نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۸ شماره ۴/ سال ۱۳۹۷/ صفحات ۱۵۵ تا ۱۶۵

غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه با استفاده از نانولیپوزوم حاوی لینولئیک اسید کونژوگه

افرا مرندی[۱]، مریم محمدی[۲] عیسی فتح الهی[۳] و اکرم پزشکی نجف‌آبادی[۴*]

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۱۹

[۱] فارغ التحصیل کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۲] دکتری علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
[۳] مربی گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران
[۴] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: Email:akram.pezeshki@tabrizu.ac.ir

چکیده

درون‌پوشانی ترکیبات غذا- داروی آبگریز مانند اسیدهای چرب ضروری در انواع سیستم‌های نانوحامل، روشی مؤثر در غنی‌سازی محصولات کم‌چرب است. در این پژوهش نانولیپوزوم حاوی اسید لینولئیک کونژوگه (CLA) با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون (میزان ۱۰-۵۰ میلی گرم لستین- کلسترول) تولید و در ادامه غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه با آن انجام شد. اندازه ذرات ۷۶ نانومتر با توزیع پراکندگی ۰/۷۷ بدست آمد. سیستم نانولیپوزوم تولید شده در طی مدت زمان پایدار بوده و اندازه ذرات آن در طی نگه‌داری (۳۰روزه) در مقیاس نانو بود. مقدار پتانسیل نمونه‌ها در طی مدت نگه‌داری منفی و بزرگ به‌دست آمد و کاهش پتانسیل زتای نمونه‌ها با گذشت افزایش زمان معنی‌بود ($P<0/05$)، همچنین با افزایش میزان درصد کلسترول میزان کدورت نمونه نانولیپوزوم بیشتر شد. با درون‌پوشانی CLA در سیستم نانولیپوزوم محافظت این ترکیب در برابر اکسیداسیون بیشتر و تولید محصولات ثانویه حاصل از اکسیداسیون (مالون-آلدهیدها) کمتر بود. استفاده از نانولیپوزوم بر روی پایداری و حفظ CLA در برابر فرایند حرارتی (پاستوریزاسیون) اثرگذار بود و CLA اضافه‌شده به شیر کم‌چرب طی مدت نگه‌داری حفظ شد. با استنباط به نتایج بدست آمده می‌توان جهت غنی‌سازی محصولات کم‌چرب از سیستم نانولیپوزوم در محافظت بیشتر CLA در برابر شرایط محیطی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اسیدلینولئیک کونژوگه، نانولیپوزوم، شیر کم‌چرب، کروماتوگرافی گازی

مقدمه

با توجه به اینکه در سالهای اخیر تمایل به سمت استفاده از غذاهای کم‌چرب و بالتبع کاهش دریافت ترکیبات فراسودمند تغذیه‌ای محلول در چربی مشاهده شده است، بدن با کمبود مواد مغذی، اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌ها روبرو می‌شود (فامیان و پزشکی نجف‌آبادی ۱۳۹۶). اسید لینولئیک کونژوگه (CLA) به‌عنوان یک اسید چرب ضروری امگا ۶، گروهی از ایزومرهای اسید لینولئیک (۱۸:۲) با عملکردهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله خواص ضد سرطانی، ضدچاقی و ضدفشارخون است (ویتنی رولفز ۲۰۰۷؛ مکدوناله ۲۰۰۳). حل‌شوندگی بسیار پایین CLA در محیط‌های آبی و ناپایداری آن در حضور عوامل محیطی از جمله شرایط اکسیداسیون، فلزات سنگین و ترکیبات تولیدکنندهٔ رادیکال آزاد و نور

مشکلی در غنی‌سازی مواد غذایی با این گروه ترکیبات است (فرید آقایی و همکاران ۱۳۹۴؛ فامیان و پزشکی نجف‌آبادی ۱۳۹۶). با درون‌پوشانی ترکیبات غذا- داروی آبگریز (نوتریسیتیکال) مانند اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌ها، می‌توان به مزایای متعددی از جمله کنترل رهایش در مادهٔ غذایی و بدن، محافظت در برابر عوامل تخریب‌کننده‌ی محیطی (اکسیداسیون، حرارت، نور، محیط اسیدی، فلزات سنگین و آنزیم‌ها) در طی فرایند و نگهداری مواد غذایی، افزایش حلالیت در محیط‌های آبی، دسترسی زیستی بالاتر و جلوگیری از ایجاد بدطعمی و بدرنگی در مواد غذایی دست یافت. به علت حلالیت پایین CLA، عموماً توانایی و قابلیت محبوس شدن آن در ساختارهای نانوحامل کلوئیدی بالاست که البته این امر خود به پارامترهای مختلف از قبیل نوع سیستم درون-پوشانی و فرمولاسیون آن بستگی دارد (دووست و همکاران۲۰۱۰). از متداول‌ترین نانوحامل‌های لیپیدی وزیکولاری می‌توان به نانولیپوزوم، نانونیوزوم و نانوفیتوزوم‌ها اشاره کرد (کریمی و همکاران ۲۰۱۵). با-توجه به حضور لیپیدهای قطبی (فسفولیپیدها) در ساختار نانولیپوزوم‌ها که به محض واکنش با آب به صورت غشاهای دو لایه ای و در اثر نیروی برشی به شکل کروی (وزیکول) در می‌آیند، این ساختارها می-توانند هر سه گروه ترکیبات آب‌دوست، آبگریز و دوگانه-دوست را درون‌پوشانی کنند. در ساختار لیپوزوم‌ها علاوه بر فسفولیپیدها از ترکیبات پایدار کننده مانند استرول‌ها (کلسترول، گاماوریزانول، بتاسیتوسترول و..) استفاده می‌شود (کریمی و همکاران ۲۰۱۵). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی جهت غنی‌سازی محصولات غذایی کم‌چرب با استفاده از نانوحامل‌های وزیکولاری مانند لیپوزوم، فیتوزوم و نیوزوم و استفاده از آن‌ها به‌عنوان سیستم‌های حامل ترکیبات نوتریسیتیکال انجام شده است. از این تحقیقات می‌توان به تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین D3 به روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون (محمدی و همکاران ۱۳۹۲)، تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین A پالمیتات (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶)، تولید نانوحامل حاوی عصاره هل (کیوانی‌نهر و همکاران ۲۰۱۸) ، تولید نانولیپوزوم حاوی کورکومین با استفاده از لستین سویا، سالمون و شلغم روغنی (حسن و همکاران ۲۰۱۴)، تولید نانوفیتوزوم حاوی روتین (بابازاده و همکاران ۲۰۱۷)، تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین A (قنبرزاده و همکاران ۲۰۱۵) اشاره کرد. با توجه به مصرف محصولات لبنی و شیرکم‌چرب در سال‌های اخیر و هم‌چنین حساسیت زیاد CLA به اکسیداسیون واین نکته که استفاده از نانو ذرات جهت محافظت و انتقال ترکیبات غذا-داروی آبگریز اخیراً بیشتر بررسی شده است، در این تحقیق به غنی‌سازی شیر کم‌چرب با نانولیپوزوم حاویCLA پرداخته شده است تا با استفاده از درون‌پوشانی، ضمن محافظت این ترکیب در برابر شرایط محیطی و اکسیداسیون، بتوان کمبودهای تغذیه‌ای محصولات لبنی کم‌چرب به این اسید چرب را جبران نمود.

مواد و روش‌ها

آب دوبار تقطیر، CLA با خلوص نزدیک ۸۰ ٪ مخلوطی از ایزومرهای ۹-سیس، ۱۱-ترانس و ۱۰-ترانس، ۱۲سیس (داروسازی زهراوی تهران)، شیر پاستوریزه کم‌چرب (کمتر از ۰/۶٪ چربی) (سهامی پگاه تبریز-ایران). فسفولیپید (بتا استیل –وای – او–آلکیل - ال-آلفا-فسفاتیدیل کولین) به‌دست آمده از لستین گاوی با درجهٔ خلوص بیشتر از ۹۹٪ با نام Lipoid (سیگما، آلمان)، کلسترول با خلوص ۹۵٪ (مرک، آلمان) و کلیه مواد شیمیایی جهت انجام آزمایشات ساخت شرکت مرک آلمان با درجه خلوص تجزیه‌ای بودند.

تهیهٔ نانولیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک

سیستم نانولیپوزوم حاوی CLA با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایهٔ نازک-سونیکاسیون، با کمی تغییرات تولید گردید. بدین منظور غلظت ۵۰- ۱۰میلی‌گرم لسیتین-کلسترول در اتانول مطلق (۱۵ سی‌سی) حل شده و سپس محلول استوک CLA در اتانول (۰/۰۱گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول) به‌میزان۲۵۰ میکرولیتر به مخلوط لسیتین-کلسترول در فلاسک ته گرد ۵۰ ml اضافه گردید. با تبخیر حلال در اواپراتور روتاری در ۳۵°c، لایه نازک در کف فلاسک ته‌گرد تشکیل شد. در ادامه ۱۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و دانک‌های شیشه‌ای

برای کمک به هیدراته شدن لیپیدها در دمای ۷۵°c اواپراتور اضافه شد. در این مرحله لیپوزوم‌های مولتی لاملار میکرومتری تولید شدند که مراحل انجام گرفته جهت کاهش اندازهٔ لیپوزوم‌ها شامل هموژنیزه کردن نمونه‌ها در هموژنایزر (با سرعت rpm ۲۰۰۰۰ در دمای بالای انتقال فاز لیپوزوم‌ها به مدت ۱۵ دقیقه) و در ادامه انتقال مخلوط لیپوزومی به داخل حمام یخ و سونیکاتور پروب و اعمال ۱۰ سیکل ۱ دقیقه‌ای بود. در این مرحله نانو لیپوزوم‌های یونی لاملار تولید شد. (کو و لی ۲۰۱۰).

تعیین اندازهٔ ذرات

قطر معادل و شاخص اسپن نانولیپوزوم‌های تولیدشده از روی توزیع اندازهٔ ذرات در دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات (SHIMADO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می‌کند. اندازه‌گیری اندازه ذرات پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید و نگه‌داری نمونه در دمای محیط (۲۵C°) انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد (همیشه‌کار و همکاران ۲۰۰۹).

میزان کدورت

کدورت نانولیپوزوم حاوی CLA، در دستگاه اسپکتوفتومتر مرئی (Ultrospec 2000، انگلیس) و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کدورت، از نسبت‌های متفاوت لستین: کلسترول (۰:۶۰،، ۱۰:۵۰، ۴۰: ۲۰، ۳۰ : ۳۰: میلی گرم) در تولید نانولیپوزوم استفاده شد. ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد و سپس کدورت نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (ایکسیا و ایکسو ۲۰۰۵).

بررسی پایداری نانولیپوزوم

پایداری بلندمدت نانولیپوزوم تولیدشده با اندازه‌گیری آزمون تعیین میزان پایداری اندازه ذرات با اندازه¬گیری اندازه ذرات طی روزهای نگه‌داری ۱، ۷، ۱۴، ۳۰ روز پس از تولید انجام شد.

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای نانولپوزوم¬های حاویCLA، از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS، انگلستان) استفاده شد. ابتدا هریک ازنمونه‌ها با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابررقیق شدند و اندازه‌گیری پتانسیل زتا در pH=۷/۴ و در دمای ۲۵°c وتوان ۱۴۹ وات انجام شد (فاتاروس و انتیمیساریس ۲۰۰۲).

بررسی پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک کونژوگه

پایداری اکسیداتیو نمونه نانولیپوزوم حاوی اسید لینولئیک کونژوگه در طی روزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ با استفاده از آزمایش تیوباربیوتیک اسید (TBA) اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر از نمونه نانولیپوزوم حامل CLA با ۲ میلی‌لیتر از محلول واکنشگر (۱۵ گرم تری‌کلرو استیک اسید, ۰/۳۴ گرم واکنشگر TBA، ۱/۷۶ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید ۱۲ مولار و ۸/۲۸ میلی‌لیتر آب) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه داخل آب جوش قرار گرفت و سپس با جریان آب سرد به‌مدت ۵ دقیقه سرد شده و در ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفورژ شد، جذب در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد (تنگ و همکاران ۲۰۱۰).

تهیهٔ نمونه‌های شیر غنی‌سازی‌شده و بررسی پایداری CLA در شیر پاستوریزه طی نگهداری در دمای یخچال

با توجه به مقدار غنی‌سازی CLA =۲/۵ µg/ml به شیرکم چرب و با توجه به نیاز روزانه و تامین از سایر منابع، بنابراین•به ازای ۱۰۰ سی‌سی شیر کم‌چرب،۲۵۰ میکرولیتر از فرمولاسیون نانولیپوزوم و به ازای ۱۰۰ سی‌سی شیر کم‌چرب، ۲۵۰ میکرولیتر از CLA خالص (نمونه کنترل) اضافه گردید و در ادامه تحت فرایند پاستوریزاسیون (۶۵°c به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری) قرار گرفت. از نمونه‌های شیر پاستوریزه، نمونه‌برداری جهت استخراج اسید چرب از شیر و تعیین میزان پایداری آن صورت گرفت. هم‌چنین از نمونه شیرخام و فرایند شده بدون اضافه کردن هیچ سیستمی، جهت تعیین مقدار اولیه CLA پیک گرفته شد. در جدول ۱ مشخصات اولیه شیر خام مورد استفاده نشان داده شده است.

جدول۱ -مشخصات اولیه شیر خام مورداستفاده

فاکتور	مقدار
pH	۶/۶
اسیدیته	۱۵ درجه دورنیک
چربی	۰/۶ درصد
پروتئین	۲/۹۵ درصد
ماده خشک کل (TS)	۹/۸ درصد
ماده خشک بدون چربی (SNF)	۹/۲ درصد

اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای چرب در شیر و میزان CLA

شناسایی و تعیین مقدار اسیدهای چرب موجود در چربی‌های استخراج‌شده با سیستم GC مجهز به آشکارسازیونی شعله و ستون مویین به طول ۱۰۰متر و قطرداخلی ۰/۲۵ میلی‌لیتر انجام شد. اسپلیت دستگاه ۱به ۱۰۰ تنظیم گردید دمای محل تزریق، آشکارساز و دمای ستون به‌صورت زمان‌بندی‌شده برنامه‌ریزی گردیده بود . گاز نیتروژن با خلوص ۹۹/۸٪ و با جریان دو میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گازحامل استفاده گردید.

آنالیز آماری

آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی براساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۹ انجام شده و نمودارها توسط نرم‌افزار Excell 2016 رسم شد.

نتایج و بحث

اندازه و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم حاوی CLA

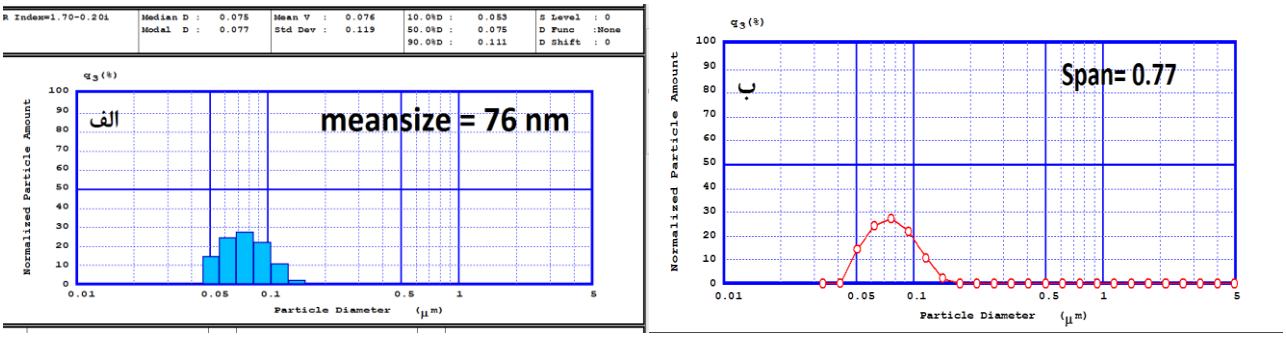
اندازه‌گیری ذرات فرمولاسیون نانولیپوزوم (یک روز پس از تولید) بر پایه ۵۰-۱۰ میلی‌گرم لستین-کلسترول حاوی CLA نشان داد میانگین قطر حجمی ذرات ۷۶ نانومتر و شاخص اسپن ۰/۷۷ است که نشان‌دهنده اندازه ذرات در مقیاس نانو با توزیع مناسب و یکنواختی پراکندگی ذرات است (شکل ۱).

اندازهٔ ذرات در یک سیستم نانوحامل کلوئیدی نقش به‌سزایی در تعیین خصوصیات آن ایفا می‌کند. اندازهٔ بزرگ ذرات منجر به ناپایداری کلوئیدی و تفکیک گرانشی بالاتر، دسترسی زیستی کمتر، کدورت بیشتر و قرارگیری کمتر ترکیب فعال درون‌پوشانی‌شده در ساختار نانوحامل می‌شود. در فرایند تولید نانولیپوزوم، جهت کاهش اندازهٔ ذرات از انرژی صوتی سونیکاسیون استفاده شد. در ساختار لیپوزوم قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول‌ها، در بین حفره‌های مولکولی تشکیل شده قرار می‌گیرد، در نتیجه باعث افزایش معنی‌دار در اندازهٔ وزیکول‌ها نمی‌گردد. البته تأثیر کلسترول بر روی اندازهٔ ذرات به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده بستگی دارد (قنبرزاده و همکاران ۲۰۱۵). مشابه با نتیجه بدست آمده در این تحقیق، پزشکی و همکاران (۲۰۱۶) در تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین A پالمیتات، محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین D3، اندازه قطرات زیر ۱۰۰ نانومتر گزارش کردند. الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) نیز در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی آسکوربیک اسید، با فسفاتیدیل‌کولین سویا و فیتواسترول گزارش کردند افزودن استرول‌های گیاهی به فرمولاسیون لیپوزوم‌ها بر اندازه ذرات تأثیری ندارد ولی منجر به توزیع اندازهٔ ذرات باریک و تک‌مد در سیستم می‌شود.

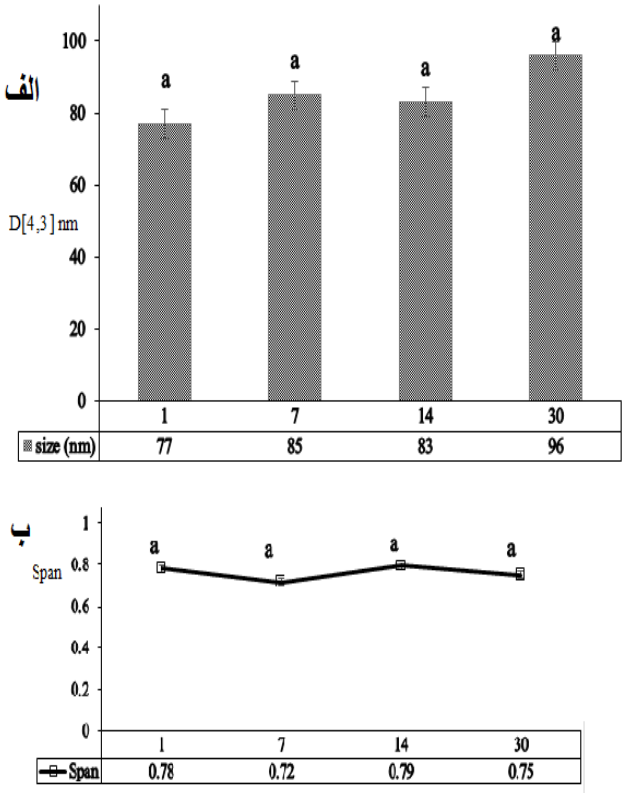
پایداری اندازه ذرات فرمولاسیون نانولیپوزوم

در شکل ۲ پایداری اندازه و توزیع ذرات فرمولاسیون نانولیپوزوم طی مدت نگه داری ۳۰ روزه نشان داده شده است. همواره اندازه ذرات در مقیاس نانو با توزیع یکنواخت و تک مد بود و افزایش اندازه در طی مدت زمان رخ نداد. نانولیپوزوم‌ها به دلیل تفاوت ناچیز دانسیتهٔ آن‌ها با فاز پیوسته، کمتر دچار تفکیک گرانشی می‌شوند و حرکات براونی، لیپوزوم‌ها را به صورت معلق نگه می‌دارد (محمدحسنی و همکاران ۱۳۹۲). در دمای محیط لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، آگلومریزه می‌شوند و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازهٔ ذرات، توزیع اندازه ذره‌ای گسترده و ناهمگون را در پی خواهد داشت. از عوامل موثر بر پایداری ذرات نانولیپوزوم می‌توان به ماهیت و غلظت فسفولیپید در سیستم،•روش

تولید نانولیپوزوم، غلظت و نوع پایدارکننده، شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی اشاره کرد (قنبرزاده و همکاران ۲۰۱۵). این امر مشابه با نتایج پزشکی و همکاران (۲۰۱۶) در تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین A پالمیتات، قنبرزاده و همکاران (۲۰۱۵) در تولید نانولیپوزوم حاوی بتاکاروتن، محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین D_3 است. گیبیس و همکاران (۲۰۱۴) نیز در مطالعهٔ خود روی تولید نانولیپوزوم‌های چندلایه حاوی عصاره پلی‌فنولی و آنتوسیانی هیبیسکوس با قطر ۴۶ نانومتر گزارش کردند نانولیپوزوم‌های حاصله طی مدت ۳۰ روز از نظر فیزیکی پایدار بوده است.



شکل۱- الف: اندازه‌ی ذرات و ب: توزیع اندازه ذرات یک روز پس از تولید فرمولاسیون بر پایه ۱۰-۵۰ میلی‌گرم لستین - کلسترول حاوی CLA



شکل۲- پایداری الف: اندازه و ب: توزیع اندازه ذرات در فرمولاسیون نانولیپوزوم بر پایه ۱۰-۵۰ میلی‌گرم لستین - کلسترول حاوی CLA. طی بازه‌های زمانی (۱، ۷، ۱۴ و ۳۰ روز پس ازتولید)

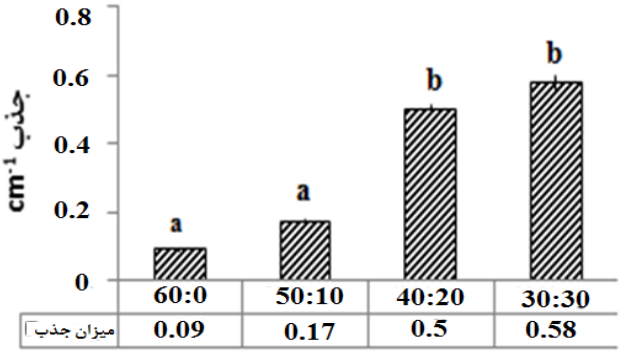
پتانسیل زتا

اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهم در پایداری نانولیپوزوم‌ها هستند، مفید است (مظفری و همکاران ۲۰۰۶). با توجه به حضور کلسترول و دارابودن گروه OH آزاد در ساختار آن، مقدار پتانسیل نمونه‌ها در طی مدت نگه‌داری منفی و بزرگ به‌دست آمد و افزایش زمان تأثیر معنی‌داری در کاهش پتانسیل زتای نمونه‌ها نشان داد (جدول ۲). از عوامل موثر بر پتانسیل زتای لیپوزوم می‌توان به نوع و مقدار فسفولیپید؛ نوع و غلظت پایدارکننده؛ نوع و غلظت مادهٔ فعال؛•قدرت یونی محیط و دما اشاره کرد. گروه‌های قطبی موجود در سر فسفولیپید به دما و قدرت یونی حساس هستند. براساس مکانیسم پیشنهاد شده گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا کشیده می‌شود و در دمای انتقال فاز گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا رانده می‌شود و بنابراین باعث دفع الکترواستاتیک ذرات می‌شود (بنگ و همکاران ۲۰۱۱). در ارتباط با تأثیر کلسترول

بر پتانسیل زتا نیز نتایج مشابهی از سایرین گزارش شده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در نتایج خود بیان کردند با افزایش مقدار کلسترول، پتانسیل زتا به طور تدریجی افزایش می‌یابد. بنگ و همکاران (۲۰۱۱) در تحقیق خود بر روی لیپوزوم‌های تولید شده به روش سونیکاسیون، نانولیپوزوم‌های پایدار با اندازهٔ کوچک و تک‌مد و بار سطحی منفی بالا تولید کردند. برهم‌کنش بین پوشش لیپیدی و مادهٔ فعال هسته‌ای نیز تأثیر به‌سزایی بر پتانسیل زتا و پایداری وزیکول‌ها دارد. احتمالاً ساختار ترکیب فعال با تغییر دادن ساختار سطحی لیپوزوم‌ها، موجب منفی‌تر شدن پتانسیل زتای سطحی آنها می‌شود. این تغییرات منجر به تغییر در آرایش و جهت‌گیری گروه‌های سر فسفاتیدیل کولین در سطح لیپوزوم‌ها می‌شود.

اندازه‌گیری میزان کدورت

شکل ۳ مقادیر کدورت برای ۴ سطح متفاوت لستین-کلسترول در فرمولاسیون نانولیپوزوم آزمایشی را نشان می‌دهد.

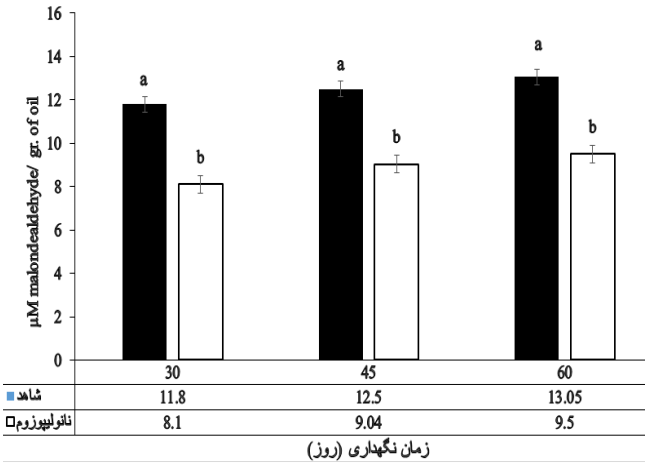


شکل ۳- میزان کدورت در فرمولاسیون نانولیپوزوم حاوی کونژوگه لینولئیک اسید در چهار سطح (۶۰:۰، ۵۰:۱۰، ۲۰: ۴۰، ۳۰:۳۰ میلی گرم) نسبت لستین به کلسترول

سیستم نانولیپوزوم تولیدی دارای کدورت نبوده ولی با افزایش میزان درصد کلسترول در فرمولاسیون میزان کدورت نمونه بیشتر شد. این امر شاید به دلیل چیدمان فشرده و متراکم شدن بیشتر لستین‌ها در اثر حضور کلسترول در ساختار است. با افزودن کلسترول، پیوندهای جدیدی بین گروه کولین لسیتین و گروه هیدروکسیل کلسترول ایجاد می‌شود که با افزایش میزان کلسترول پیوندهای ایجاد شده نیز بیشتر و همین پیوندهای جدید باعث افزایش کدورت شد (محمدی و همکاران ۱۳۹۲). همچنین قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش دانسیتهٔ ظاهری چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. احتمالاً افزایش دانسیتهٔ ظاهری باعث افزایش میزان نور پخش-شده توسط ذرات و افزایش کدورت می‌شود. همچنین افزایش کدورت ممکن است به ماهیت خود کلسترول مربوط باشد، یعنی احتمالاً کلسترول بیشتر از لسیتین نور را منحرف می‌کند (قنبرزاده و همکاران ۲۰۱۵).

جدول۲ - پتانسیل زتای نانولیپوزوم حاوی CLA در طی مدت نگه‌داری

مدت زمان نگه‌داری	پتانسیل زتا (میلی ولت)
یک روزپس از تولید	۰±۳۷/۰۵ [a]
روز ۷	۳۹/۰±۷/۰۷۲ [b]
روز ۱۵	۴۰/۰±/۰۳ [bc]
روز ۳۰	۴۲/۰±۵/۰۴۵ [c]



شکل ۴- نتایج حاصل از آزمون TBA بر روی نمونه‌های شاهد (امولسیون ساده از ۲۵۰ میکروگرم CLA در آب دوبار تقطیر) و نانولیپوزوم حاوی CLA طی روزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز نگه‌داری

حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

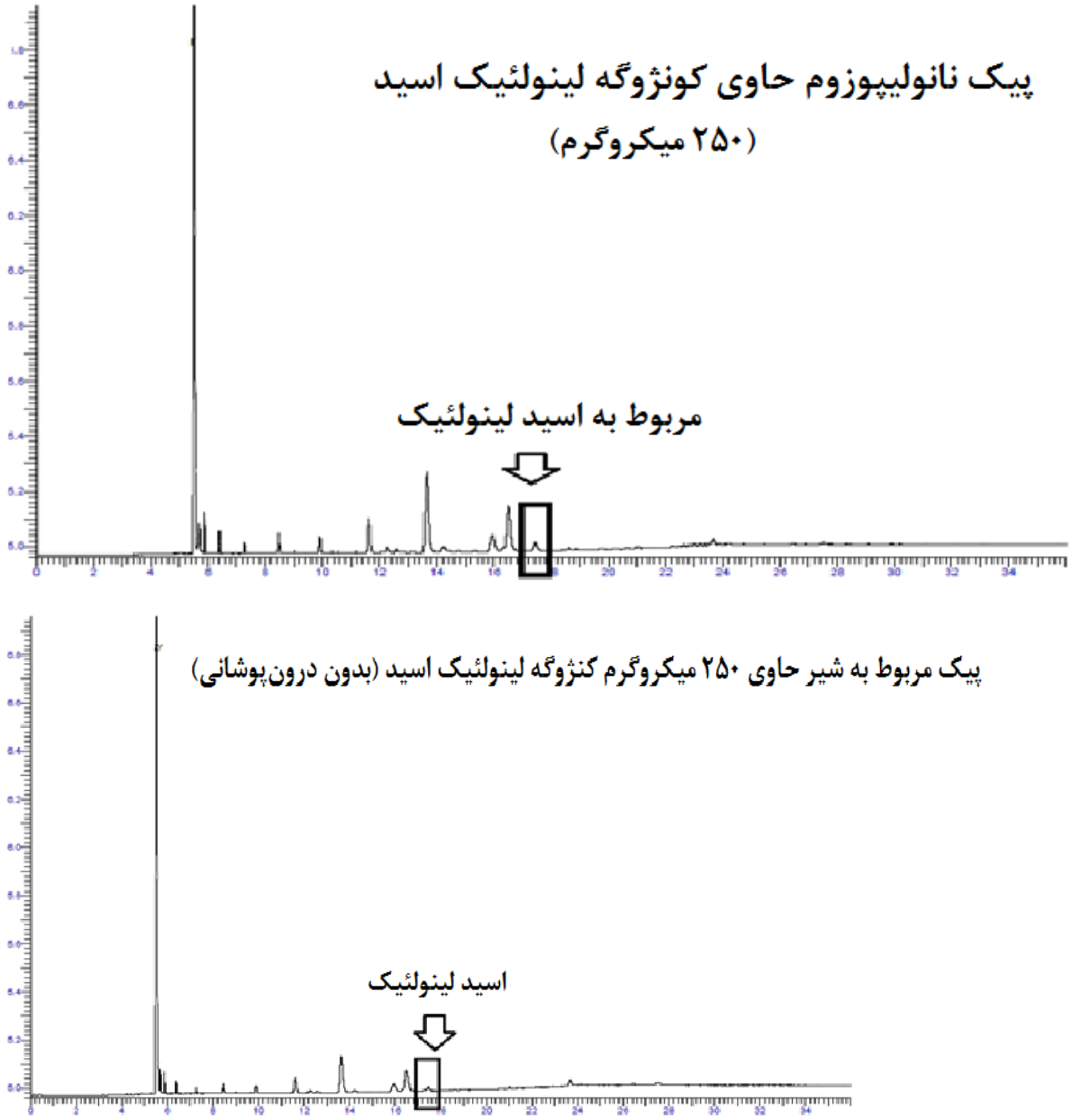
بررسی پایداری اکسیداتیو CLA

با وارد شدن CLA در سیستم نانوحامل کلوئیدی و محافظت این ترکیب در برابر عوامل محیطی، نور و اکسیژن، پایداری اکسیداتیو آن افزایش یافت. در شکل ۴ نتایج حاصل از TBA بر روی نمونه های شاهد (امولسیون ساده حاصل از ۲۵۰ میکروگرم CLA در آب دوبار تقطیر) ونانولیپوزوم حاوی CLA نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است از نظر میزان مالون آلدهید تولید شده طی نگه‌داری، تفاوت معنی‌داری میان نمونه شاهد و نمونه نانولیپوزوم وجود دارد که نشانگر انجام اکسیداسیون بیشتر در نمونه شاهد است. TBA معرفی است که با مالون آلدئید واکنش می‌دهد و کمپلکس صورتی رنگی تشکیل می‌دهد و در طول موج ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. مالون آلدئید آلدئیدی است که عمدتاً در اتواکسیداسیون اسیدهای چرب با سه یا تعداد بیشتری پیوند دوگانه تشکیل می شود. این ترکیب فاقد بو بوده و قادر است با پروتئینها اتصال پیدا کند. همان‌طور که نتایج نشان داد با درون‌پوشانی CLA در سیستم نانولیپوزوم محافظت این ترکیب در برابر اکسیداسیون بیشتر و محصولات ثانویه اکسیداسیون (مالون آلدهیدها) کمتر تولید شد. این امر مطابق با نتایج فرید آقایی و همکاران (۱۳۹۴) در درون‌پوشانی CLA در سیستم‌حامل لیپیدی (NLC)، حسن فامیان و پزشکی (۱۳۹۴) در درون‌پوشانی CLA در نانوامولسیون و نیکبخت نصرانی و همکاران (۲۰۱۶) در تهیه امولسیون حاوی CLA بود.

غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه با CLA و حفظ آن در طی مدت نگه‌داری

از نمونه‌های شیر پاستوریزه کم‌چرب غنی‌شده با نانولیپوزوم حاوی ۲۵۰ میکروگرم CLA و نمونه حاوی ۲۵۰ میکروگرم CLA خالص بدون استفاده از نانوحامل پیک گرفته شد (شکل ۶) نتایج نشان داد با توجه به مساحت پیک (۲٪/۹۸) با احتساب فاکتور تصحیح (۰/۹۱) درصد اسید لینولئیک مزدوج موجود در شیر کم‌چرب غنی‌شده ۳/۱٪ است و استفاده از نانولیپوزوم باعث حفظ بهتر CLA در شیر نسبت به نمونه شاهد بدون درون-پوشانی و بدون استفاده از نانولیپوزوم گردید (۳/۱ درصد اسیدهای چرب شیر). همان¬طور که نتایج بدست آمده نشان داد می¬توان با به¬کارگیری فناوری نانو و غنی¬سازی شیر با نانولیپوزوم، ضمن محافظت از CLAدر برابر شرایط محیطی و اکسیداسیون، کمبود این ترکیبات مغذی را در شیرکم¬چرب را می¬توان جبران کرد. البته با توجه به اینکه تنها محل قرارگیری ترکیبات آبگریز و CLA در مرکز غشا دولایه ساختار وزیکول لیپوزوم است و با توجه به ساختار طویل و حجیم اسیدچرب، مسلماً تعداد مولکول اندکی از CLA قادر به جایگیری در ساختار وزیکول شده و کارایی درون¬پوشانی پایینی از ساختار لیپوزوم حاصل می¬شود. این امر مطابق با ساختارهای لیپوزومی بسیاری از ترکیبات آبگریز است (گونت و همکاران، ۲۰۱۰؛ پزشکی و همکاران، ۲۰۱۶). با آزادماندن بخشی از CLA در محیط ابی اطراف وزیکول¬ها، به آسانی می¬تواند تحت تخریب حین فرایند حرارتی، اکسیداسیون و اشعه قرار گیرد. همین امر را می¬توان دلیلی بر درصد پایین¬تر CLA حفظ شده در شیر کم¬چرب غنی¬سازی شده، نسبت به سار نانوحامل‌های لیپیدی دانست.

پزشکی (۱۳۹۳) نیز در تحقیق خود به غنی¬سازی شیر کم¬چرب با ویتامین A پالمیتات درون¬پوشانی¬شده در فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم برپایه ۱۰:۵۰ میلی¬گرم لستین: حاوی۲۵۰ میکروگرم ویتامین A پالمیتات با کارایی درون پوشانی ۱۵/۷٪ پرداختند. آنها گزارش کردند درون¬پوشانی ویتامین A پالمیتات توسط سیستم¬نانولیپوزوم باعث محافظت بیشتری از ویتامین در برابر فرایند حرارتی نسبت به نمونه خالص شد.



شکل۵-نتایج کروماتوگرافی گازی دو نمونه شیر غنی‌شده با نانولیپوزوم حاوی CLA(یک روز پس از تولید) و شیر حاوی ۲۵۰ میکروگرم کونژوگه لینولئیک اسید خالص بدون درون‌پوشانی

نتیجه‌گیری

فرمولاسیون تولیدی نانولیپوزوم حاوی CLA به روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون، با دارابودن اندازه ذرات در مقیاس نانو و توزیع یکنواخت، در طی مدت‌زمان نگه‌داری از لحاظ اندازه ذرات و مکانیسم‌های پایداری، پایدار بوده و ناپایداری در آن اتفاق نیفتاد. با توجه به حضور کلسترول و دارا بودن گروه OH آزاد در ساختار آن، مقدار پتانسیل نمونه‌ها در طی مدت نگه‌داری منفی به‌دست آمد و افزایش زمان تأثیرمعنی‌داری در کاهش پتانسیل زتای نمونه‌ها نشان داد. نتایج حاصل از پایداری اکسیداتیو نشان داد با درون‌پوشانی CLA در سیستم نانولیپوزوم، محافظت این ترکیب در برابر اکسیداسیون

بیشتر بود. استفاده از نانولیپوزوم بر روی حفظ CLA در برابر فرایند حرارتی (پاستوریزاسیون) اثرگذار است و میزان CLA بیشتری در شیر طی مدت نگه‌داری حفظ شد. درنهایت می‌توان با به کارگیری فناوری نانو و استفاده از نانوحامل‌ها ضمن محافظت از ترکیبات زیست فعال در برابر شرایط محیطی و اکسیداسیون، کمبود این ترکیبات مغذی را جبران کرد.

منابع مورد استفاده

پزشکی ا، ۱۳۹۳. بررسی و مقایسه ویژگی‌های کلوئیدی نانوامولسیون، نانو لیپوزوم و ساختارهای لیپیدی نانوحامل حامل ویتامین A پالمیتات. رساله دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

حسن فامیان ف و پزشکی نجف‌آبادی ا، ۱۳۹۶. تولید نانوامولسیون حاوی لینولئیک اسیدکونژوگه (CLA) به روش تشکیل خود به خودی وغنی سازی شیر کم چرب پاستوریزه با آن. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱۴۵-۱۳۵ (۴)۲۷.

فرید آقایی س، قنبرزاده ب و همیشه کار ح، ۱۳۹۴. حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی اسید لینولئیک مزدوج ، بهینه‌سازی اندازهٔ ذرات بر اساس روش سطح پاسخ. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۴۵۶-۴۴۱ (۳)۲۵.

محمدحسنی ز، قنبرزاده ب، همیشه کار ح، رضایی مکرم ر، یار حسینی م.۱۳۹۲ نانولیپوزوم های حامل گاما اوریزانول تولیدشده به روش گرمایی اصلاح یافته: خواص گرمایی، بازده کپسول یشدن و رئومتری نوسانی. علوم و تکنولوژی پلیمر، ۴۲۵-۴۱۳۵ (۵)۲۶.

محمدی م، قنبرزاده ب، همیشه¬کار ح، رضایی مکرم ر ، محمدی¬فر، م ا،۱۳۹۲. ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D3 تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک=سونیکاسیون. علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۴، ۱۸۸-۱۷۵.

Babazadeh A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, 2017. Phosphatidylcholine-rutin complex as a potential nanocarrier for food applications. Juornal of Functional Foods 33:134-141.

De Vost P, Faas MM, Spasojevic M and SikkemaJ, 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International. Dairy Journal 20(4):292–302

Fatouros DG and Antimisiaris SG, 2002. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. Journal of colloid and interface science 251(2):271-277.

Ghanbarzadeh B, Babazadeh A, Hamishekar H, 2016. Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. Food Bioscience 15:126-135.

Ghanbarzadeh B, Bashiri S, Hamishekar H and Dehgannya J, 2015. The study of the colloidal properties of nano liposomes containing beta-carotene produced by thermal method. Iranian Food Science and Technology Research Journal 12(5):609-619.

Ghanbarzadeh B, Pezeshki A, Hamishekar H and Moghaddam M, 2015. Vitamin A palimitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation. Iranian Food Science and Technology Research Journal 12(2):261-275.

Gibis M, Zeeb B, Weiss J, 2014. Formation, characterization, and stability of hibiscus extract in multilayered liposomes. Food Hydrocolloids 38:28-39.

Gonnet M, Lethuaut L and Boury F, 2010. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. Journal of Controlled Release 146(3):276-290.

Hamishehkar H, Emami J, Rouholamini Najafabadi A, Gilani K, Minaiyan M, Mahdavi H, Nokhodchi A, 2009. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. Colloid Surface B 74:340–349.

Hasan M, Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyobb, M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E. Linder, M., Arab-Tehrany E, 2014. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemicalcharacterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferationM. International Journal of Pharmaceutics 461:519–528.

Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Keivani F, Pezeshki A, 2015. Phytosome and Liposome: The Beneficial Encapsulation Systems in Drug Delivery and Food application. Applied Food Biotechnology 2(3):17-27.

Keivani Nahr F, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Samadi Kafil H, 2018. Food grade nanostructured lipid carrier for cardamom essential oil: Preparation, characterization and antimicrobial activity. Journal of Functional Foods 40:1-8.

Keller, BC, 2001. Liposomes in nutrition. Trends in food science & technology 12(1):25-31.

Ko S, Lee, SCh, 2010. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. Africian Journal of Biotechnology 9: 6158-6161.

MacDonald H, 2003. Conjugated Linoleic acid and its association with Disease Prevention. Journal of the American College of Nutrition 19(2):111-117.

Nikbakht Nasrabadi M, Goli SAH and Nasirpour A, 2016. Stability assessment of conjugated linoleic acid (CLA) oil-in-water beverage emulsion formulated with acacia and xanthan gums. Food Chemistry 199:258-267.

Pezeshky A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Moghadam M, Babazadeh A., 2016. Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: preparation and characterization. Food Bioscience 13:49-55.

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 6:665–671.

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

Enrichment of low-fat pasteurized milk using conjugated linoleic acid (CLA) nanoliposome

A Marandi[1], M Mohammadi [2], I Fathollahi [3] and A Pezeshki Najafabadi [4] *

Received: April 28, 2018 Accepted: June 9, 2018
[1]MSc Gradudated, Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]PhD, Department of Food Science and Technology University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Lecturere, Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Mamaghan, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: Email:akram.pezeshki@tabrizu.ac.ir

Abstract
Encapsulation of hydrophobic nutraceutical compounds such as essential fatty acids in nanocarriers is an effective method for enrichment of low fat products and target delivery of them .In this research production of nano-liposome containing conjugated linoleic acid (CLA) by thin layer hydration – sonication method and then adding it to low-fat pasteurized milk, have been discussed. Nano liposome containing CLA were prepared by using 50-10 mg lecithin- cholestrol and the size of the particles was 76 nm with a distribution of 0.77. The produced nanoliposome was stable over storage time (30 days) and particles were in nanoscale size. Zeta potential values of particles were negative of nanoliposomes and increasing the time had significant effect on reducing the zeta potential of the samples. Nanoliposome was not opacity, but the increase in the percentage of cholesterol increased the sample turbidity. With the encapsulation of CLA in the nanoliposome, it was protected against oxidation and secondary oxidation products (malondialdehyde). The use of nanoliposomes was effective in maintaining the CLA against the heat treatment (pasteurization) in low-fat milk during storage. With the inference of the results, it can be used to enrich low-fat products by nanoliposome system in the further protection of CLA against environmental conditions.

Keywords: Conjugated linoleic acid, nanoliposome, low fat milk, gas chromatography