‌های مثبت بتاسیتوسترول در فرمولاسیون جدید لیپوزوم می‌توان جایگزینی مناسب برای کلسترول باشد.

مقدمه

هرساله بیش از ۱۰ میلیون موارد جدید سرطان‌شناسایی می‌شود و بیش از ۲۰ میلیون نفر در دنیا با تشخیص اینکه مبتلابه سرطان هستند زندگی می‌کنند (Hidarie *et al.,* 2008). محققین اظهار داشته‌اند سرطان نتیجۀ عملکرد هم‌زمان عوامل متعددی می‌باشد. رادیکال‌های آزاد ایجادشده در فرایند اکسیداسیون در بدن، سبب اکسیداسیون لیپید[1] غشاء سلولی می‌شوند که این امر منجربه ناپایداری غشاء و متلاشی‌شدن سلول می‌شود و یا اینکه ترکیبات سلولی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و از همه مهم‌تر DNA مورد حمله قرار می‌گیرند. مهم‌ترین عامل دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها

[1] Lipid oxidation

هستند. عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها منجربه حملهٔ رادیکال‌های آزاد به مولکول‌های بیولوژی خواهد شد (Koksal & Gulcin, 2008). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که در غلظت کم در مقایسه با سوبسترا به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش سرعت واکنش‌های اکسیداتیو با مکانیسم‌های مختلف می‌گردند (Madavi & Salunkhe, 1995). ازاین‌رو در سال‌های اخیر تحقیق دربارهٔ استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که دارای منشاء گیاهی می‌باشند ازسوی محققان بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Jayaprakasha *et al.*, 2000). انگورسیاه[1] با تولید سالیانه نزدیک ۸/۱ میلیون تن، به‌عنوان یکی از بزرگترین محصولات کشاورزی تولیدی در جهان می‌باشد (FAO, 2005). انگور در میان میوه‌ها دارای بالاترین میزان ترکیبات فنلی می‌باشد که به مقدار متفاوت در پوست، گوشت و دانهٔ انگور توزیع شده است، بدین‌صورت‌که دانهٔ انگور یکی از غنی‌ترین منابع ترکیبات فنلی در طبیعت می‌باشد (Revilla & Ryan, 2000). محلول پلی‌فنلی حاصل از هستهٔ انگورسیاه حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بسیار حیاتی می‌باشد که از فلاوان ۳-ال[2]ها می‌توان به (+) اتچین[3]، (-) اپی‌کاتچین[4] و اپی‌کاتچین ۳- اکسیژن- گالات[5] اشاره کرد (Frankel *et al.*, 1995). کپسولاسیون، تکنولوژی است که در آن ترکیبات فعال یا هدف (هسته که می‌تواند به‌صورت مایع، جامد و گاز باشد) برای حفاظت و کنترل رهاسازی توسط ترکیبات دیواره پوشش داده می‌شوند (Desai *et al.*, 2005; Kamyshny *et al.*, 2006). انواع مختلف حامل‌ها در صنایع غذایی قابلیت تولید و کاربرد دارند و شامل نانوکپسول‌های بر پایهٔ بیوپلیمرها و انواع لیپید (نانولیپوزوم‌ها، نانونیوزوم‌ها، نانوامولسیون‌ها، میسل‌های سورفاکتانت‌ها[6] (میکروامولسیون‌ها) و ذرات لیپیدی (جامد) می‌باشند (Keller, 2001). در این بین ویژگی‌هایی ازقبیل سمیت پایین، زیست‌تجزیه‌پذیری و فقدان ایمونوژنیسیته[7]، سبب شده است تا لیپوزوم‌ها به‌عنوان یک حامل مناسب در سیستم‌های دارورسانی نوین مورد توجه واقع شوند. این ساختارهای ریز و کیسه‌مانند شبیه کپسول‌هایی می‌باشند که می‌توانند با پوشاندن مواد ضروری در درونشان (انکپسولاسیون)، از آنها برای حمل مواد فعال به نقاط مختلف بدن استفاده کرد. افزایش سطح کلسترول خون یکی از عوامل مهم ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی است. البته از دههٔ ۱۹۵۰ اثر استرول‌های گیاهی در کاهش کلسترول خون مشخص شده است (متانتی و صرافی‌زاده، ۱۳۹۵). دوغ یکی از نوشیدنی‌های مطلوبی است که محبوبیت بسیار فراوانی دارد و یکی از فراورده‌های اسیدی تازه و مغذی بومی ایران محسوب می‌شود. دوغ، همچنین یکی از نوشیدنی‌های اسیدی تولیدشده در کل دنیا بشمار می‌آید. این طیف از نوشیدنی‌ها به‌همراه اسید تولیدی توسط باکتری‌های تخمیرکنندهٔ شیر تحت اسیدی‌کردن مستقیم شیر تهیه می‌شوند (Nakamura *et al.*, 2006). دوغ نوشیدنی سالم و مفیدی است که می‌تواند یک چهارم نیاز روزانهٔ کلسیم و همچنین ویتامین‌های B_2، B_6 و B_{12} یک فرد را تأمین کند. همچنین دوغ دارای باکتری‌های مفیدی است که اثرات زیادی بر سلامت دستگاه گوارش دارند به‌طوری‌که می‌توان به اثرات ضدمیکروارگانیسم‌های پاتوژن بخصوص *اشرشیاکلی*[8] (*E.coli O157:H7*) اشاره کرد (فروغی‌نیا و همکاران ۱۳۸۶؛ وثوق و همکاران ۱۳۸۸؛ جمالی‌فر و همکاران ۱۳۸۸؛ ابراهم‌زادگان و همکاران، ۱۳۹۲). ازاین‌رو برای بهبود خصوصیات ظاهری و ارتقاء بیشتر ارزش تغذیه‌ای دوغ، افزودن ترکیبات فعال هستهٔ انگورسیاه با استفاده از تکنولوژی انکپسولاسیون با فرمولاسیونی جدید می‌تواند راهکار مؤثری در بهبود و افزایش سطح سلامت عمومی جامعه و محصولات تولیدی داشته باشد. اسمعیل‌زاده و همکاران (۱۳۹۲) در آزمایشی که روی میزان فلاونوئیدهای تفالهٔ انگورسیاه انجام داده بودند، مقدار محتوای فلاونوئید و آنتوسیانین را به‌ترتیب ۱±۲۶ و ۰/۸±۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک تفاله گزارش کردند. در مورد نمونه‌های

[1] *Vitis vinifera*
[2] Flavan-3-ol
[3] (+) Catechin
[4] (-) Epicatechin gallate
[5] Epicatechin-3-O gallate
[6] Surfactant micelles
[7] Immunogeniticity
[8] *Escherichia Coli*

کنسانترهٔ حاصل از انگورهای سیاه، مقدار محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و آنتوسیانین کل به‌ترتیب ۸±۲۱۶، ۱±۵۶ و ۲±۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کنسانتره‌های تولیدشده توسط کارخانه به‌دست آوردند که بالاترین غلظت در نمونه‌های کنسانتره نیز مربوط به کاتچین (۲۹±۴۳۷)، اپی‌کاتچین (۱۲±۱۵۷)، کوئرسیتین[1] (۸±۱۲۷) و گالیک‌اسید (۷±۷۸) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کنسانتره تعیین شدند. Xia و Xu (۲۰۰۵)، نانولیپوزوم حاوی فروس سولفات را به شیر اضافه کردند و مشاهده نمودند که نانوذرات، تحت شرایط استریلیزاسیون و نگهداری در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز پایدار می‌ماندند. ارزیابی حسی نشان داد که شیر غنی‌شده با لیپوزوم‌های حاوی فروس سولفات تفاوت زیادی از لحاظ رنگ و طعم با نمونه‌های کنترل نداشتند و نتایج نشان می‌دهند که می‌توان لیپوزوم‌های حاوی فروس سولفات را در شیر استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

فسفولیپد، کلسترول و بتاسیتوسترول[2] (محصول شرکت سیگما آلدریچ[3])، استارتر تجاری ماست (محصول شرکت کریستن هانسن[4])، انگورسیاه سردشت، معرف فولین[5] محصول شرکت مرک آلمان و اتانول ۹۶ درصد غدیر برای انجام تحقیق خریداری شد.

استخراج عصارهٔ دانهٔ انگور

تولید عصاره مطابق با روش سالاری و همکاران (۱۳۸۸) با کمی تغییرات انجام گرفت. به‌طوری‌که مقداری معین از پودر هستهٔ انگور را با ۱۰ برابر وزنی آن از محلول مورد نظر که حاوی استون:آب: اسیداستیک با نسبت ۹۰ :۹/۵ :۰/۵ می‌باشد، مخلوط‌شده و سوسپانسیون به آرامی هم‌زده شد. به‌منظور استخراج بهتر، سوسپانسیون حاصل درون ارلن مایر به مدت ۱۲ ساعت در دمای محیط روی هات پلیت مگنت‌دار[6] با ۳۰۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. عصاره‌های حاصل، ابتدا توسط پارچهٔ صافی و سپس با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد. بخش اعظم حلال‌ها با استفاده از دستگاه روتاری اواپراتور حذف گردید. پس از خشک‌شدن عصاره‌ها تا رسیدن به وزن ثابت خشک در دسیکاتور قرار گرفتند.

تولید نانولیپوزوم

تولید نانولیپوزوم مطابق روش Fatouros و همکاران (۲۰۰۱) با مقداری تغییرات و اصلاحات انجام گرفت. نسبت‌های تعیین‌شده‌ای از پودر فسفولیپید، کلسترول، بتاسیتوسترول در طرح آماری توزین شد (فسفولیپید در نسبت‌های ۵۰، ۵۸/۳، ۷۵، ۸۳/۳ و ۱۰۰ درصد و کلسترول و بتاسیتوسترول هر دو به‌طور مجزا به نسبت‌های صفر، ۸/۳، ۲۵، ۳۳/۳، ۵۰ درصد در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها استفاده گردیدند) و در مقدار نسبت ۲:۱ از آب و حلال (اتانول) حل گردید، سپس سوسپانسیون به مدت ۴۵ دقیقه روی هات پلیت مگنت‌دار در دمای محیط با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه گذاشته و هم‌زمان با قراردادن سوسپانسیون تولیدی روی هات پلیت باتوجه‌به طرح آماری (۱۰۰، ۳۲۵، ۵۵۰، ۷۷۵ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) مقادیر عصاره‌های مورد نظر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر حل کرده و به آرامی درون محلول لیپوزومی افزوده گردید. سپس به‌منظور تبخیر حلال خوراکی و شکل‌گیری حالت لیپوزوم‌های چندلایه، نمونه را در روتاری اواپراتور قرارداده و بعد از این مرحله به‌منظور کاهش اندازه و ایجاد لیپوزوم‌های تک یا دولایه، نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه تحت سونیکاسیون قرار داده شدند.

ارزیابی اندازهٔ ذرات

اندازهٔ ذرات در دمای محیط (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) با دستگاه تعیین اندازهٔ ذرات[7] مدل (SALD-2101) اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در سل دستگاه تا خط نشانه ریخته و جهت سیرکولاسیون نمونه، پمپ آن روشن گردید و متوسط اندازهٔ ذرات براساس میانگین قطر حجمی توسط رابطهٔ (۱) محاسبه شد و تمامی نمونه‌ها

[1] Querecetin
[2] Beta-sitoestrol
[3] Sigma-Aldrich
[4] Chr. Hansen
[5] Folin-Ciocalteu's phenol reagent
[6] Hotplate Stirrers
[7] Particle Size Analyzer

در ۳ تکرار اندازه‌گیری شدند.

رابطهٔ (۱)

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

در رابطهٔ (۱)، n_i تعداد ذرات و d_i قطر میانگین ذرات است.

کارآمدی به‌دام‌انداختن

کارآمدی به‌دام‌انداختن در دمای محیط (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و در ۳ تکرار باتوجه‌به ماهیت فنولی عصاره با استفاده از روش اندازه‌گیری میزان فنل کل (Jayaprakasha *et al*., 2003) بدین‌صورت‌که ابتدا مقدار فنل کل عصارهٔ مصرفی به درون سوسپانسیون لیپوزوم را با استفاده از معرف فولین‌سیوکالتو[1] و محلول ۷/۵ درصد سدیم کربنات و قراردادن در محیط تاریک پس از ۲۰ دقیقه میزان فنل کل اندازه‌گیری شده و در مرحلهٔ بعد نانولیپوزوم حاوی ترکیبات فنلی افزوده‌شده را بعد از تولید نانولیپوزوم، سوسپانسیون تولیدی را با استفاده از فیلتر آمیکون[2] فنل کپسوله‌شده را از فنل آزاد جداکرده و با استفاده از اندازه‌گیری مقدار فنل آزاد در سوسپانسیون، میزان فنل کپسوله‌شده اندازه‌گیری و با استفاده از رابطهٔ (۲) کارآمدی محاسبه شد.

رابطهٔ (۲)

$$\text{درصد کارآمدی} = \frac{A - B}{A} * 100$$

در رابطهٔ (۲)، A: مقدار فنل کل عصاره و B: مقدار فنل آزاد در سوسپانسیون است.

کنترل رهاسازی

کنترل رهاسازی در دمای محیط (۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون تولیدی که حاوی نانولیپوزوم‌های بدون ترکیبات فنلی و لیپوزوم‌هایی حاوی ترکیبات فنلی و ترکیبات فنلی آزاد بوده است با pH ۵/۷ و پس از یک هفته نگهداری در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد جهت اندازه‌گیری میزان رهاسازی مواد انکپسوله‌شده، روی هات پلیت با دور ۷۵ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای همگن‌سازی قرار گرفته شد. سپس نمونه‌ها با استفاده از فیلتر آمیکون و اولترا سانتریفیوژ جداسازی شده و با استفاده از اسپکتوفتومتر و جذب حاصله از واکنش معرف فولین-سیوکالتیو رهاسازی محاسبه گردید (Ishii & Nagasaka, 2001; Jayaprakasha *et al*., 2003).

پایداری لیپوزوم‌ها

پایداری نمونه‌های لیپوزوم تولیدی با نگهداری نمونه‌ها در دمای یخچال برای محافظت از اثر تخریبی دما روی ترکیبات فنلی انجام گرفت. به‌طوری‌که ابتدا نمونه‌ها را به مدت ۳۰ روز با دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری کرده و هر ۱۵ روز یکبار برای انجام آزمایش پایداری تحت آزمایش قرار گرفتند. پس از نگهداری تیمارها، برای اندازه‌گیری پایداری ساختار لیپوزوم‌ها، آنها را در لوله‌های سانتریفیوژ با دور ۴۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از فیلتر آمیکون عصاره‌های خارج‌شده و آزاد جدا گردید و با استفاده از تست فولین، اسپکتوفتومتر و با استفاده از رابطهٔ (۳) پایداری محاسبه شد (Ishii & Nagasaka, 2001).

رابطهٔ (۳)

$$\text{درصد پایداری لیپوزوم} = \left(\frac{A}{B}\right) \times ۱۰۰$$

در رابطهٔ (۳)، A: کارآمدی به‌دام‌اندازی در روز مورد نظر و B: کارآمدی به‌دام‌اندازی در روز اول است.

اندازه‌گیری pH

برای اندازه‌گیری pH از دستگاه pHمتر دیجیتالی کالیبره‌شده با بافر تجاری ۴ و ۷ استفاده شد، الکترود pHمتر در داخل نمونه‌های دوغ قرار گرفت و pH خوانده شد (Ghasempour *et al*., 2012).

میزان دوفازشدن

برای اندازه‌گیری میزان دوفازشدن نمونه‌های دوغ درون بطری‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که با استفاده از استوانهٔ مدرج ۲۵ میلی‌لیتری درجه‌بندی شده بود،

[1] Folin–Ciocalteu reagent
[2] Amicon filter

ریخته و بطری‌ها برای جلوگیری از تبخیر نمونه‌ها دربندی گردیدند و تا فرارسیدن روز ۳۰ام در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (Koksoy & Kilic, 2004).

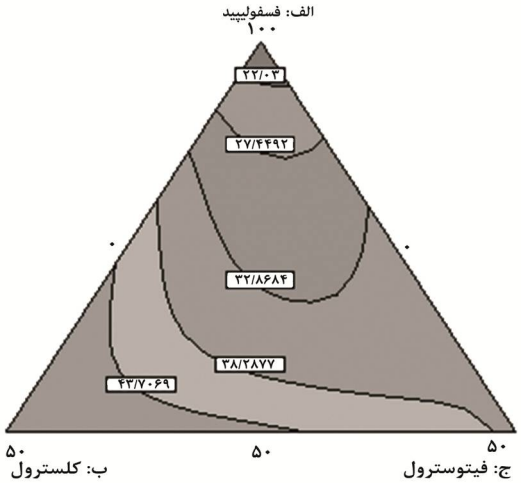
آنالیز آماری

در این مطالعه از نرم‌افزار Design-Expert v7.1 برای طراحی آزمایش‌ها، آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها استفاده گردید و از طرح ترکیبی برای مطالعهٔ ۳ متغیر فرمولاسیون لیپوزوم (فسفولیپید، کلسترول و بتاسیتوسترول) در ۵ سطح (فسفولیپید در نسبت‌های ۵۰، ۵۸/۳، ۷۵، ۸۳/۳ و ۱۰۰ درصد و کلسترول و بتاسیتوسترول هر ۲ به‌طور مجزا به نسبت‌های صفر، ۸/۳، ۲۵، ۳۳/۳ و ۵۰ درصد در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها به‌صورتی‌که مجموع نسبت کل هر ۳ متغیر در ساختار فرمولاسیون برابر با ۱۰۰ درصد می‌گردید) و ۱ متغیر (غلظت عصارهٔ هستهٔ انگور) که در ۵ سطح (۱۰۰، ۳۲۵، ۵۵۰، ۷۷۵ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام) استفاده گردید و پس از گردآوری داده‌ها و آنالیز رگرسیون، معنی‌داربودن فاکتورها و برهم‌کنش‌های آنها با استفاده از توزیع فیشر[1] در سطح ۰/۰۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

پایداری لیپوزوم‌ها

باتوجه‌به شکل (۱) بیشترین پایداری در بین لیپوزوم‌ها مربوط به نمونهٔ حاوی بالاترین درصد کلسترول و کمترین میزان پایداری مربوط به نمونه‌های حاوی ۱۰۰ درصد فسفولیپید بود (۲۱/۴ درصد). البته با افزایش مقدار بتاسیتوسترول مقدار پایداری در بین نمونه‌ها نسبت به نمونه‌های حاوی ۱۰۰ درصد فسفولیپید بیشتر، ولی نسبت به کلسترول دارای پایداری کمتری بود. بااین‌حال در روز ۳۰ام با افزایش مقدار بتاسیتوسترول ابتدا مقدار پایداری کاهش ولی از ۲۵ درصد به بالا مقدار پایداری در بین نمونهٔ حاوی درصد بالاتر بتاسیتوسترول افزایش یافته بود. باتوجه‌به نتایج Laridi و همکاران (۲۰۰۳) با افزودن استرول‌ها پایداری لیپوزوم‌ها افزایش یافته بود که استرول‌ها به‌دلیل سفت‌ترکردن دیوارهٔ لیپوزوم‌ها از تخریب آنها جلوگیری می‌کنند.



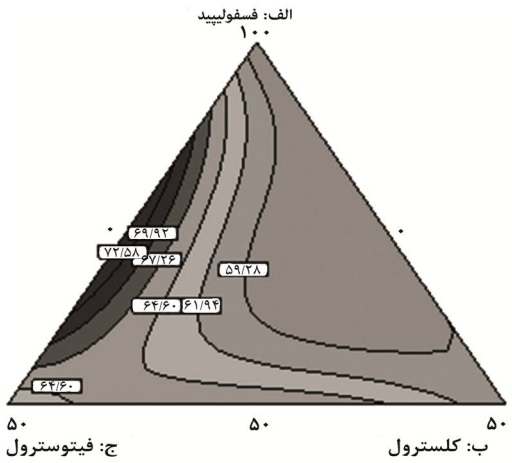
شکل ۱- تغییرات پایداری لیپوزوم‌ها در نسبت‌های متفاوت فرمولاسیون در روز ۳۰

کارآمدی به‌دام‌انداختن

میزان کارآمدی نانولیپوزوم‌ها در نمونه‌های حاوی ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام در شکل (۲) مورد بررسی قرار گرفت. باتوجه‌به شکل (۲) بیشترین میزان کارآمدی در بین نمونه‌ها مربوط به نمونه‌هایی بود که در فرمولاسیون آنها درصد کلسترول صفر یا نزدیک صفر بود (۷۳/۴ درصد). طبق نتایج با افزایش میزان بتاسیتوسترول در فرمولاسیون کارآمدی به‌دام‌انداختن در نانولیپوزوم‌ها بیشتر گردید. ولی با افزایش مقدار کلسترول میزان به‌دام‌اندازی در بین نمونه‌های حاوی کلسترول در فرمولاسیون به‌صورت کاملاً آشکار و معنی‌دار کاهش پیدا کرد ($P<0/05$).

باتوجه‌به تحقیق‌های Fang و همکاران (۲۰۱۳) و Varona و همکاران (۲۰۱۱) با افزودن میزان غلظت مادهٔ کپسوله‌شونده در فرمولاسیون کارآمدی به‌دام‌اندازی افزایش را نشان داده که در واقع با بیشتربودن غلظت مادهٔ مورد نظر در اطراف لیپوزوم‌ها شانس به‌دام‌انداختن ترکیبات در داخل لیپوزوم‌ها افزایش می‌یابد.

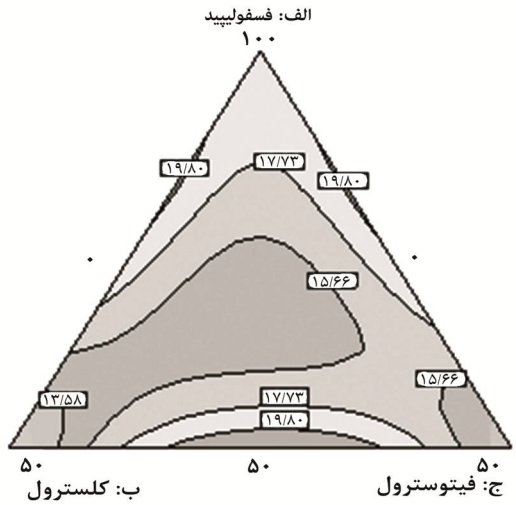
[1] F-distribution



شکل ۲- میزان کارآمدی نانولیپوزوم‌ها در نمونه‌های حاوی ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره در فرمولاسیون تولید

کنترل رهاسازی

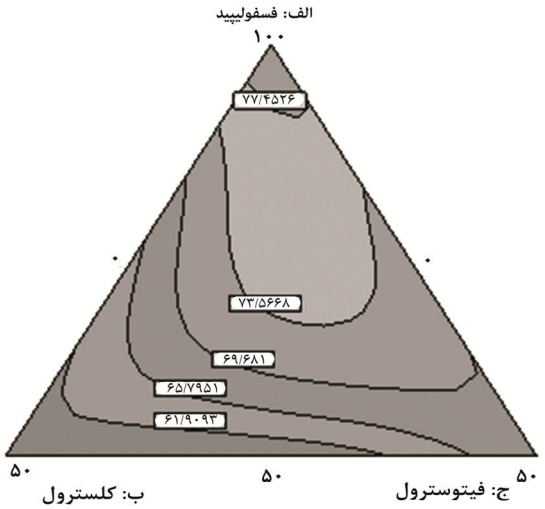
در شکل (۳) تغییرات میزان کنترل رهاسازی نانولیپوزوم‌ها در نسبت‌های متفاوت فسفولیپید و استرول‌ها در فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفته و باتوجه‌به شکل (۳) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در نمونه‌های حاوی تنها فسفولیپید، میزان رهاسازی عصاره بیشتر بوده و با افزایش کلسترول و بتاسیتوسترول در فرمولاسیون میزان رهاسازی کاهش پیدا کرد. نتایج Zalba و همکاران (۲۰۱۲) نشان می‌دهد که با افزودن استرول‌ها به فرمولاسیون لیپوزوم دیوارهٔ لیپوزوم‌ها از سیالیت کمتری نسبت به فرمولاسیون فاقد استرولی دارد که این عامل اثر معنی‌داری بر کُندشدن رهاسازی لیپوزوم‌ها می‌گذارد.



شکل ۳- تغییرات نسبت فسفولیپد و استرول‌ها بر میزان کنترل رهاسازی نانو لیپوزوم‌ها

دوفازشدن

شکل (۴) میزان دوفازشدن دوغ حاوی نانولیپوزوم با فرمولاسیون‌های مختلف را در روز ۳۰ام نشان می‌دهد. باتوجه‌به شکل (۴) می‌توان نتیجه گرفت که با گذشت زمان میزان دوفازشدن در تمامی نمونه‌ها افزایش پیدا کرده ولی در این بین، نمونه‌های حاوی کلسترول و بتاسیتوسترول میزان دوفازشدن را کاهش دادند، ولی بیشترین مقدار مربوط به نمونهٔ حاوی ۱۰۰ درصد فسفولیپید در فرمولاسیون لیپوزوم در روز ۳۰ام بود (۷۷/۵۲ درصد). میزان دوفازشدن در نمونه‌ها با افزایش درصد کلسترول و بتاسیتوسترول نسبت به افزایش درصد فسفولیپید کاهش بسیار محسوس و معنی‌داری را از خود نشان داد ($P<۰/۰۵$). باتوجه‌به اینکه دوفازشدن دوغ تحت تأثیر کاهش pH و نزدیک‌شدن آن به نقطهٔ ایزوالکتریک و رسوب پروتیئن‌های موجود دوغ رخ می‌دهد، ازاین‌رو باتوجه‌به نتایج حاصل از pH می‌توان انتظار داشت که با کاهش pH مقدار دوفازشدن بیشتر شود، ولی به‌دلیل اینکه ترکیبات میسل کازئینی موجود در دوغ و فراورده‌های لبنی با اسید چرب‌ها و گروه‌های عاملی موجود در استرول‌ها اتصالاتی برقرار کرده و ازسوی‌دیگر وجود نیروی دافعهٔ حاصله از بار در سطح لیپوزوم‌ها از رسوب سریع پروتئین‌های میسل کازئین در دوغ جلوگیری نموده و این عوامل می‌توانند در پایداری دوغ با فرمولاسیون متفاوت مؤثر واقع شوند.

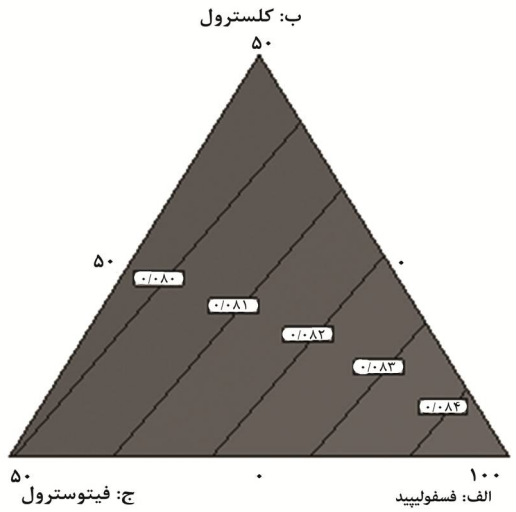


شکل -۴ میزان دوفازشدن دوغ حاوی نانولیپوزوم‌ها در روز ۳۰

اندازهٔ ذرات

نتایج شکل (۵) نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام با افزایش درصد کلسترول و بتاسیتوسترول نسبت به فسفولیپید مقدار سایز ذرات کاهش پیدا کرد، همچنین در تمامی غلظت‌ها با افزایش درصد کلسترول در فرمولاسیون سایز ذرات کاهش پیدا کردند. باتوجه‌به نتایج می‌توان فهمید که با افزایش غلظت عصارهٔ مورد استفاده میزان انحراف معیار اندازهٔ ذرات افزایش پیدا می‌کند.

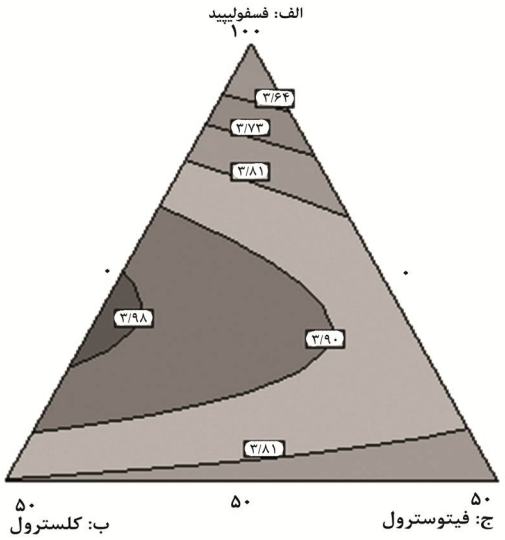
Hadian و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی اعلام کردند که در لیپوزوم‌ها چه خالی و چه حاوی مادهٔ فعال با گذشت زمان اندازهٔ لیپوزوم‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین Viriyaroj و همکاران (۲۰۰۹) در نتایج خود اعلام کردند که با افزودن کلسترول و ترکیبات استرولی اندازهٔ لیپوزوم‌ها کاهش می‌یابد.



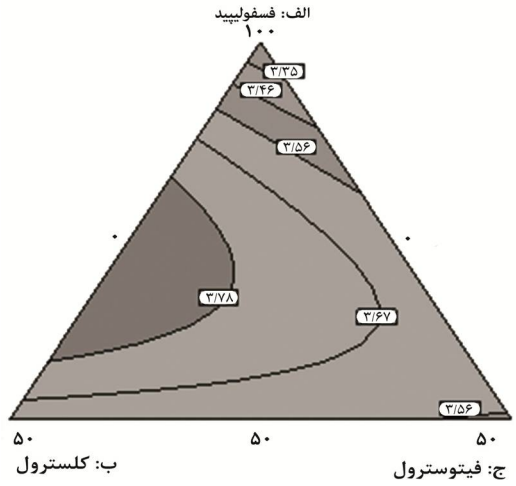
شکل ۵- تأثیر فرمولاسیون‌ها روی میانگین اندازهٔ لیپوزوم‌ها در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام

pH

در شکل (۶) و (۷) همان‌طورکه مشخص است، با گذشت زمان pH نمونه‌ها به‌طورکلی کاهش پیداکرده ولی در این بین متغیرهای اصلی که شامل مقادیر فسفولیپید، کلسترول و بتاسیتوسترول در فرمولاسیون کپسول‌ها بوده، مورد بررسی قرار گرفته شد. در روز اول آزمایش‌های pH در تمامی نمونه‌ها با افزایش درصد فسفولیپید در فرمولاسیون کاهش یافته ولی با افزایش درصد کلسترول و بتاسیتوسترول تا ۲۵ درصد افزایش ولی از ۲۵ درصد به بالا pH نمونه‌ها کاهش پیدا کرد. باتوجه‌به شکل (۶) در روز ۱۵ با افزایش فسفولیپید تا نزدیک ۷۵ درصد pH ابتدا افزایش (۳/۹) ولی با افزایش درصد فسفولیپید میزان pH کاهش پیدا کرد و همچنین تغییرات کلسترول نیز شبیه فسفولیپید بوده به‌طوری‌که تا ۲۵ درصد pH افزایش پیدا کرده و بعد از آن با کاهش pH روبه‌رو می‌شویم (۳/۹) ولی با افزایش درصد بتاسیتوسترول در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها، pH همهٔ نمونه‌ها کاهش پیدا کردند. باتوجه‌به شکل (۷) می‌توان گفت که بیشترین مقدار pH در روز ۳۰ در نمونه‌های فاقد بتاسیتوسترول دیده شد و کمترین حد pH مربوط به نمونه‌های حاوی لیپوزوم صددرصد فسفولیپیددار ایجاد شد. همچنین در نمونه‌هایی که مقدار کلسترول در آنها تا نزدیک ۲۵ درصد افزایش داشته مقدار pH ابتدا افزایش ولی با افزایش تا ۵۰ درصد مقدار pH کاهش پیدا کرد. باتوجه‌به نتایج دیوانی و صالحین (۱۳۹۲) افزودن ترکیبات فنلی به فراورده‌های لبنی باعث تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌شود که میزان pH را در نمونه‌ها کاهش می‌دهد. این نتیجه نیز با نتیجهٔ تحقیق حاضر مطابقت داشته و دلیل pH پایین فرمولاسیون بدون استرول‌ها به‌دلیل رهایش سریع و ناپایداری لیپوزوم‌ها می‌باشد.



شکل ۶- تغییرات pH در نمونه‌های دوغ حاوی لیپوزوم در روز ۱۵



شکل ۷- تغییرات pH در نمونه‌های دوغ حاوی لیپوزوم در روز ۳۰

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش، تأثیر مثبت جایگزینی کلسترول با بتاسیتوسترول در پارامترهای اندازه‌گیری‌شده مانند کارآمدی به‌دام‌انداختن، کنترل رهاسازی، پایداری لیپوزوم تولیدی و اندازهٔ ذرات معنی‌دار بود. ازسویی میزان غلظت عصارهٔ مصرفی در لیپوزوم‌ها به‌عنوان هستهٔ اصلی کپسول نقش مثبتی در میزان کارآمدی به‌دام‌انداختن داشت، ولی ازسوی‌دیگر تأثیر منفی روی اندازهٔ ذرات لیپوزوم‌های تولیدی به‌جاگذاشت. همچنین کاربرد این تکنولوژی در فراورده‌های لبنی ازجمله دوغ به‌دلیل تأثیر مثبت در پایداری فیزیکی و کاهش میزان دوفازشدن و جلوگیری از کاهش زیاد pH در نمونه‌های دوغ حاوی لیپوزوم در طول گذشت زمان ثبت گردید و اثرات مفید ترکیبات فنلی می‌تواند در بازارپسندی این محصول نتیجهٔ مثبتی داشته باشد.

منابع

۱- ابراهیم‌زادگان، س.، زمردی، ش.، حجت‌الاسلامی، م. و خسروشاهی اصل، ا. ۱۳۹۲. ماندگاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس (B۹۴ -LAFTI) آزاد و کپسوله‌شده و تأثیر آن بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی دوغ ایرانی. مجلّه ی نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۵(۴):۱۰۵-۱۱۴.

۲- اسمعیل‌زاده، ف.، حاتمی، م.، فرهادی، خ. و فرناد، ن. ۱۳۹۲. تعیین و مقایسهٔ ترکیبات فنولی و خواص آنتی‌اکسیدانی عصار، تفاله، کنسانتره و شیرهٔ انگور سیاه سردشت آذربایجان غربی. دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی، ۱۰-۹ اردیبهشت ماه، قوچان.

۳- جمالی‌فر، ح.، شاهوردی، ا.ر.، صمدی، ن.، زاهری، ا. و فاضلی، م.ر. ۱۳۸۸. بقاء Escherichia coli O157:H7 در دوغ‌های صنعتی، سنتی و دوغ پروبیوتیکی حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*. مجله علمی زیست فناوری میکروبی، ۱(۲):۲۵-۲۹.

۴- حیدری، س.، سلحشوریان، الف.، رفیعی، ف. و حسینی، ف. ۱۳۸۶. فعالیت شبکه‌های اجتماعی درخصوص اطلاع خانواده‌ها از بیماری سرطان. نشریه فیض، ۱۲(۲): ۲۲-۱۵.

۵- دیوانی، ا. و صالحین، ا.۱۳۹۲. اثر ترکیبات پلی‌فنولیک در چای سبز بر رشد میکروبی و خواص آنتی‌اکسیدان ماست. بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۹-۷ آبان ماه، شیراز.

۶- سالاری، ا.، حبیبی نجفی، م. و فرهوش، ر. ۱۳۸۸. استخراج عصاره هسته انگور با سیستم های مختلف حلال و ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی وآنتی رادیکالی آن. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، ۲۶-۲۴ مهر ماه، مشهد.

۷- متانتی، م. و صرافی زاده، س. ۱۳۹۵. استرول‌های گیاهی و استاتین‌ها: رقبای درمانی. همایش علمی دانشجویان علوم تغذیه، ۸-۷ اردیبهشت ماه، تهران.

۸- فروغی‌نیا، س.، عباسی، س. و حمیدی اصفهانی، ز.۱۳۸۶. تأثیر افزودن تکی و ترکیبی صمغ‌های کتیرا، ثعلب و گوار در پایدارسازی دوغ. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۲(۲): ۱۵-۲۵.

۹- وثوق، ا.ص.، خمیری، م.، کاشانی‌نژاد، م. و جعفری، س.م. ۱۳۸۷. اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری‌های پروبایوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۶(۱): ۸۵-۹۴.

10- Desai, K.G.H., & Jin-Park, H. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Drying technology, 23(7):1361-1394.

11- Fang, J.J., Guan, R.F., Ma, J.Q., Rui, C., Shen, H.T., & Zhang, J.J. 2013. Optimization of Fabrication Parameters to Prepare Tea Catechin-Loaded Liposomes by Fuzzy Orthogonality. In Key Engineering Materials Trans Technology Publications, 531:458-464

12- FAO Production Year Book. 2005. FAO statistics no. 51. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome p: 43.

13- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., & Teissedre, P.L. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43:890-894.

14- Fatouros, D., Gortzi, O., Klepetsanis, P., Antimisiaris, S.G., Stuart, M.C., Brisson, A., & Ioannou, P.V. 2001. Preparation and properties of arsonolipid containing liposomes. Chemistry and Physics of Lipids, 109(1):75-89.

15- Ghasempour, Z., Alizadeh, M., & Bari, M.R. 2012. Optimization of probiotic yoghurt production containing Zedo gum. International Journal of Dairy Technology, 65(1):118-125.

16- Hadian, Z., Moghimi, H.R., Sahari, M.A., & Barzegar, M. 2015. Preparation of nanoliposomes containing vitamin e as carriers for dha and epa and evaluation of their physical stability. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 9(4):63-76.

17- Ishii, F., & Nagasaka, Y. 2001. Simple and convenient method for estimation marker entrapped in liposomes. Dispersion Science Technology 22(1):97-101.

18- Jayaprakasha, G.K., Selvi, T., & Sakariah, K.K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts. Food Research International, 36(2):117-122.

19- Jayaprakasha, G.K., & Rao, L.J .2000. Phenolic constituents from the lichen parmotrema stuppeum (Nyl.) hale and their antioxidant activity. Zeitschrift für Naturforschung C, 55(11-12):1018-1022.

20- Kamyshny, A., & Magdassi, S. 2006. Microencapsulation. In, Encyclopedia of Surface and Colloid Science. Somasundaran, P, ed. Taylor & Francis, CRC Press. 3957-3969.

21- Keller, B.C. 2001. Liposomes in nutrition. Trends in Food Science & Technology, 12(1): 25-31.

22- Koksal, E., & Gulcin, İ. 2008. Antioxidant activity of cauliflower (*brassica oleracea* L.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32(1):65-78.

23- Koksoy, A., & Kilic, M. 2004. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. Food Hydrocolloid, 18(4):593-600.

24- Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuillemard, J.C., Lacroix, C., & Fliss, L. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. International Dairy Journal, 13(4):325-333

25- Madavi, D.L., & Salunkhe, D.K. 1995. Toxicological aspects of food antioxidants. In Madavi, D.L., Deshpande, S.S., & Salunkhe, D.K. (Eds.), Food antioxidants. pp: 267. New York: Marcel Dekker Inc.

26- Nakamura, A., Yoshida, R., Maedab, H., & Corrediga, M. 2006. The stabilizing behavior of soybean soluble polysaccharide and pectin in acidified milk beverages. International Dairy Journal, 16(4):361-369.

27- Revilla, E., & Ryan, J.M. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection without sample preparation. Journal of Chromatography A, 881(1):461-469.

28- Varona, S., Martín, Á., & Cocero, M.J. 2011. Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50(4):2088-2097.

29- Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. 2009. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. Pharmaceutical Development and Technology, 14(6):665-671.

30- Xia, S., & Xu, S. 2005. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. Food Research International, 38(3):289-296.

31- Zalba, S., Navarro, I., Trocóniz, I.F., de Ilarduya, C.T., & Garrido, M.J. 2012. Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: evaluation in vitro and in vivo. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 81(2):273-280.

Nano-Liposome of Grape Seed Extract with a New Formulation and its Application in the Dough

Mahsa Hamidi[1], Mir Khalil Pirozifard[2*], Mohamad Alizadeh Khaledabad[3], Hadi Almasi[4]

1- Ms.C Graduate of Food Science and Technology, Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Associate Professor of Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
* Corresponding author (mpirouzifard@yahoo.com)
3- Professor of Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4- Assistant Professor of Department of Food Industry, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Nanotechnology applications in food science include enrichment with bioactive substances such as vitamins and phenol compounds and increasing bioavailability of these substances to improve nutritional value of foodstuffs. This study investigated the effect of phospholipid (with 50-100% proportions), cholesterol and beta-sitosterol (each with 0-50% proportions) with seed extracts from black grapes (Vitis Vinifera) (in five levels: 100, 325, 550, 775 and 1000 ppm) on Nanoliposome production via new formulation to trap Vitis Vinifera in a statistical mixed-design. Nanoliposomes produced in doogh were also added to study their effects alongside phenol compounds on physical stability and chemical properties of doogh. The results of statistical data analysis in a meaningful level ($\alpha<0.05$) showed that decrease of consuming extracts and phospholipid to beta-sitosterol ratio resulted in the decrease of Nanoliposome ingredients sizes and phas seperation in doogh samples during the time; it also decreased extracts release from Nanoliposomes and made liposomes more stabled, so releasing decreased in 50:50 formulation and reached 7.9%. Replacing cholesterol with similar healthy substance (Considering results and destructive effects of it on health) would improve public health. Liposome could be an appropriate alternative with regard to positive competences of beta-sitosterol in new formulation.

Keywords: Black Grape Seed Extract, Dough, Cholesterol, New Formulation, Nano-Liposome