نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز به‌روش Thin film layer و ویژگی آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن

بهشاد نوعدوست[۱]، نگین نوری[۲*]، حسن گندمی نصرآبادی[۳]، افشین آخوندزاده بستی[٤]

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

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

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

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

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

(دریافت مقاله: ۹٤/٦/۲۱ پذیرش نهایی: ۹٤/۱۰/۱۳)

چکیده

استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله عصاره چای سبز در آماده‌سازی مواد غذایی و صنایع داروسازی محدود می‌باشد.کپسولاسیون مواد در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند به‌عنوان یک سیستم محافظتی از ترکیبات طبیعی در طی فرآوری و نگهداری آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم عصاره چای سبز و همچنین محتوای فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH و خاصیت ضدمیکروبی به روش چاهک بر علیه باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* 138 فاژتایپ ۲، *اشریشیا کولای* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسایتوژنز* تعیین شد. میانگین قطر نانولیپوزوم‌ها حدود ۱/۹ ± ٤٤/۷ نانومتر و شاخص پلی‌دیسپرسیتی ۰/۰۱٤± ۰/۲۰۳بود. بازده محصورسازی نانولیپوزوم چای سبز تحت شرایط بهینه ۹۷٪ به‌دست آمد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز به‌طور معنی‌داری پس از کپسوله کردن در نانولیپوزوم افزایش یافت ($P<0/05$). بیشترین فعالیت ضدمیکروبی نانولیپوزوم چای سبز مربوط به باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با منطقه مهار رشد ۱٦/۲ میلی‌متر بود، درحالی‌که باکتری *اشریشیا کولای* با هاله عدم رشد ۱٤ میلی‌متری مقاوم‌ترین باکتری شناسایی شد. علاوه‌بر این، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی چای سبز پس از کپسولاسیون در نانولیپوزوم به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P<0/05$). به‌طوری که میزان IC_{50} آن به ۱/۷۸میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش یافت. براساس یافته‌های این تحقیق می‌توان گفت که نانوکپسولاسیون به‌طور مؤثری تأثیرات مفید عصاره چای سبز از جمله خواص ضدمیکروبی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش می‌دهد. لذا جهت افزایش پایداری ترکیبات طبیعی در طی فرایندهای مختلف پیشنهاد می‌گردد.

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

مقدمه

امروزه، ترکیبات طبیعی به‌دلیل داشتن خواص مفید و نداشتن عوارض جانبی مواد شیمیایی مشابه، مورد توجه مصرف‌کنندگان قرارگرفته و به‌همان میزان، استفاده از این ترکیبات در صنایع غذایی به عنوان مواد ضدمیکروب، آنتی‌اکسیدان و نگهدارنده روبه افزایش است.

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

در سال‌های اخیر، چای سبز به‌دلیل خواص مفید آن از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی، جایگاه مناسبی در صنایع غذایی و دارویی به خود اختصاص داده است (Su *et al*., 2008; Zou *et al*., 2014). پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز، با دادن اتم هیدروژن، توانایی غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد، مختل کردن واکنش‌های زنجیره اکسیداسیون را داشته و کاهش اثرات مخرب اکسیداسیون دارند.

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

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

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

هدف از این مطالعه نانوکپسولاسیون عصاره چای سبز به روش فیلم نازک و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تهیه عصاره آبی چای سبز

برگ‌های چای سبز از مزارعی از استان گیلان در شمال ایران جمع‌آوری شد. عصاره آبی چای سبز با مخلوط کردن برگ‌های چای خرد شده در آب مقطر (۱ به ۱۰ وزنی/حجمی، ۱۰۰ درجه سلسیوس) تهیه شد و به مدت ۱۰ دقیقه همراه با هم‌زدن جوشانده و به‌وسیله فیلتراسیون ذرات جامد آن گرفته شد. عصاره حاصله در آون با حرارت ٦٠ درجه سلسیوس خشک گردید و در ٤ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده ذخیره شد (Molan *et al.*, 2009).

- تهیه نانولیپوزوم حاوی عصاره آبی چای سبز:

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

- خواص فیزیکی- شیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی

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

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

$$\text{محصورسازی} \frac{(\text{عصاره آزاد شده}) - (\text{مقدار کل عصاره})}{(\text{مقدار کل عصاره})} = ٪۱۰۰$$

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

- ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

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

مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی (غلظت‌های مختلف) به ۵ میکرولیتر محلول DPPH (محلول متانولی ۰/۰۰٤٪) اضافه شد. بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب آن در مقابل متانول خالص در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد و در آخر درصد مهار رادیکال نمونه بر طبق فرمول ذکر شده محاسبه گردید.

$$I\% = (A_{blank} - A_{sample}/A_{blank}) \times 100$$

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

- محتوای فنولی کل

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

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

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

- ارزیابی عملکرد ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی به‌وسیله روش چاهک بر طبق روش (NCCLS, 1999) انجام شد. این آزمایش بر روی ٤ میکروارگانیسم بیماری‌زا مطرح در مواد غذایی انجام گردید: *باسیلوس سرئوس* (ATCC, 11778)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* ۱۳۸ فاژتایپ ۲، *اشریشیا کولای* $O_{157}:H_7$ و *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATCC19118).

همه میکروارگانیسم‌ها به محیط BHI (brain heart infusion broth) براث تلقیح شده و برای رسیدن به میزان 10^6 CFU/ml (colony- forming unit/milliliter) در محلول سالین رقیق شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از آن‌ها به‌صورت سطحی در پلیت‌های نوترینت آگار کشت داده شد. بعد از کشت، چاهک‌هایی (۸ میلی‌متری) در آگار ایجاد شده و این چاهک‌ها با ۷۰ میکرولیتر از ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی پر گردید. پلیت‌های آماده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. همه پلیت‌ها از نظر میزان عدم رشد در اطراف چاهک بررسی شد. این آزمایشات ۲ بار تکرار شده و نتایج (میلی‌متر ناحیه مهار رشد) به‌صورت میانگین اعلام گردید (Tepe *et al*., 2004)

- تجزیه وتحلیل آماری

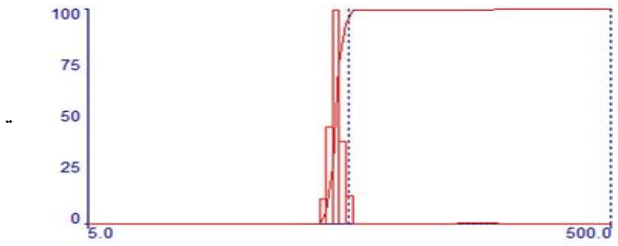
جهت آنالیز داده‌های حاصل از اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی از نرم‌افزار SPSS 19.0 استفاده گردید و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار با استفاده از تست یک‌طرفه ANOVA بیان شد. مقایسه بین داده‌های مختلف و اختلاف معنی‌دار آن‌ها، با استفاده از تست Tukey انجام شد ($P<۰/۰۵$).

یافته‌ها

- خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی

خصوصیات و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و بازده کپسولاسیون مورد ارزیابی انجام گرفت. در شکل شماره (۱) مورفولوژی (ا-الف) و اندازه نانولیپوزوم (۱- ب) عصاره چای سبز، توسط میکروسکوپ الکترونی و DLS نشان داده شده است که لیپوزومهای بدست آمده، وزیکول‌هایی با اشکال کروی هستند که پراکندگی مناسبی دارند. میانگین قطر ذرات ٤٤/٧ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۲۰۳ ±۰/۰۱٤ می‌باشد. پتانسیل زتا ۱۲- میلی‌ولت و بازده نانوکپسولاسیون ۹۷ ٪ می‌باشد.

(الف)



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

(ب)

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

- عملکرد آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی براساس میزان مهار DPPH و با اصطلاح IC۵۰ در جدول (۱) آمده است. مقدار IC ۵۰ عصاره چای سبز آزاد برابر با ۰/٦ ± ۱۲/٤۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چای سبز به‌طور معنی‌داری بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم افزایش یافت، به‌طوری‌که IC ۵۰ عصاره چای سبز نانولیپوزومی به ۰/۳ ± ۱/۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت.

- محتوای فنولی‌کل

در این مطالعه، محتوای فنولی کل عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی ارزیابی شد. همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است، محتوای فنولی کل در عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی، به‌ترتیب ۱/۵ ± ۲۹/٦۵ و ۳/۸٤ ±۸۸/۸٦ میلی‌گرم اسیدگالیک در هر گرم عصاره بود.

جدول (۱)- میانگین محتوای فنولی کل (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم عصاره) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH (میزان IC50 برحسب میکروگرم/ میلی‌لیتر) عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

نمونه	محتوی فنولی کامل	IC50
عصاره چای سبز آزاد	^{a}۲۹/٦۵ ± ۱/۵*	^{a}۱۲/٤۹ ± ۰/٦
عصاره چای سبز نانولیپوزومی	^{b}۸۸/۸٦ ± ۳/۸٤	^{b}۱/۷۸ ± ۰/۳

*انحراف معیار ± میانگین

^{a,b} حروف غیر مشابه در هر ستون بیانگر تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵).

- عملکرد ضدمیکروبی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی

فعالیت ضدمیکروبی ۱٪ عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی برعلیه ٤ باکتری پاتوژن مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج مربوطه در جدول (۲) گزارش شده است. عصاره چای سبز آزاد در مقابل همه باکتری‌های مورد آزمایش، نقش بازدارندگی از خود نشان‌داد. در بین باکتری‌ها *سالمونلا تیفی‌موریوم* منطقه عدم رشد بیشتری (۱۲/۳ میلی‌متر) در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشته، در حالی‌که *باسیلوس سرئوس* کمترین حساسیت را نشان داد. فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز بعد از کپسوله کردن در نانولیپوزوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین و قویترین فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز نانولیپوزومی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* با منطقه مهار رشد ۱٦/۲ میلی‌متری بود، در صورتی‌که اشریشیا *کلای* با منطقه عدم رشد ١٤ میلی‌متری، بیشترین مقاومت را داشته است.

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

گونه باکتری	منطقه بدون رشد	
	عصاره چای سبز آزاد	عصاره چای سبز نانولیپوزومی
لیستریا مونوسیتوژنز	۱۰/۹۲ ± ۰/۰۵	۱٦/۲ ± ۰/۰۱
باسیلوس سرئوس	۱۰/٦۱ ± ۰/۰۲	۱۵/٦ ± ۰/۰۳
سالمونلا تیفی موریوم	۱۲/۳ ± ۱/۳	۱۵/۷ ± ۰/۵
اشریشیا کولای O157: H7	۱۲/۱ ± ۰/۰۳	١٤ ± ۰/۹

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، خواص فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی عصاره چای سبز نانولیپوزومی مانند سایز ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و میزان محصورسازی ارزیابی شد. بر طبق نتایج منتج شده از روش DLS، وزیکول‌ها پراکندگی قابل قبولی داشتند و شاخص پراکندگی پایینی به‌دست آمد. در مطالعات پیشین که پلی‌فنول‌های چای سبز را با روش‌های مختلفی مانند هموژنیزه کردن با فشار بالا، روش فیلم نازک و ترکیب تزریق اتانل و فشار بالا نانوکپسوله کرده‌اند میانگین اندازه ذرات به‌دست آمده به‌ترتیب کمتر از ۱۰۰ (Gulseren and Corredig, 2013)، ١٦٠/٤ (Lu *et al.*, 2011) و ٦٦/٨ (Zou *et al.*, 2014) نانومتر بود. در حالی‌که در مطالعه حاضر قطر به‌دست آمده ٤٤/٧ نانومتر و ٤/٥ برابر کمتر از اندازه استاندارد ذرات نانو (۲۰۰ نانومتر) می‌باشد. احتمالاً این تفاوت در اندازه ذرات به میزان نیروی مکانیکی به‌کار رفته بستگی دارد که در صورت استفاده از نیروی بیشتر، ذرات کوچکتری حاصل می‌گردد. همچنین استفاده از اتانل می‌تواند باعث تغییر بار سیستم شده و درجه پایداری استری را تغییر دهد که منجر به کاهش سایز ذرات می‌شود (Heurtault *et al.*, 2003). بار سطحی و در نتیجه پایداری نانوذرات توسط پتانسیل زتا سنجیده می‌شود که یک پارامتر مهم در انعکاس خصوصیات فیزیکوشیمیایی و پایداری بیولوژیکی نانوذرات تولید

شده در سوسپانسیون می‌باشد. پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های چای سبز ۱۲/٦ - میلی ولت و به‌ترتیب بیشتر و کمتر از نتایج به‌دست آمده از مطالعات زو و همکاران و نیز لو و همکاران بوده که به‌ترتیب برابر با ٦/١٦ – و ٦٧/٢ – میلی‌ولت گزارش شده است (Lu *et al*., 2011 , Zou *et al*.,2014). علت تفاوت در پتانسیل زتا به نوع فسفولیپید و کلسترول به‌کار رفته در تولید نانولیپوزوم بستگی دارد، چون این دو ماده از ترکیبات اصلی نانولیپوزوم‌ها هستند. ثابت شده است که سوسپانسیون‌ها با پتانسیل زتای بیشتر، به‌دلیل دافعه بین ذرات باردار، پایدارتر بوده و بنابراین در برابر تمایلشان به تجمع مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند (Heurtault *et al*., 2003). همچنین در مطالعه‌ای مانسرویی و همکاران نشان دادند که لیپوزوم‌ها با بار منفی نسبت به بار مثبت قابلیت بهتری جهت حفظ مواد درونی خود دارند (Manosroi *et al*., 2002).

میزان محصورسازی یکی از فاکتورهای تعیین کننده در استفاده نانولیپوزوم‌ها در صنعت می‌باشد و عواملی مانند مواد دیواره، ساختمان کپسول و واکنش بین مواد موجود در دیواره و درون هسته تاثیر گذار می‌باشند. در این مطالعه میزان محصورسازی عصاره چای سبز نانولیپوزومی تولید شده در شرایط بهینه، ۹۷ درصد بوده که بالاتر از بازده ۷۸/۵ درصدی گزارش شده توسط زو و همکاران می‌باشد (Zou *et al*., 2014). فان و همکاران در سال ۲۰۰۸ نیز نشان دادند که فاکتورهای مختلفی مانند استفاده از مقادیر مناسب کلسترول و لیپید باعث افزایش میزان محصورسازی و نیز پایداری نانوذره‌ها می‌شود (Fan *et al*., 2008). به همین دلیل استفاده از روش فنگ و همکاران به دلیل داشتن بازده محصورسازی بالا یکی از بهترین روش‌ها جهت تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی می‌باشد (Fang *et al*., 2006). همچنین تحقیقات مختلف بیانگر این است که ترکیبات فنلی که از عوامل موثر در چای سبز می‌باشند با بازده بیشتری در لیپوزوم‌های دارای بار سطحی منفی محصور می‌گردند، زیرا در این حالت تراوایی غشاء نانولیپوزوم‌ها نسبت به حالتی که بار سطحی نانولیپوزوم‌ها مثبت یا خنثی باشد، حداقل است (Fang *et al*., 2006).

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

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

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

در این تحقیق فعالیت ضد میکربی عصاره چای سبز آزاد و نانولیپوزومی بر علیه گونه‌های بیماری‌زای چند باکتری مطرح در مواد غذایی آزمایش شد. خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سبز آزاد در مطالعات مختلفی بیان شده است (Hara, 1989, Yamamoto *et al*., 1997, Amarowicz *et al*., 2000). در مطالعات مختلف ناز و همکاران و نیز فان و همکاران بیان کردند که پلی‌فنول‌ها نقش مهمی در رسوب پروتئینی و ممانعت از فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها دارند (Naz *et al*., 2007, Fan *et al*., 2008). براساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش، فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. لیولیس و همکاران اظهار کردند که استفاده از نانولیپوزوم‌ها می‌تواند انتقال سلولی و رهاسازی ترکیبات فعال را درون سلول‌های باکتری بهبود بخشد (Liolios *et al*., 2009). این می‌تواند به دلیل واکنش بین نانولیپوزوم‌ها و سلول‌های باکتری باشد که از راه‌های مختلفی مانند نقل و انتقالات درون غشایی، رهایش تماسی، اتصال و الحاق، جذب و فاگوسیتوز انجام می‌گردد (Zou *et al*.,2014). اما از سویی زو و همکاران چنین بیان کرده‌اند که فعالیت ضدمیکربی مواد بیولوژیک توسط نانوکپسولاسیون به‌دلیل ممانعت از رهایش مواد اصلی از درون نانولیپوزوم‌ها، واکنش با پروتئین‌ها و تشکیل رسوب، کاهش می‌یابد (Zou *et al*., 2014).

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

منابع

- Amarowicz, R., Pegg, R. and Bautista, D. (2000). Antibacterial activity of green tea polyphenols against *Escherichia coli K* $_{12}$. Food/Nahrung, 44: 60-62.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L.M. and Ferreira, I.C. (2007). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 8766-8771.
- Burits, M. and Bucar, F. (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 323-328.
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M. and Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. LWT - Food Science and Technology, 44: 1908-1914.

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

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

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

Noudoost, B.[1], Noori, N. [2]*, Gandomi, H.[3], Akhondzadeh Basti, A.[4]

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

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

Abstract

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

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