بررسی اثر ضدمیکروبی نانوانکپسول های حاوی نایسین و ناتامایسین بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسپرژیلوس نایجر*

محسن ضیایی[1]، محمود صوتی خیابانی[2]، سمیرا تیزچنگ[*3]، بابک قنبرزاده[4]، حامد همیشه کار[5]، رضا رضایی مکرم[2]

١- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
٢- دانشیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
٣- دانشجوی دکتری گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
٤- استاد گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
٥- دانشیار مرکز تحقیقات کاربردی و دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز
(تاریخ دریافت: ٩٣/١١/٢٤ تاریخ پذیرش: ٩٤/٢/١٩)

چکیده

نایسین و ناتامایسین به عنوان ماده ضدمیکروبی در صنایع غذایی و داروئی کاربردهای متعددی دارند. در فرم آزاد، به دلیل واکنش با قند احیاء کننده و به طور غیراختصاصی با باند شدن بر لیپیدها و پروتئین‌ها خاصیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی و ضد قارچی نانوانکپسول‌های حاوی نایسین و ناتامایسین بر رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسپرژیلوس 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 ٨ و ٢٥ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می دهد اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات بترتیب در محدوده ٧٦ nm تا ٩٠ و ٠/٧٣ nm تا ٠/٩ و درصد درون پوشانی نایسین و ناتامایسین به ترتیب در محدوده ٨٥ تا ٩٢ درصد و ٨٩ تا ٩٦ درصد است و نتایج حاصل از فعالیت ضدمیکروبی و قارچی نشان داد، استفاده از فرم انکپسوله شده مواد ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی و ضدقارچی روش مناسبی بوده است.

کلید واژگان: نایسین، ناتامایسین، نانولیپوزوم، اثر ضدمیکروبی، 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 نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی در ترکیبات غذایی را دارند. یکی از روش‌های رسیدن به این اهداف، استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی از جمله باکتریوسین‌ها[1] می‌باشد [۱]. نایسین[2] یکی از شناخته‌ترین و پرکاربردترین باکتریوسین‌ها است. نایسین از کشت‌های استارتر باکتری، لاکتوکوکوس لاکتیس در محصولات لبنی تولید می‌شود و دارای خصوصیاتی از قبیل: آمفی‌فیلیک بودن، غیرسمی و بی‌ضرر بودن برای انسان، قابلیت نفوذ در غشاء باکتری‌ها و غیره می‌باشد [۴،۲،۳]. نایسین با ایجاد شکاف در غشای سلولی باکتری‌های گرم مثبت باعث ترشح مواد سیتوپلاسمی به خارج و از بین رفتن آن‌ها می‌شود. این ترکیب دارای خاصیت ممانعت‌کنندگی از رشد، باکتری‌های گرم مثبت (پاتوژن‌ها و آلوده‌کننده‌های مواد غذایی)، میکروارگانیسم‌های مولد فساد و برخی از باکتری‌های گرم منفی (که دچار آسیب در غشا شده‌اند) همچنین قادر به جلوگیری از جوانه زنی اسپورها، می‌باشد. مطالعات نشان داده است که نایسین قادر به جلوگیری از رشد و تشکیل آندواسپورها در جنس‌های مختلف کلستریدیوم و باسیلوس است. همچنین از رشد گونه‌های لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس نیز جلوگیری می‌کند [٦و ٥]. در تحقیقی که وری و همکاران [۷]، در مورد پایداری و تاثیرگذاری نایسین و لیزوزیم انکپسوله شده در لیپوزم‌های فسفولیپیدی در مقابل لیستریامونوسیتوژنز انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که نایسین انکپسوله شده در لیپوزوم‌های ساخته شده از فسفاتیدیل کولین (۱۰۰٪) و فسفاتیدیل کولین- کلسترول (۷۰٪ به ۳۰٪)، رشد باکتریایی را ۲ سیکل لگاریتمی در مقایسه با نایسین آزاد، بیشتر کاهش داده است. ناتامایسین[3] از جمله، باکتریوسین‌های مهم دیگر است. این ترکیب، یک پلی‌ان می‌باشد و بر روی مخمرها و کپک ها کاملاً موثر بوده و حدود چندین سال است که در نوشیدنی‌ها و بعضی مواد غذایی خاص مانند پنیر، گوشت، آب میوه‌ها، محصولات نانوایی، ماست، شراب و سوسیس به صورت افزودن مستقیم، اسپری کردن و غوطه وری استفاده می‌شود [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 می‌شود. استفاده از باکتریوسین‌ها به صورت آزاد به علت برهمکنش آن‌ها با ترکیبات مواد غذایی موجب کاهش قدرت ضدمیکروبی آن‌ها شده و در نتیجه احتیاج به دوزهای بالایی از این ترکیبات می‌باشد. استفاده از نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات ضدمیکروبی، یک روش مناسبی است و می‌تواند مشکلات استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی به صورت مستقیم در مواد غذایی را کاهش دهند. لیپوزوم‌ها اجزاء کروی متشکل از لیپیدهای قطبی (مثل فسفاتیدیل کولین و یا فسفاتیدیل اتانول آمین) و یا مخلوطی از چربی‌های قطبی همراه با کلسترول یا ارگسترول هستند [۱۰،۱۱]. لیپوزوم‌ها 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 اینناکوا با جمعیتی در حدود 10^{6}- 10^{5} cfu/g و غلظت نایسین ۳۰۰IU/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 ۱۰ cfu/ml رسید همچنین در مدت ۲ماه، کاهش جمعیت لیستریایی در مقیاس لگاریتمی برابر ۳ بود [۵]. با توجه به معایب استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی به صورت آزاد و همچنین به دلیل اینکه تاکنون از نایسین به همراه ناتامایسین در بررسی خصوصیات ضدمیکروبی استفاده نشده است، در این تحقیق اثرات ضدمیکروبی نایسین و ناتامایسین به صورت توآم و جداگانه، به دو فرم آزاد و نانولیپوزومی (تولید شده به روش مظفری) در دماهای مختلف نگهداری، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

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

2. Nisin
3. Natamycin

آمریکا)، پلی اتیلن گلیکول (Merck، آلمان)، نایسین (Myasan، ترکیه)، ناتامایسین (DSM، دانمارک)، گلیسرول (با درجه خلوص بالاتر از ٩٩٪، شرکت Merck، آلمان)، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (Merck،آلمان)، اسید فسفریک (Merck، آلمان) و محیط کشت‌های نوترینت براث و مانیتول سالت آگار (جهت شمارش باکتریایی)، محیط کشت های سابروددگستروز براث و سابروددگستروز آگار (جهت شمارش قارچ)،(شرکت Merck، آلمان).

٢-٢- 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 ٣٠ ، ساخت شرکت Beckman، امریکا)، دستگاه اتوآنالیزر Labsoc(مدل D-٦٣٦٠، ساخت شرکت Beckman، امریکا)، دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل Ultrospec ٢٠٠، 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).

٣- روش‌ها

٣-١- آماده سازی فسفاتیدل کولین

غلظت لیپید مورد نیاز جهت تولید لیپوزوم‌ها، با توجه به تحقیقات که تیزچنگ و همکاران [١٣]، در بهینه سازی اندازه ذرات و تاثیر متغییرهای مستقل، غلظت فسفولیپد، سرعت همزن و زمان فرآیند بر روی اندازه ذرات انجام دادند، ٣٠ میلی مولار انتخاب شد. در این تحقیق، ابتد ٣٠ میلی مولار لسیتین با وزن ملکولی ٧٥٠g/mol، معادل ١/١٢٥ گرم، با ترازوی حساس توزین شد سپس ٤ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به آن اضافه شد و در شیکرانکوباتور به مدت یک شبانه روز در دمای ٣٧°C با دور ٧٠rpm قرار داده شد [١٤].

٣-٢- تهیه محلول نایسین

جهت تهیه محلول نایسین، ابتدا ١٠ میلی گرم نایسین، ٣٪ گلیسرول (V/V) و ٣٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ٥ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH= ٥/٥) به آن اضافه شد سپس برای حل شده کامل نایسین، مخلوط روی همزن مغناطیسی (٥٠٠ rpm) در دمای ٤٠°C قرار گرفت.

٣-٣- تهیه محلول ناتامایسین

جهت تهیه محلول ناتامایسین، ١٠ میلی‌گرم ناتامایسین، ٣٪ گلیسرول (V/V) و ٣٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ٥ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=٧/٤) به آن اضافه شد سپس برای حل شدن کامل ناتامایسین، مخلوط روی همزن مغناطیسی (٥٠٠ rpm) در دما ٤٠°C قرار گرفت.

٣-٤- تهیه محلول مخلوطی از نایسین و ناتامایسین

برای تهیه این محلول به ٥ میلی‌گرم نایسین و ٢/٥ میلی‌گرم ناتامایسین، ٣٪ گلیسرول (V/V) و ٣٪ پلی اتیلن گلیکول (V/V) و ٥ میلی لیتر بافر فسفات (pH= ٦) اضافه و سپس برای حل شدن کامل نایسین و ناتامایسین مخلوط، روی همزن مغناطیسی (٥٠٠ rpm) در دمای ٤٠°C قرار گرفت.

٣-٥- 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 ٦٠°C به مدت ١٠ دقیقه با سرعت ١٥٠٠rpm قرار گرفت سپس ٤٢ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH های ٥/٥، ٦ و ٧/٤ به ترتیب برای هر کدام از محلول‌های نایسین، ناتامایسین و مخلوط نایسین و ناتامایسین، اضافه شد و تا ٩٠ دقیقه زیر همزن باقی ماند. فرمولاسیون‌های تهیه شده به مدت ٣٠ دقیقه در دمای اتاق، سپس در دمای ٤°C نگهداری شدند [١٣].

٤- روش‌های آزمون

٤-١- 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 ٤°C و متوسط اندازه‌ی ذرات بر اساس قطر حجمی تعیین شد (معادله١). تمامی نمونه‌ها در سه تکرار اندازه گیری شدند [١٥].

معادله (۱)

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

d_i: قطر ذرات،[۳و٤ $\bar{D}$] : میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [١٦].

معادله(۲)

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

٤-۲- درصد انکپسولاسیون

جهت اندازه‌گیری 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، پروتئین‌ها در حضور پیروگالول رد[4] و مولیبدات[5] تشکیل کمپلکس قرمز رنگ می‌دهند و رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اتوآنالیزر قابل اندازه‌گیری است [۱۷و ۱۳]. از آنجایی که نایسین در دستگاه اسپکتروفتومتر جذب ندارد و ناتامایسین در دستگاه اتوآنالیزر قابل تشخیص نیست، بنابراین به راحتی می‌توان میزان انکپسولاسیون را برای مخلوط نایسین و ناتامایسین محاسبه کرد. برای این منظور ابتدا فرمولاسیون لیپوزوم در آمیکون (فالکون فیلتردار) ریخته و با استفاده از سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، فاز حاوی مواد کپسوله شده در لیپوزوم‌ها از مایع شفاف که حاوی مواد غیر کپسوله شده بود، جدا شد سپس میزان انکپسولاسیون نایسین و ناتامایسین به ترتیب توسط دستگاه‌های اتوآنالیزر واسپکتروفتومتر محاسبه شد و درصد انکپسولاسیون نیز طبق فرمول زیر محاسبه شد:

معادله(۳)

$$\text{درصد انکپسولاسیون} = \frac{\text{مقدار نایسین و ناتامایسین درون پوشانی شده در لیپوزوم}}{\text{مقدار کل نایسین و ناتامایسین اضافه شده}} \times ۱۰۰$$

٤-۳- آزمون‌های میکروبی

٤-۳-۱- 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 میلی‌لیتر و از محیط کشت، نوترینت براث استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت نوترینت براث با باکتری مورد نظر تلقیح و سپس مواد ضدمیکروبی به صورت آزاد و لیپوزومی به آن اضافه شد. نایسین و ناتامایسین در غلظت‌های مختلف (۵،۱۰،۲۰ppm) 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، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روز و دماهای نگهداری ۸° C و ۲۵°C، نمونه‌های 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.

٤-۳-۲- بررسی تاثیر ناتامایسین آزاد و لیپوزومی و مخلوط آنها (نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی شده) بر جمعیت *آسپرژیلوس نایجر* در دماهای مختلف

برای انجام این مرحله از آسپرژیلوس نایجر با رقت 10^{8} به ازای هر میلی‌لیتر و محیط کشت سابرو دگستروز براث استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط کشت مورد نظر با سوسپانسیون اسپور آسپرژیلوس نایجر با رقت 10^{8} اسپور به ازای میلی‌لیتر، تلقیح شد سپس ناتامایسین آزاد و لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی با غلظت‌های مختلف (۲۰ppm، ۱۰، و 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 آسپرژیلوس نایجر در زمان و دماهای مختلف بررسی گردید. بدین منظور در زمان‌های ۰، ۷، ١٤، ۲۱ و ۲۸ روز و دماهای نگهداری ۸°C و ۲۵°C، نمونه‌های تلقیح شده و نمونه شاهد بر روی محیط کشت سابورو دکستروز

4. pyrogallol red
5. molybdate

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

٥- طرح آماری

آزمون‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی، انجام شد. نرم افزار آماری SPSS (16) در سطح احتمال ٩٥٪ (P<٠/٠٥) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین داده ها، استفاده شد.

٦- یافته‌ها

٦-١- تعیین اندازه ذرات

نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیون‌های مختلف در جدول (١) آورده شده است. نتایج نشان داد، تاثیر افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (نمونه٢)، پلی اتیلن گلیکول به همراه نایسین (نمونه٣) و پلی اتیلن گلیکول به همراه ناتامایسین (نمونه ٤) نسبت به فرمولاسیون فسفاتیدیل خالص (نمونه١) از نظر اندازه ذرات، معنی‌دار است (P<٠/٠٥) و با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (نمونه٢)، اندازه ذرات افزایش یافته و سپس اندازه ذرات با افزودن نایسین و ناتامایسین کاهش یافته‌است. همچنین با توجه به جدول (١)، توزیع اندازه ذرات (شاخص اسپن)، در فرمولاسیون‌های ١ تا ٥، تفاوت معنی‌داری نداشته است (P<٠/٠٥)

جدول١ نتایج مربوط به اندازه گیری اندازه ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیونهای مختلف

نمونه	شاخص اسپن	میانگین قطر حجمی(nm)± انحراف معیار
١- فسفاتیدیل کولین خالص	٠/٧٣ ±٠/٠٢٢[a]	٧٦±٢/٨[a]
٢-فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول	٠/٧٨ ±٠/٠٩٥[a]	٩٠ ±٣/٣[b]
٣-فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و نایسین	٠/٨٧ ±٠/٠٨٣[a]	٨٦±٤[c]
٤- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و ناتامایسین	٠/٨٦ ±٠/٠٨٦[a]	٨٥ ±٣/٨[c]
٥- فسفاتیدیل کولین و پلی اتیلن گلیکول و مخلوط نایسین و ناتامایسین	٠/٩ ±٠/٠٥١[a]	٨١ ±٢/٣[d]

٦-٢- راندمان انکپسولاسیون

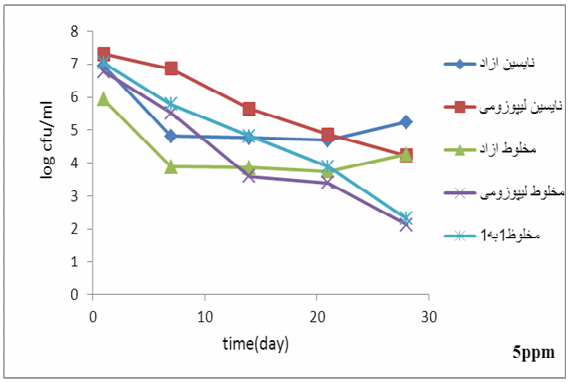
در این تحقیق کارایی انکسپولاسیون برای نایسین حدود ٩٢-٨٥ ٪، برای ناتامایسین حدود ٩٦-٨٩ ٪ و برای مخلوط آنها حدود ٨٩-٨٥٪ تعیین شد. در این تحقیق از پلی اتیلن گلیکول و گلیسرول به جای کلسترول، جهت انعطاف پذیری دیواره نانولیپوزوم‌ها، افزایش اندازه ذرات و پایداری سیستم لیپوزومی استفاده شد.

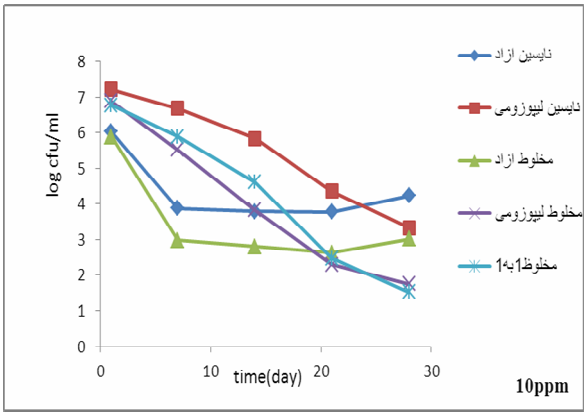
٦-٣- آزمون های میکروبی

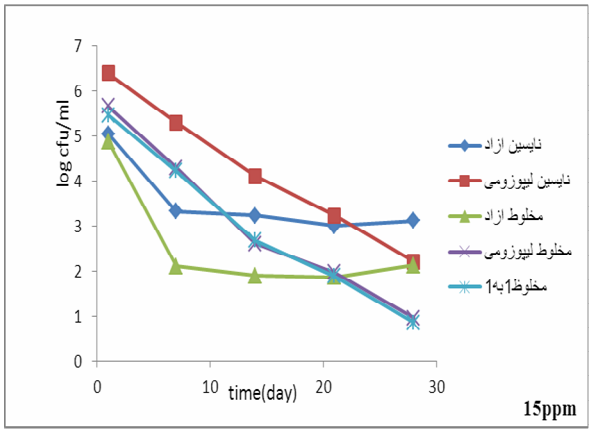
نتایج حاصل از تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومی و همچنین مخلوط آنها (نایسین و ناتامایسین آزاد و لیپوزومی شده) بر جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دماهای مختلف

در شکل (١) و (٢) تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ٨°C و٢٥°C در مدت ٢٨ روز نشان داده شده است. با توجه به شکل (١) و (٢) می‌توان نتیجه گرفت که در همه فرمولاسیون‌ها کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی در همه سطوح ppm ٥، ١٠ و ١٥ مشاهده می‌شود. در نمونه های حاوی نایسین آزاد و مخلوط نایسین و ناتامایسن آزاد در زمان صفر کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی مشاهده شد ولی این کاهش در روز های ٧، ١٤ و ٢١ تقریبا ثابت بوده و حتی در روز ٢٨ اندکی افزایش در شمارش باکتریایی مشاهده شد. در نمونه‌های حاوی نایسین لیپوزومی، مخلوط نایسین و ناتامایسین لیپوزومی و مخلوط با نسبت ١ به ١ نایسین و ناتامایسین در زمان صفر، کاهش چشمگیری در شمارش باکتریایی مشاهده نشده است ولی با گذشت زمان، کاهش تدریجی در روز های ٧، ١٤، ٢١ و ٢٨ 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

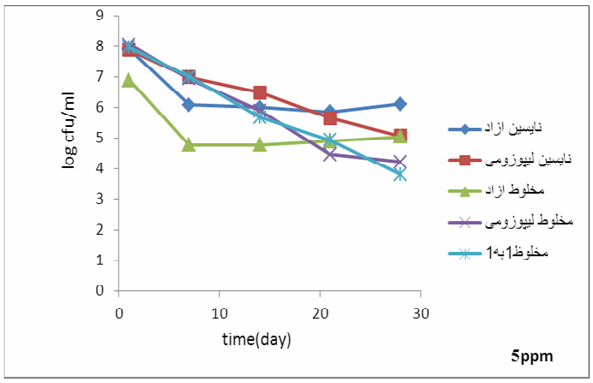
فرمولاسیون‌های که فقط حاوی نایسین هستند، شمارش باکتریایی به طور چشمگیری پایین تر است.

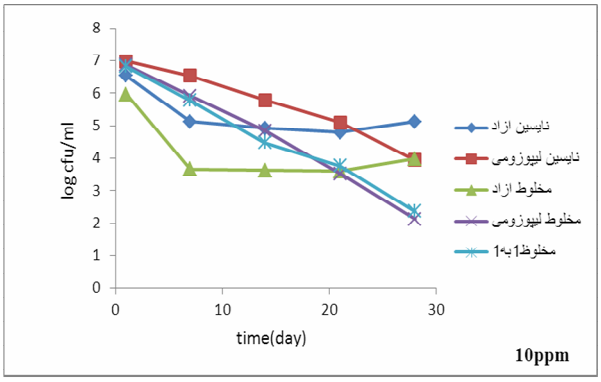


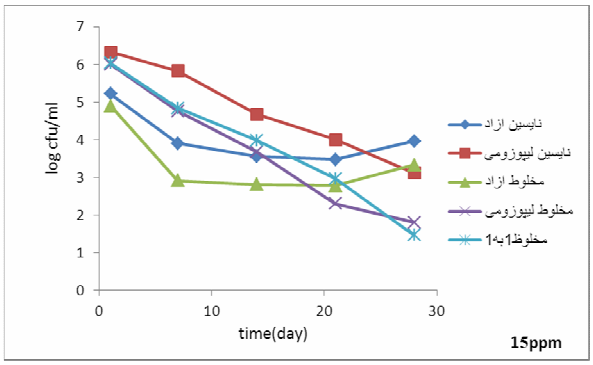




شکل ۱ تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۸°C در غلظت‌های مختلف





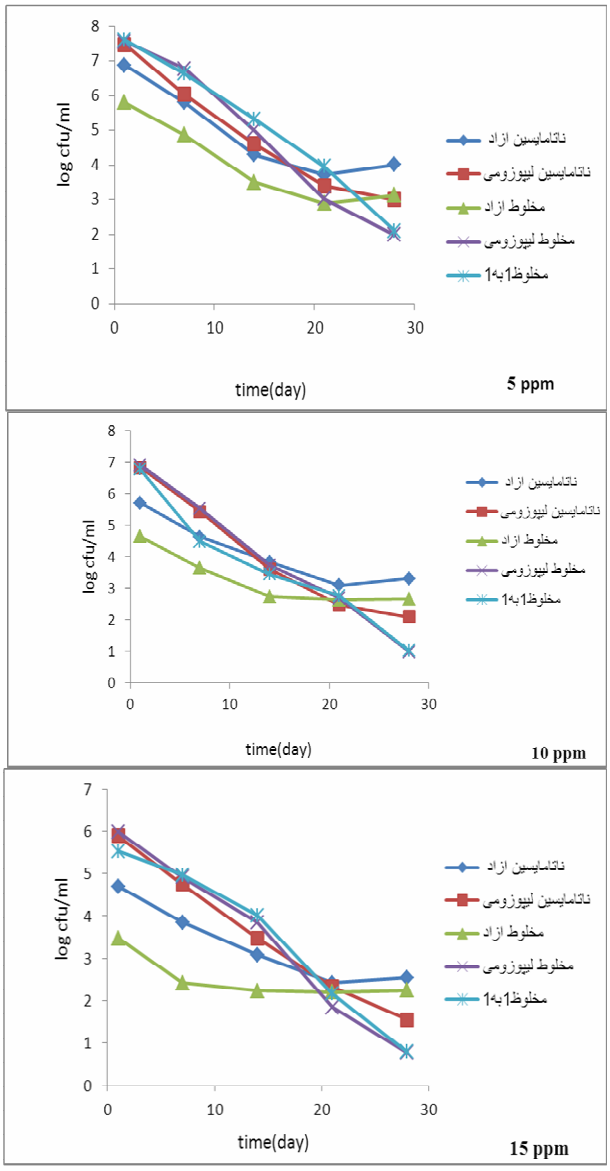


شکل۲ تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف بر کاهش جمعیت استافیلوکوکوس اورئوس در دمای ۲۵ °C در غلظت‌های مختلف

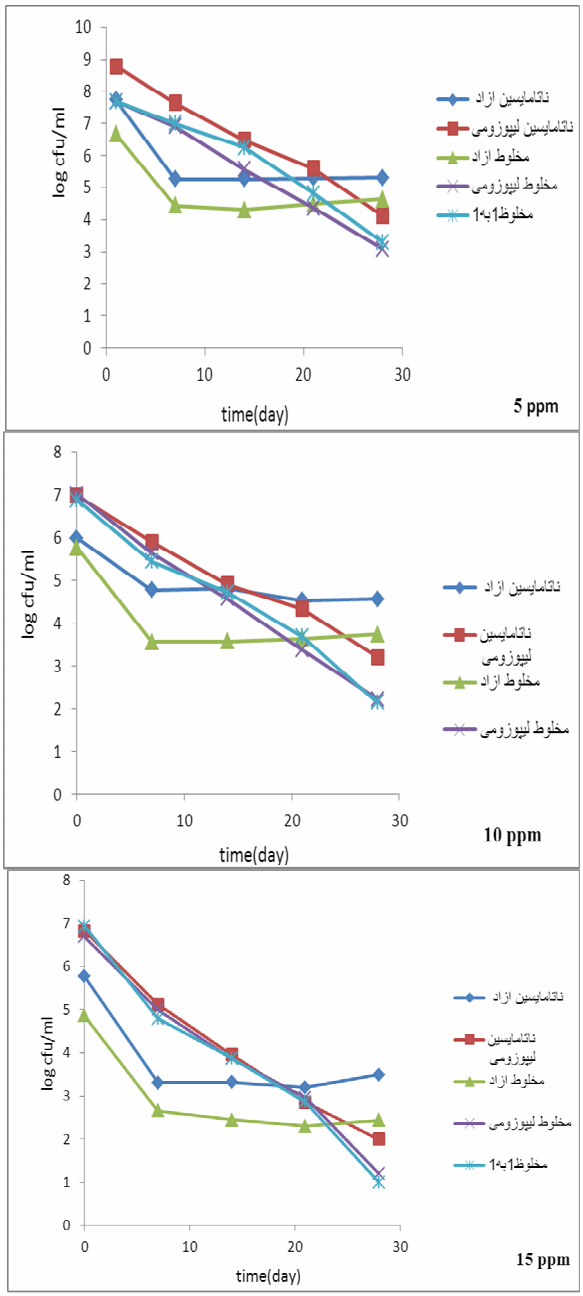
٦-٤- نتایج حاصل از تاثیر ناتامایسین آزاد و لیپوزومی و همچنین مخلوط آنها بر جمعیت *آسپرژیلوس نایجر* در دماهای مختلف

در شکل (۳) و (٤) تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت آسپرژیلوس نایجر در دمای ۸°C در مدت ۲۸ روز نشان داده شده است.

با توجه به شکل (٣) و (٤) می‌توان نتیجه گرفت که در همه فرمولاسیون‌ها کاهش چشمگیری در شمارش قارچ در همه سطوح ppm ٥، ١٠ و ١٥ مشاهده می‌شود. در نمونه‌های حاوی ناتامایسین آزاد و مخلوط نایسین و ناتامایسن آزاد در زمان صفر کاهش چشمگیری در شمارش قارچی مشاهده شد. ولی این کاهش در روز های ٧، ١٤ و ٢١ تقریبا ثابت بوده و حتی در روز ٢٨ اندکی افزایش در شمارش قارچی مشاهده شد.



شکل ٣ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت آسپرژیلوس نایجر در دمای ٨°C



شکل ٤ تاثیر فرمولاسیون های مختلف بر کاهش جمعیت آسپرژیلوس نایجر در دمای ٢٥°C

٧- بحث

٧-١- تعیین اندازه ذرات

با توجه به نتایج درج شده در جدول (١) تمامی فرمولاسیون‌ها اندازه ذرات زیر ١٠٠ نانومتر داشتند. همچنین با افزوده شدن پلی اتیلن گلیکول (موجب انعطاف پذیری در ساختار لیپوزوم‌ها و

ایجاد بافت نرم می‌شود) 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 می‌کند. 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 لایه‌ای منجر به افزایش چگالی چیدمان فسفولیپیدی می‌شود 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 می‌شود. 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 می‌یابد. 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 کلوئیدی همگن‌تر است. توزیع ذرات برای تمام نمونه‌ها باریک بوده یعنی در نمونه‌ها یکنواختی محتوا و تکرارپذیری 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 می‌شود. با توجه به اینکه در این تحقیق مقدار بالایی لسیتین (۳۰ میلی مولار معادل ۱/۱۲۵ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) استفاده شده است، می‌توان نتیجه گرفت که یکی از عوامل مهم در افزایش راندمان انکپسولاسیون، افزایش غلظت فسفولیپید، در سیستم می‌باشد [۱۹] در تحقیقی که توسط ویلکینسون و همکاران [۲۰] انجام شد، آنها مشاهده کردند که در سیستم‌های 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 می‌شود که این امر باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود. با توجه به ساختار آب گریز نایسین و ناتامایسین اندازه ذرات تدریجا کاهش می‌یابد که این امر باعث کاهش در راندمان انکپسولاسیون می‌شود. ولی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول به علت افزایش اندازه و انعطاف پذیری دیواره نانو لیپوزوم‌ها، راندمان انکپسولاسیون به طور چشمگیری افزایش می‌یابد [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 لیپیدها و پروتئین‌ها، خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی را کاهش می‌دهد [۲۳]. نتایج بدست آمده با نتایج، زایرزاده 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 معنی‌داری بین عملکرد نایسین آزاد و محصور در نانوکپسول‌های 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 می‌باشد همچنین نتایج به دست آمده توسط مهمید و همکاران [۲٤] با نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز مطابقت داشت. این محققان به بررسی اثر ناتامایسین بر روی باکتری های ایزوله شده از خاک‌های مختلف نشان داد، استفاده از ناتامایسین

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 تجارتی 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 می داریم.

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, TabatabaiYazdi 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] Hondrodimou 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.

[12] Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. 2012. Comparative study of the oxidative and physical stsbility 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, Fizgerald M, Perrie Y. Liposome Formulation of poorly water soluble drugs: Optimisation of drug loaging 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 Daiy 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.

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 tempreture 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 natamaycin 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 tempreture 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