

بررسی اثر ضد میکروبی نانوانکپسول های حاوی نایسین و ناتامایسین بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و آسپریژیلوس نایجر

محسن ضیایی^۱، محمود صوتی خیابانی^۲، سمیرا تیزچنگک^{۳*}، بابک قنبرزاده^۴،
حامد همیشه کار^۵، رضا رضایی مکرّم^۲

۱- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۲- دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳- دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۴- استاد گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۵- دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی و دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۹)

چکیده

نایسین و ناتامایسین به عنوان ماده ضد میکروبی در صنایع غذایی و دارویی کاربردهای متعددی دارند. در فرم آزاد، به دلیل واکنش با قند احیاء کننده و به طور غیر اختصاصی با باند شدن بر لیپیدها و پروتئین‌ها خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی آنها کاهش می‌یابد. برای غلبه بر این محدودیت، درون پوشانی نایسین و ناتامایسین با استفاده از لیپوزوم‌ها گزارش شده است. هدف این کار پژوهشی، بررسی اثر ضد میکروبی و ضد قارچی نانوانکپسول‌های حاوی نایسین و ناتامایسین بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس و آسپریژیلوس نایجر است. در این تحقیق، نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین و ناتامایسین به روش مظفری تولید شدند. سپس، اندازه ذرات، درصد انکپسولاسیون و خصوصیات ضد میکروبی و ضد قارچی نایسین و ناتامایسین به صورت آزاد و انکپسوله شده در دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات بترتیب در محدوده ۷۶ nm تا ۹۰ و ۰/۳۳ تا ۰/۹ و درصد درون پوشانی نایسین و ناتامایسین به ترتیب در محدوده ۸۵ تا ۹۲ درصد و ۸۹ تا ۹۶ درصد است و نتایج حاصل از فعالیت ضد میکروبی و قارچی نشان داد، استفاده از فرم انکپسوله شده مواد ضد میکروبی، استفاده از ترکیبی از باکتریوسین‌ها و دمای پایین نگهداری تاثیر بیشتری بر کاهش جمعیت میکروبی و قارچی داشته است. در این تحقیق نانولیپوزوم‌ها به طور موفقیت آمیزی با روش مظفری تولید شدند. این روش از نظر انکپسولاسیون نایسین و ناتامایسین و ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی و ضد قارچی روش مناسبی بوده است.

کلید واژگان: نایسین، ناتامایسین، نانولیپوزوم، اثر ضد میکروبی، روش حرارتی

*مسئول مکاتبات: stizchang@yahoo.com

۱- مقدمه

ایمنی مواد غذایی به یک نگرانی بین المللی تبدیل شده است و از طرفی، اکثر مصرف کنندگان تمایل به استفاده از غذاهایی با کیفیت بالا و عدم استفاده از نگهدارنده های شیمیایی و سنتزی در ترکیبات غذایی را دارند. یکی از روش های رسیدن به این اهداف، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله باکتریوسین ها^۱ می باشد [۱]. نایسین^۲ یکی از شناخته ترین و پرکاربردترین باکتریوسین ها است. نایسین از کشت های استارتر باکتری، لاکتوکوکوس لاکتیس در محصولات لبنی تولید می شود و دارای خصوصاتی از قبیل: آمفی فیلیک بودن، غیرسمی و بی ضرر بودن برای انسان، قابلیت نفوذ در غشاء باکتری ها و غیره می باشد [۴،۲۳]. نایسین با ایجاد شکاف در غشای سلولی باکتری های گرم مثبت باعث ترشح مواد سیئوپلاسمی به خارج و از بین رفتن آن ها می شود. این ترکیب دارای خاصیت ممانعت کنندگی از رشد، باکتری های گرم مثبت (پاتوژن ها و آلوده کننده های مواد غذایی)، میکروارگانیسم های مولد فساد و برخی از باکتری های گرم منفی (که دچار آسیب در غشا شده اند) همچنین قادر به جلوگیری از جوانه زنی اسپورها، می باشد. مطالعات نشان داده است که نایسین قادر به جلوگیری از رشد و تشکیل آندواسپورها در جنس های مختلف کلاستردیوم و باسیلوس است. همچنین از رشد گونه های لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس نیز جلوگیری می کند [۶ و ۵]. در تحقیقی که وری و همکاران [۷]، در مورد پایداری و تاثیرگذاری نایسین و لیزوزیم انکپسوله شده در لیپوزم های فسفولیپیدی در مقابل لیستریا منوسیتوژنز انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که نایسین انکپسوله شده در لیپوزم های ساخته شده از فسفاتیدیل کولین (۱۰۰٪) و فسفاتیدیل کولین- کلاسترو (۷۰٪ به ۳۰٪)، رشد باکتریایی را ۲ سیکل لگاریتمی در مقایسه با نایسین آزاد، بیشتر کاهش داده است. ناتامایسین^۳ از جمله، باکتریوسین های مهم دیگر است. این ترکیب، یک پلی ان می باشد و بر روی مخمرها و کپک ها کاملاً موثر بوده و حدود چندین سال است که در نوشیدنی ها و بعضی مواد غذایی خاص مانند پنیر، گوشت، آب میوه ها، محصولات نانوایی، ماست، شراب

و سوسیس به صورت افزودن مستقیم، اسپری کردن و غوطه وری استفاده می شود [۸]. هاندرودیمو و همکاران [۹]، اثر ناتامایسین را به عنوان عامل کنترل کننده رشد قارچی در طی تخمیر زیتون بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که وجود ناتامایسین در محلول نمکی، موجب کنترل رشد مخمرها می شود. استفاده از باکتریوسین ها به صورت آزاد به علت برهمکنش آن ها با ترکیبات مواد غذایی موجب کاهش قدرت ضد میکروبی آن ها شده و در نتیجه احتیاج به دوزهای بالایی از این ترکیبات می باشد. استفاده از نانولیپوزوم های حاوی ترکیبات ضد میکروبی، یک روش مناسبی است و می تواند مشکلات استفاده از ترکیبات ضد میکروبی به صورت مستقیم در مواد غذایی را کاهش دهند. لیپوزوم ها اجزاء کروی متشکل از لیپیدهای قطبی (مثل فسفاتیدیل کولین و یا فسفاتیدیل اتانول آمین) و یا مخلوطی از چربی های قطبی همراه با کلاسترو یا ارگسترو هستند [۱۰، ۱۱]. لیپوزوم ها به دلیل ساختار آمفی فیلیک خود، قادرند ترکیبات آب دوست را در فضای درونی و ترکیبات چربی دوست را در بین غشا لیپوفیلیک، نگهداری کنند [۱۲]. در پژوهشی که بنچ و همکاران بر روی پنیر چدار با تلقیح لیستریا ایناکوا با جمعیتی در حدود $10^6 - 10^9$ cfu/g و غلظت نایسین 300 IU/g به صورت آزاد و میکروکپسوله انجام دادند، پس از شش ماه نگهداری پنیر، فعالیت نایسین به فرم میکروکپسوله تا ۹۰٪ حفظ شده و جمعیت نهایی پس از شش ماه به 10 cfu/ml رسید همچنین در مدت ۲ ماه، کاهش جمعیت لیستریایی در مقیاس لگاریتمی برابر ۳ بود [۵]. با توجه به معایب استفاده از ترکیبات ضد میکروبی به صورت آزاد و همچنین به دلیل اینکه تاکنون از نایسین به همراه ناتامایسین در بررسی خصوصیات ضد میکروبی استفاده نشده است، در این تحقیق اثرات ضد میکروبی نایسین و ناتامایسین به صورت توأم و جداگانه، به دو فرم آزاد و نانولیپوزومی (تولید شده به روش مظفری) در دماهای مختلف نگهداری، مورد بررسی قرار می گیرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل: لسیتین (با نام تجاری، آلفا- لسیتین با درجه خلوص ۹۹٪ از شرکت Across،

2. Nisin
3. Natamycin

بافر فسفات (pH= ۵/۵) به آن اضافه شد سپس برای حل شده کامل نایسین، مخلوط روی همزن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) در دمای ۴۰°C قرار گرفت.

۳-۳- تهیه محلول ناتامایسین

جهت تهیه محلول ناتامایسین، ۱۰ میلی‌گرم ناتامایسین، ۳٪ گلیسرول (V/V) و ۳٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۷/۴) به آن اضافه شد سپس برای حل شدن کامل ناتامایسین، مخلوط روی همزن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) در دمای ۴۰°C قرار گرفت.

۳-۴- تهیه محلول مخلوطی از نایسین و

ناتامایسین

برای تهیه این محلول به ۵ میلی‌گرم نایسین و ۲/۵ میلی‌گرم ناتامایسین، ۳٪ گلیسرول (V/V) و ۳٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH= ۶) اضافه و سپس برای حل شدن کامل نایسین و ناتامایسین مخلوط، روی همزن مغناطیسی (۵۰۰ rpm) در دمای ۴۰°C قرار گرفت.

۳-۵- روش تهیه نانولیپوزوم‌ها

لسیتین هیدراته شده به محلول نایسین، ناتامایسین و یا مخلوطی از این دو، در بشر بافل‌دار ریخته شد و در بن ماری در دمای C ۶۰° به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm قرار گرفت سپس ۴۲ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH های ۵/۵، ۶ و ۷/۴ به ترتیب برای هر کدام از محلول‌های نایسین، ناتامایسین و مخلوط نایسین و ناتامایسین، اضافه شد و تا ۹۰ دقیقه زیر همزن باقی ماند. فرمولاسیون‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، سپس در دمای ۴°C نگهداری شدند [۱۳].

۴- روش‌های آزمون

۴-۱- تعیین اندازه ذرات

تعیین و توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه سنجش اندازه‌ی ذرات، انجام شد. اندازه نمونه‌های تهیه شده، بعد از یک ساعت نگهداری در دمای ۴°C و متوسط اندازه‌ی ذرات بر اساس قطر حجمی تعیین شد (معادله ۱). تمامی نمونه‌ها در سه تکرار اندازه گیری شدند [۱۵].

آمریکا)، پلی اتیلن گلیکول (Merck، آلمان)، نایسین (Myasan، ترکیه)، ناتامایسین (DSM، دانمارک)، گلیسرول (با درجه خلوص بالاتر از ۹۹٪، شرکت Merck، آلمان)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (Merck، آلمان)، اسید فسفریک (Merck، آلمان) و محیط کشت‌های نوترینت برات و مانیتول سالت آگار (جهت شمارش باکتریایی)، محیط کشت‌های ساپروودگستروز برات و ساپروودگستروز آگار (جهت شمارش قارچ)، (شرکت Merck، آلمان).

۲-۲- دستگاه‌ها و تجهیزات مورد استفاده

دستگاه اندازه گیری اندازه ذرات (مدل Sald-2010، ساخت شرکت Shimadzu، ژاپن)، دستگاه همزن برقی (مدل Rer، ساخت شرکت Ika، آلمان)، دستگاه سانتریفوژ (مدل Avanti ۳۰، ساخت شرکت Beckman، آمریکا)، دستگاه اتوآنالیزر Labsoc (مدل D-۶۳۶۰، ساخت شرکت Beckman، آمریکا)، دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec ۲۰۰، ساخت شرکت Pharmacia Biotech، انگلیس)، دستگاه اندازه‌گیری پتانسیل زتا (مدل Nano-Zs، ساخت شرکت Malvem، انگلیس)، لام نئوبار (ساخت شرکت HBG، آلمان) و آمیکون (فالکون فیلتردار) (Millipore، آلمان).

۳- روش‌ها

۳-۱- آماده سازی فسفاتیدل کولین

غلظت لیپید مورد نیاز جهت تولید لیپوزوم‌ها، با توجه به تحقیقات که تیزچنگ و همکاران [۱۳]، در بهینه سازی اندازه ذرات و تاثیر متغیرهای مستقل، غلظت فسفولپید، سرعت همزن و زمان فرآیند بر روی اندازه ذرات انجام دادند، ۳۰ میلی مولار انتخاب شد. در این تحقیق، ابتدا ۳۰ میلی مولار لسیتین با وزن ملکولی ۷۵۰g/mol، معادل ۱/۱۲۵ گرم، با ترازوی حساس توزین شد سپس ۴ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد و در شیکرانکوباتور به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷°C با دور ۷۰rpm قرار داده شد [۱۴].

۳-۲- تهیه محلول نایسین

جهت تهیه محلول نایسین، ابتدا ۱۰ میلی گرم نایسین، ۳٪ گلیسرول (V/V) و ۳٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ۵ میلی‌لیتر

۴-۳- آزمون های میکروبی

۴-۳-۱- بررسی تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومی و مخلوط آنها (نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی شده) بر

جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دماهای مختلف

برای انجام آزمون باکتریایی از باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با رقت 10^8 به ازای هر میلی لیتر و از محیط کشت، نوترینت براث استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت نوترینت براث با باکتری مورد نظر تلقیح و سپس مواد ضد میکروبی به صورت آزاد و لیپوزومی به آن اضافه شد. نایسین و ناتامایسین در غلظت های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰ ppm) به محیط کشت تلقیح شد سپس تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی، مخلوط نسبت ۱ به ۱ نایسین و ناتامایسین لیپوزوم شده بر جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در زمان و دماهای مختلف بررسی گردید. بدین منظور در زمان های ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز و دماهای نگهداری 8°C و 25°C ، نمونه های تلقیح شده و نمونه شاهد بر روی محیط کشت مانیتول سالت آگار به روش کشت عمقی، کشت انجام شد و هر هفته رشد استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۳-۲- بررسی تاثیر ناتامایسین آزاد و لیپوزومی و مخلوط آنها (نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی شده) بر

جمعیت اسپرژیلوس نایجر در دماهای مختلف

برای انجام این مرحله از اسپرژیلوس نایجر با رقت 10^8 به ازای هر میلی لیتر و محیط کشت سابرو دکستروز براث استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت مورد نظر با سوسپانسیون اسپور اسپرژیلوس نایجر با رقت 10^8 اسپور به ازای میلی لیتر، تلقیح شد سپس ناتامایسین آزاد و لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی با غلظت های مختلف (۲۰، ۱۰، ۵) اضافه گردید و تاثیر ناتامایسین آزاد و لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی و مخلوط نسبت ۱ به ۱ نایسین و ناتامایسین لیپوزوم شده بر جمعیت اسپرژیلوس نایجر در زمان و دماهای مختلف بررسی گردید. بدین منظور در زمان های ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز و دماهای نگهداری 8°C و 25°C ، نمونه های تلقیح شده و نمونه شاهد بر روی محیط کشت سابرو دکستروز

معادله (۱)

$$\bar{D}[\tau, \tau] = \frac{\sum n_i d_i^{\tau}}{\sum n_i d_i^{\tau}}$$

d_i : قطر ذرات، $[\bar{D}^3]$ و $[\bar{D}^4]$: میانگین قطر حجمی (میانگین حجم

معادل) یا DeBroukere mean

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [۱۶].

معادله (۲)

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

۴-۲- درصد انکپسولاسیون

جهت اندازه گیری میزان نایسین، ناتامایسین و مخلوط نایسین و ناتامایسین، محصور شده در فرمولاسیون لیپوزومی، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۰۵ نانومتر برای سنجش ناتامایسین و برای سنجش نایسین از دستگاه اتوآنالیزر استفاده شد (اساس آزمایش به این صورت است که، پروتئین ها در حضور پیروگالول رد^۴ و مولیبدات^۵ تشکیل کمپلکس قرمز رنگ می دهند و رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اتوآنالیزر قابل اندازه گیری است [۱۷ و ۱۳]. از آنجایی که نایسین در دستگاه اسپکتروفتومتر جذب ندارد و ناتامایسین در دستگاه اتوآنالیزر قابل تشخیص نیست، بنابراین به راحتی می توان میزان انکپسولاسیون را برای مخلوط نایسین و ناتامایسین محاسبه کرد. برای این منظور ابتدا فرمولاسیون لیپوزوم در آمیکون (فالكون فیلتردار) ریخته و با استفاده از سانتیفیوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، فاز حاوی مواد کپسوله شده در لیپوزوم ها از مایع شفاف که حاوی مواد غیر کپسوله شده بود، جدا شد سپس میزان انکپسولاسیون نایسین و ناتامایسین به ترتیب توسط دستگاه های اتوآنالیزر و اسپکتروفتومتر محاسبه شد و درصد انکپسولاسیون نیز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

معادله (۳)

$$\text{درصد} = \frac{\text{مقدار نایسین و ناتامایسین درون پوشانی شده در لیپوزوم}}{\text{مقدار کل نایسین و ناتامایسین اضافه شده}} \times 100$$

4. pyrogallol red
5. molybdate

۶-۱- تعیین اندازه ذرات

نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیون‌های مختلف در جدول (۱) آورده شده است. نتایج نشان داد، تاثیر افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (نمونه ۲)، پلی اتیلن گلیکول به همراه نایسین (نمونه ۳) و پلی اتیلن گلیکول به همراه ناتامایسین (نمونه ۴) نسبت به فرمولاسیون فسفاتیدیل خالص (نمونه ۱) از نظر اندازه ذرات، معنی‌دار است ($P < 0/05$) و با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (نمونه ۲)، اندازه ذرات افزایش یافته و سپس اندازه ذرات با افزودن نایسین و ناتامایسین کاهش یافته‌است. همچنین با توجه به جدول (۱)، توزیع اندازه ذرات (شاخص اسپن)، در فرمولاسیون‌های ۱ تا ۵، تفاوت معنی‌داری نداشته است ($P < 0/05$)

اگر به روش کشت سطحی، کشت انجام شد و هر هفته رشد آسپرژیلوس نایجر بر روی محیط کشت، مورد بررسی قرار گرفت.

۵- طرح آماری

آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی، انجام شد. نرم افزار آماری (SPSS (16) در سطح احتمال ۹۵٪ ($P < 0/05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها، استفاده شد.

۶- یافته‌ها

جدول ۱ نتایج مربوط به اندازه‌گیری اندازه ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیون‌های مختلف

نمونه	شاخص اسپن	میانگین قطر حجمی (mm) \pm انحراف معیار
۱- فسفاتیدیل کولین خالص	$0/73 \pm 0/022^a$	$76 \pm 2/8^a$
۲- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول	$0/78 \pm 0/095^a$	$90 \pm 3/3^b$
۳- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و نایسین	$0/87 \pm 0/083^a$	86 ± 4^c
۴- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و ناتامایسین	$0/86 \pm 0/086^a$	$85 \pm 3/8^c$
۵- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و مخلوط نایسین و ناتامایسین	$0/9 \pm 0/051^a$	$81 \pm 2/3^d$

۶-۲- راندمان انکپسولاسیون

در این تحقیق کارایی انکسپولاسیون برای نایسین حدود ۹۲-۸۵٪، برای ناتامایسین حدود ۹۶-۸۹٪ و برای مخلوط آنها حدود ۸۹-۸۵٪ تعیین شد. در این تحقیق از پلی اتیلن گلیکول و گلیسرول به جای کلسترول، جهت انعطاف پذیری دیواره نانولیپوزوم‌ها، افزایش اندازه ذرات و پایداری سیستم لیپوزومی استفاده شد.

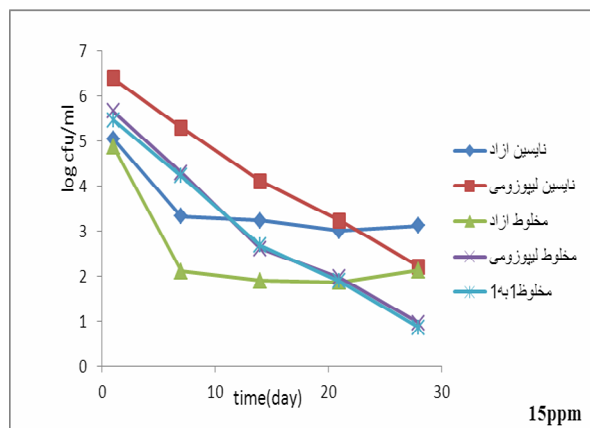
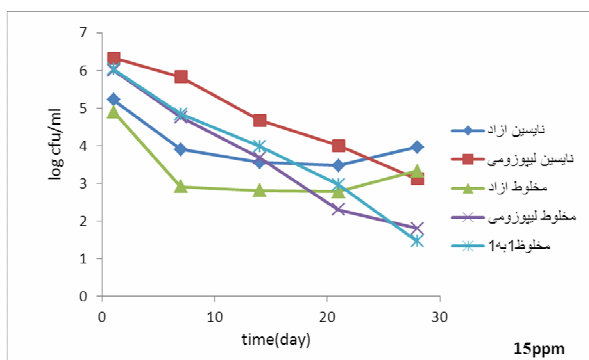
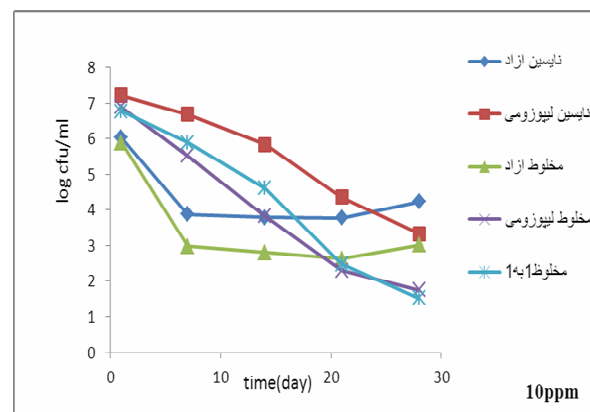
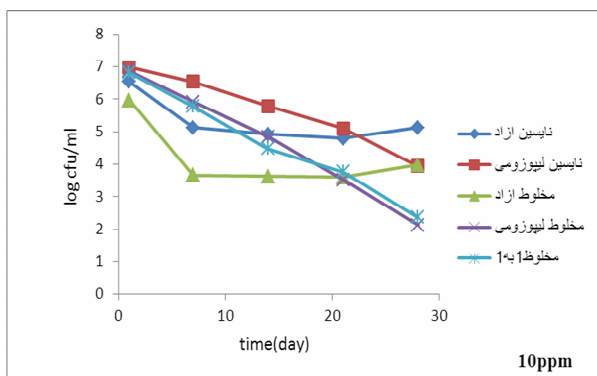
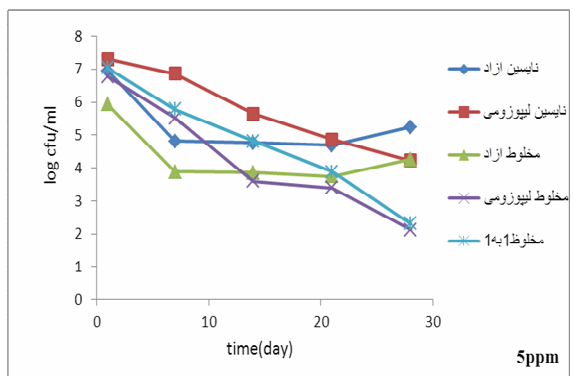
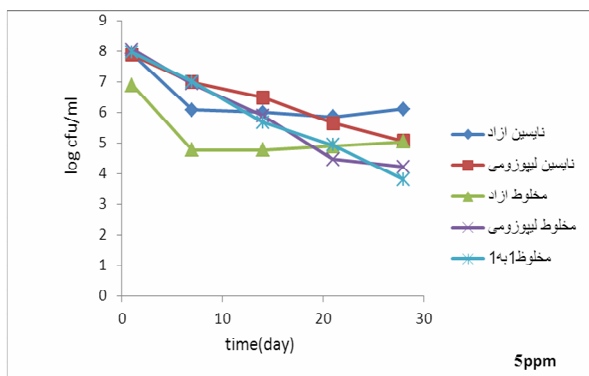
۶-۳- آزمون های میکروبی

نتایج حاصل از تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومی و همچنین مخلوط آنها (نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی شده) بر جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دماهای مختلف

در شکل (۱) و (۲) تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دمای 8°C و 25°C در مدت ۲۸ روز نشان داده شده است. با توجه به شکل (۱) و (۲)

می‌توان نتیجه گرفت که در همه فرمولاسیون‌ها کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی در همه سطوح ppm ۵، ۱۰ و ۱۵ مشاهده می‌شود. در نمونه های حاوی نایسین آزاد و مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد در زمان صفر کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی مشاهده شد ولی این کاهش در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ تقریباً ثابت بوده و حتی در روز ۲۸ اندکی افزایش در شمارش باکتریایی مشاهده شد. در نمونه‌های حاوی نایسین لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین لیپوزومی و مخلوط با نسبت ۱ به ۱ نایسین و ناتامایسین در زمان صفر، کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی مشاهده نشده است ولی با گذشت زمان، کاهش تدریجی در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مشاهده شد و هر هفته شمارش باکتریایی نسبت به هفته قبل کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد. این کاهش به طور مداوم در همه روزهای نگهداری مشاهده شد. همچنین در فرمولاسیون‌هایی که در آنها از مخلوط نایسین و ناتامایسین استفاده شده است، نسبت به

فرمولاسیون های که فقط حاوی نایسین هستند، شمارش باکتریایی به طور چشمگیری پایین تر است.



شکل ۲ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت

استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۲۵ °C در غلظت های مختلف

۶-۴- نتایج حاصل از تاثیر ناتامایسین آزاد و

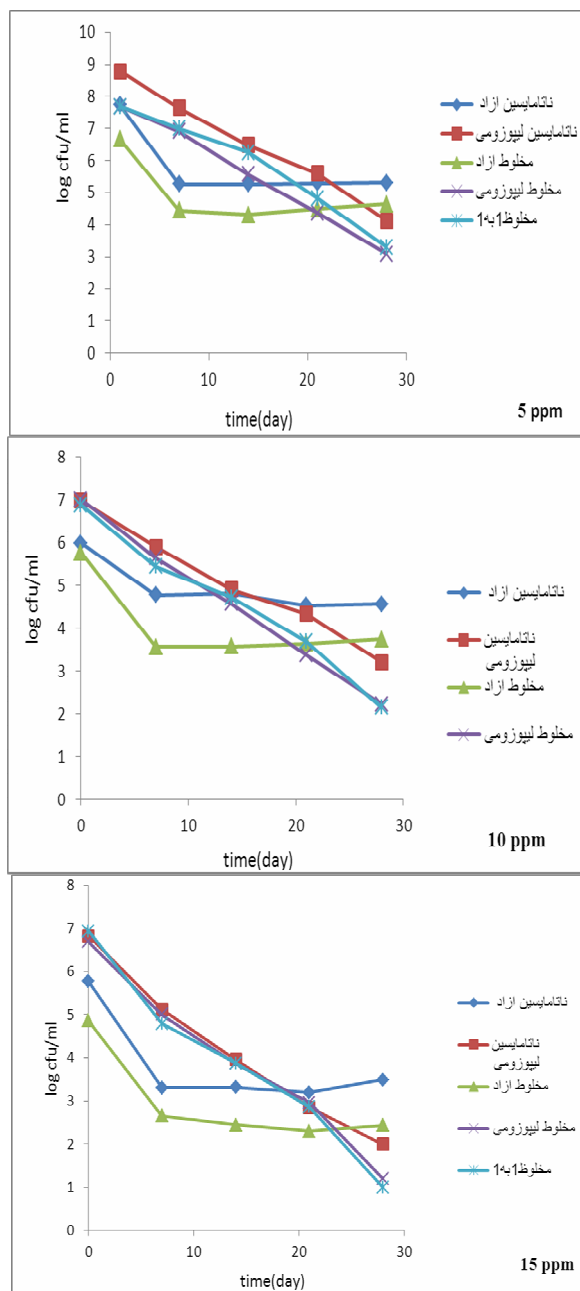
لیپوزومی و همچنین مخلوط آنها بر جمعیت

آسپرژیلوس نایجر در دماهای مختلف

در شکل (۳) و (۴) تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت آسپرژیلوس نایجر در دمای ۸ °C در مدت ۲۸ روز نشان داده شده است.

شکل ۱ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت

استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۸ °C در غلظت های مختلف



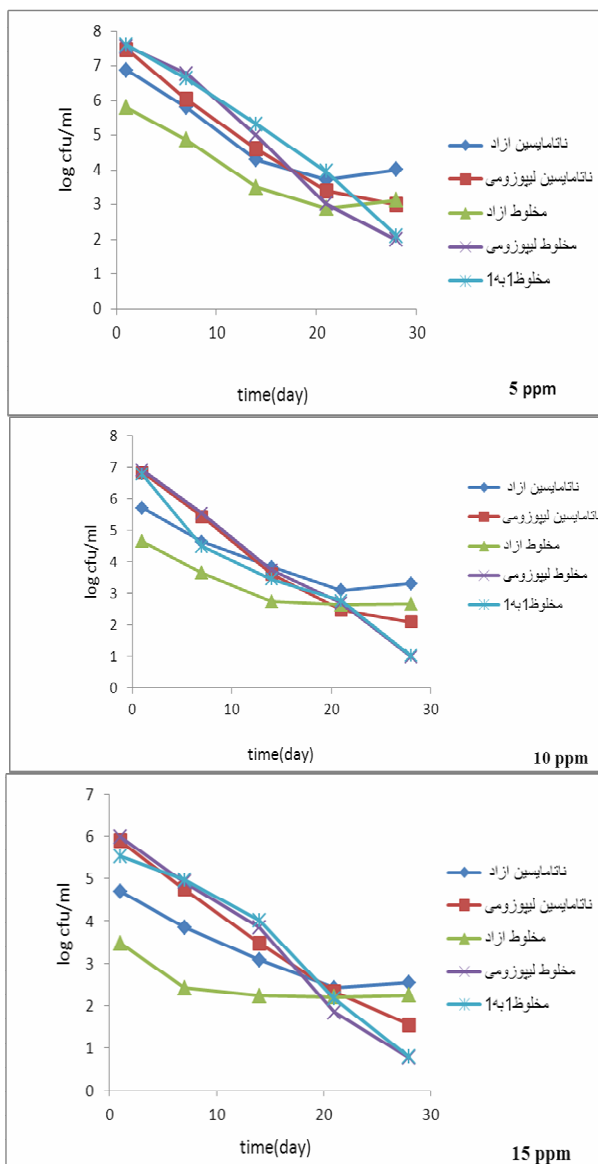
شکل ۴ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت اسپرژیلوس نایجر در دمای ۲۵°C

۷- بحث

۷-۱- تعیین اندازه ذرات

با توجه به نتایج درج شده در جدول (۱) تمامی فرمولاسیون ها اندازه ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر داشتند. همچنین با افزوده شدن پلی اتیلن گلیکول (موجب انعطاف پذیری در ساختار لیپوزوم ها و

با توجه به شکل (۳) و (۴) می توان نتیجه گرفت که در همه فرمولاسیون ها کاهش چشمگیری در شمارش قارچ در همه سطوح ۵، ۱۰ و ۱۵ ppm مشاهده می شود. در نمونه های حاوی ناتامایسین آزاد و مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد در زمان صفر کاهش چشمگیری در شمارش قارچی مشاهده شد. ولی این کاهش در روز های ۷، ۱۴ و ۲۱ تقریباً ثابت بوده و حتی در روز ۲۸ اندکی افزایش در شمارش قارچی مشاهده شد.



شکل ۳ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت اسپرژیلوس نایجر در دمای ۸°C

باعث کاهش اندازه ذرات می شود. با توجه به ساختار آب گریز نایسین و ناتامایسین اندازه ذرات تدریجا کاهش می یابد که این امر باعث کاهش در راندمان انکپسولاسیون می شود. ولی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول به علت افزایش اندازه و انعطاف پذیری دیواره نانو لیپوزومها، راندمان انکپسولاسیون به طور چشمگیری افزایش می یابد [۲۱]. با توجه به تحقیقی که توسط هوآنگ و همکاران، [۲۲] انجام شد، غلظت لسیتین نیز عامل مهمی در میزان راندمان انکپسولاسیون است که با نتایج این تحقیق (۳۰ میلی مولار لسیتین) مطابقت دارد.

۷-۳- نتایج حاصل از تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومی و همچنین مخلوط آنها بر جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس و آسپرژیلوس نایجر در دماهای مختلف

استفاده از نایسین و ناتامایسین به صورت آزاد به دلیل واکنش با اجزای محیط و با باند شدن بر لپیدها و پروتئینها، خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی را کاهش می دهد [۲۳]. نتایج بدست آمده با نتایج، زایر زاده و همکاران [۵] مطابقت داشت. این محققان در بررسی اثر ضد باکتریایی نایسین به دو فرم آزاد و انکپسوله در لیپوزوم، بر ماندگاری و کاهش جمعیت لیستریایی پنیر، به این نتیجه رسیدند که اختلاف معنی داری بین عملکرد نایسین آزاد و محصور در نانوکپسول های لیپوزومی بر روند کاهش جمعیت لیستریایی وجود دارد. همچنین در تیمار نایسین آزاد، جمعیت لیستریایی طی ۲ ساعت اولیه پس از تلقیح، به شدت کاهش یافته و پس از آن نسبتا ثابت مانده است. در تیمار لیپوزومی نایسین، روند خطی کاهش مشاهده گردید، تفاوت آن با تیمار نایسین آزاد در نحوه روند کاهش بود، زیرا که در فرمول لیپوزومی یک روند کاهش به صورت خطی و مداوم بود. روند کاهش جمعیت لیستریایی در تیمار نایسین آزاد و فرمول لیپوزومی حاوی نایسین، مربوط به رهایش کنترل شده لیپوزومها در طی زمان می باشد همچنین نتایج به دست آمده توسط مهمید و همکاران [۲۴] با نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز مطابقت داشت. این محققان به بررسی اثر ناتامایسین بر روی باکتری های ایزوله شده از خاک های مختلف نشان داد، استفاده از ناتامایسین

ایجاد بافت نرم می شود) اندازه ذرات افزایش یافته و با افزوده شدن نایسین و ناتامایسین به علت داشتن عوامل آبگریز و قرارگیری بین دو لایه فسفولیپید، اندازه ذرات کاهش پیدا می کند. بر اساس تحقیقات محمد و همکاران [۱۸] نوع و چیدمان ماده فعال در ساختار لیپوزومها تاثیر بسزایی بر اندازه ذرات دارد به طوری که ماده فعال آبگریز با قرار گرفتن در سطح و بین ساختار دو لایه ای منجر به افزایش چگالی چیدمان فسفولیپیدی می شود آنها با اندازه گیری فشار سطحی مشاهده کردند که، مساحت موثر هر مولکول لسیتین به ازای قرار گرفتن ترکیب فعال کاهش می یابد، که این امر باعث کاهش اندازه ذرات می شود. با توجه به ساختار آب گریز نایسین و ناتامایسین اندازه ذرات باید کاهش یابد ولی با قرار گرفتن پلی اتیلن گلیکول در سطح، اندازه ذرات افزایش می یابد. که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. نتایج حاصل از شاخص اسپن نشان دهنده، توزیع اندازه ذرات باریک تر و سیستم کلئیدی همگن تر است. توزیع ذرات برای تمام نمونهها باریک بوده یعنی در نمونهها یکنواختی محتوا و تکرار پذیری قابل مشاهده است

۷-۲- کارایی یا راندمان انکپسولاسیون

افزایش غلظت فسفولیپید منجر به تولید تعداد بیشتر لیپوزوم و همچنین افزایش حجم داخلی کل لیپوزوم و تمرکز بیشتر ماده فعال در سطح و داخل لیپوزومها می شود. با توجه به اینکه در این تحقیق مقدار بالایی لسیتین (۳۰ میلی مولار معادل ۱/۱۲۵ گرم در ۵۰ میلی لیتر) استفاده شده است، می توان نتیجه گرفت که یکی از عوامل مهم در افزایش راندمان انکپسولاسیون، افزایش غلظت فسفولیپید، در سیستم می باشد [۱۹] در تحقیقی که توسط ویلکینسون و همکاران [۲۰] انجام شد، آنها مشاهده کردند که در سیستم های لیپوزومی که از ترکیباتی مانند کلسترول استفاده شده است، به علت سخت شدن دیواره لیپوزومها و در نتیجه کاهش اندازه آنها نسبت به فسفاتیدیل کولین خالص، راندمان انکپسولاسیون کاهش یافته. همچنین نوع و چیدمان ماده فعال نیز در ساختار لیپوزومها تاثیر بسزایی بر اندازه ذرات دارد که آن هم به طور مستقیم بر راندمان انکپسولاسیون تاثیر دارد. به طوری که ماده فعال آبگریز با قرار گرفتن در سطح و بین ساختار دو لایه ای منجر به افزایش چگالی چیدمان فسفولیپیدی می شود که این امر

۱۰- منابع

- [1] Cleveland J, Montville TJ, Chikindas ML, Nes IF. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, 2001. *Int J Food Microbiol.* 71: 1-20.
- [2] Mozafari M, Johnson C, Demetzos C. Nanoliposomes and their application in food nanotechnology. 2008. *In J Liposome.* 18: 309 – 327.
- [3] Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *In Dairy J.* 16:1058-1071.
- [4] Delves-Broughton J, Williams GC, Wilkinson S. 1992. The use of the bacteriocin nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Letts Appl Microbiol.* 15:133-136.
- [5] Zayerzade E, Mortazavi SA, Jafari MR, Afsharnejhad S, Tabatabai Yazdi F, Nasiri Mahalati M. 2011. Study antibacteri- ial effect of nisin form Nanolipos and free form, in liposomes on the survival and population decline Listerian Iranian white ultrafiltration cheese. *Irn Food Scie Tech Res J.* 7(3):191-199.
- [6] Moosavy MH, Basti AA, Misaghi A, Karim G, Zahraei Salehi T, Mostafavi E. 2009. Effect of Nisin on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Commercial Barley Soup. *Pharm Sci.* 15(3): 235- 240.
- [7] Were LM, Bruce B, Davidson P, Weiss G. 2003. Encapsulation of Nisin and Lysozyme in Liposomes Enhances Efficacy against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 67: 922-927.
- [8] Davidson P, John N, Sofos AL. 2004. Antimicrobials in Food. *Food Sci Technol.* 145: 273-291.
- [9] Hondrodinou O, Kourkoutas Y, Panagon EZ. 2011. Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiol.* 28: 621-627.
- [10] Malheiros PS, Daroit DJ, Brandelli A. 2010. Food application of liposome encapsulated antimicrobial peptides. *Trends Food Sci Tech.* 21: 284-292.
- [11] Weiss J, Gaysinsky S, Mclement J. 2009. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. *Global Issues Food Sci Tech.* 24: 435-443.
- اثر قابل توجهی بر روی تشکیل واحدهای کلنی باکتریایی و کپک در این نمونه دارد. همچنین نتایج نشان داد، جمعیت باکتری‌ها در حالت حضور و عدم حضور ناتامایسین متفاوت می‌باشند. در بررسی دماهای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد در کاهش بار میکروبی و کاهش جمعیت قارچ‌ها، می‌توان به این مورد اشاره نمود که دمای پایین و استفاده از ترکیبی از باکتریوسین‌ها اثر چشمگیری بر کاهش بار باکتریایی و شمارش جمعیت قارچی دارد. هر چند که کاهش شمارش باکتریایی و قارچی در هر دو دمای نگهداری ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد قابل توجه است ولی نتایج در دمای ۸°C چشمگیر تر است، که می‌تواند به علت رشد سریع و بیشتر باکتری‌ها و قارچ‌ها در دماهای بالاتر باشد. نتایج بدست آمده با نتایج تحقیق موسوی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. در این تحقیق به بررسی اثر نایسین به عنوان یک باکتریوسین بر رشد و بقاء/استافیلوکوکوس/ارئوس در سوپ جو تجارتي در دو دمای ۸ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد پرداخته شده است. براساس یافته‌های این تحقیق مقادیر مختلف نایسین موجب کاهش رشد باکتری شده است همچنین درجه حرارت نگهداری روی رشد باکتری نیز موثر بوده است بدین معنی که با افزایش دمای نگهداری میزان رشد باکتری و قارچ افزایش یافته است [۲۵].

۸- نتیجه گیری

نتایج نشان داد، استفاده از فرم لیپوزومی مواد ضد میکروبی نسبت به فرم آزاد آن، استفاده از ترکیبی از باکتریوسین‌ها (نایسین و ناتامایسین) و دمای پایین نگهداری تاثیر بیشتری بر کاهش جمعیت میکروبی و قارچی داشته است.

۹- تقدیر و تشکر

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بدلیل تامین امکانات و تجهیزات و حمایت مالی از این پژوهش اعلام می‌داریم.

- drug loading and ESEM analysis of stability. *In J of Pharam* 2004; 285: 23-34.
- [19] Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chem* 2012; 135: 2761–2770.
- [20] Wilkinson M, Kilcawley K. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *In Dairy J* 2005; 15: 817-830.
- [21] Benche R, Kheadr E. Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Zin liposome or by in situ production in mixed culture. *App Environmental Microbiol* 2002; 68:3683-3890
- [22] Hwange SY, Kim HK, Choo J, Seong GH, Hien D, Lee EK. Effects of operating parametrs on the efficiency of liposome encapsulatin of enzymes. *Collides surface Biointer* 2012; 94: 296-303.
- [23] Mohamed AN, Ranjard L, Catroux C, Catroux R, Hartmann A. Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *J Microbiol Meth* 2005; 60: 31– 40.
- [24] Mohamadi Sani A, Ehsani MR. [Effect of natamycin on UF-Feta-cheese shelf life]. *J Pajo Sazandegi* 2007; 71.
- [25] Moosavy MH, Basti AA, Misaghi A, Karim G, Zahraei Salehi T, Mostafavi E. Effect of Nisin on the Growth of *Staphylococcus aureus* in Commercial Barley Soup. *Pharmaceutical Sci* 2009; 15: 235- 240.
- [12] Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. 2012. Comparative study of the oxidative and physical stbility of liposome and nanoliposom polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and mozafari methods. *Food chem. in press paper.*
- [13] Tizchang S, Sowti M, Rezai R, Ganbarzadeh B, Javadzadeh Y. 2013. Optimization and Study of physical properties of liposomes containing nisin]. *J Food sci New tech. 2: 59-68.* (Persian).
- [14] Mozafari M, Johnson C, Demetzos C. 2008. Nanoliposomes and their application in food nanotechnology. *In J of Liposome. 18: 309 – 327.*
- [15] Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Alonso S, Chiaramoni NS. 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.*
- [16] Teeranachaideekul V, Souto E, Junyaprasert V, Muller R. 2007. Cetyl palmitate-base NLC for topical delivery of Coenzym Q10-Development, physicochemical characterization and in vivo release studies. *Eur J Pharm. 67: 141-148.*
- [17] 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. *Clin Chem. 32: 1551-1554.*
- [18] Mohammed AR, Weston N, Coombes G, Fitzgerald M, Perrie Y. Liposome Formulation of poorly water soluble drugs: Optimisation of

Study of Antibacterial Effect of Nano-Encapsulated Nisin and Natamycin in Liposoms against the growth of *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*

Ziaee, M. ¹, Sowti Khiabani, M. ², Tizchang, S. ^{3*}, Ghanbarzadeh, B. ⁴, Hamishehkar, H. ⁵, Rezay Mokaram, R. ²

1. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
 2. Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
 3. Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
 4. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
 5. Assistant Professor, Department of Pharamaceutical Science, Pharamaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
- (Received: 93/11/24 Accepted: 94/2/19)

Nisin and natamycin have been used as antimicrobial agents in food and pharmaceutical applications. In its free form, nisin can react with reducing sugars and can non-specifically bind with lipids and proteins and hence its antibacterial activity is reduced. To overcome these limitations, using of liposomes has been reported. The main object of the present study was to study of antibacterial and antifungal Effect of nano-Encapsulated nisin and natamycin in liposoms against the growth of *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*. In this research, liposomes containing nisin and natamycin were produced. Then, particle size of nano-liposome, encapsulation efficiency and antimicrobial and antifungal effects of free and nano-encapsulated nisin and natamycin at temperture of 8 and 25°C were investigated. The results showed that particle size and size distribution (span) was 76-90 nm and 0.73-0.9 nm respectively. The encapsulation efficiency of nisin and natamycin were 85-92% and 89-96%, respectively. The antimicrobial and antifungal results showed that use of encapsulated form of them, combination of bacteriocins and low temperture storage is more effective. In this study nanoliposomes were prepared successfully by Mozaffari method. The Mozaffari method was effeicient method for encapsulation of nisin and natamyciny and evaluation of their antimicrobial and antifungal properties.

Keywords: Nisin, Natamycin, NanoLiposom, Antimicrobial agent, Heating method

* Corresponding Authors E-Mail Address: stizchang@yahoo.com