

**ANNA BRYŁA****WOJCIECH JUZWA****GRAŻYNA LEWANDOWICZ**

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## Kapsułkowanie soku z ziemniaka w liposomach\*

### Potato juice encapsulation into liposomes

Sok z ziemniaka jest surowcem o wielokierunkowej aktywności biologicznej obejmującej działanie przeciwzapalne w obrębie przewodu pokarmowego, działanie antyproliferacyjne w stosunku do komórek nowotworowych żołądka i jelit oraz stymulujące wzrost probiotycznych bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, przy jednoczesnym zahamowaniu rozwoju szkodliwych — *Clostridium perfringens* i *E. coli*. Wykorzystanie aktywności biologicznej soku z ziemniaka poprzez zastosowanie go do wzbogacania żywności może być ograniczone przez degradację substancji bioaktywnych wskutek działania światła, tlenu, czy interakcji z innymi substancjami znajdującymi się w matrycy produktu spożywczego. Proponowane rozwiązanie może stanowić zabezpieczenie soku z ziemniaka poprzez kapsułkowanie w liposomach. Celem pracy była ocena przydatności lecytyn różnego pochodzenia biologicznego do nanokapsułkowania hydrolizatu soku z ziemniaka metodą uwadniania cienkiego filmu. W procesie kapsułkowania stosowano sok z ziemniaka zatężony w przez kriokoncentrację, a następnie poddany proteolizie prowadzonej w reaktorze membranowym z ultrafiltracyjnym modułem separacyjnym. Hydrolizat rozcieńczono w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej i kapsułkowano w liposomach. Wytwarzanie liposomów realizowano metodą hydratacji cienkiego filmu. Oznaczano rozkład wielkości liposomów metodą dynamicznego rozpraszania światła oraz ich stabilność poprzez pomiar potencjału  $\zeta$ . Równocześnie badano morfologię otrzymanych nanokapsułek za pomocą cytometru przepływowego. Ponadto, określono wydajność kapsułkowania soku wewnątrz liposomów. Stwierdzono, że lecytyny sojowa i słonecznikowa mogą być zastosowane do nanokapsułkowania hydrolizatu soku ziemniaczanego. Lecytyna z żółtka jaj, ze względu na niezadawalającą wydajność kapsułkowania nie może być rekomendowana do tego procesu. Najwyższą wydajność kapsułkowania odnotowano przy zastosowaniu lecytyny słonecznikowej, jednak otrzymane liposomy charakteryzowały się niezadawalającą stabilnością. Do nanokapsułkowania hydrolizatu soku z ziemniaka należy rekomendować lecytynę sojową, która umożliwi uzyskanie trwałych liposomów z zadowalającą wydajnością, bez konieczności silnego rozcieńczenia hydrolizatu w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej. Wykazano, że tak otrzymana populacja liposomów jest homogeniczna zarówno pod względem wielkości jak i struktury nanokapsułek.

\* Praca została wykonana w ramach projektu nr POIG 01.01.02-00-061/09 pt. „Nowa żywność bioaktywna o zaprogramowanych właściwościach prozdrowotnych” realizowanego w Programie Operacyjnym Innowacyjna Gospodarka, 2007–2013

Redaktor prowadzący: Wojciech Nowacki

**Słowa kluczowe:** hydrolizat, liposom, nanokapsułka, sok z ziemniaka

The potato juice is a material of various biological activities. It reveals anti-inflammatory effect within gastrointestinal tract, as well as antiproliferative activity against stomach and intestine cancer cells. Moreover, it stimulates the growth of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, inhibiting the development of pathogens — *Clostridium perfringens* and *E. coli* at the same time. However, due to the high susceptibility of potato juice bioactive substances to degradation by light, oxygen and possible interaction in the food product, the use of potato juice for food products fortification may be limited. Encapsulation into liposomes may be the solution. The aim of this study was to evaluate the usefulness of lecithin of different biological origins for the encapsulation of potato juice into liposomes by a thin film hydration method. Prior to encapsulation process, potato juice was subjected to cryoconcentration and then to a proteolysis performed in a membrane reactor equipped with an ultrafiltration separation unit. The hydrolysate was diluted in phosphate buffered saline and encapsulated into liposomes. Liposomes were prepared by thin lipid film hydration technique. Size distribution of the obtained particles was determined by dynamic light scattering method as well as was their stability by the  $\zeta$  potential measurement. At the same time, the nanocapsules morphology was studied by flow cytometry. Additionally, the encapsulation process efficiency was evaluated. It was found that, both sunflower and soya lecithin may be used for potato juice hydrolysate encapsulation into liposomes. Egg yolk lecithin, due to the unsatisfactory encapsulation efficiency cannot be recommended for this purpose. The highest encapsulation yield was observed for sunflower lecithin, but the obtained liposomes were characterized by relatively low stability. Soy lecithin however, provided stable liposomes with a satisfactory efficiency, and without a necessity of a strong dilution of the hydrolysate in a phosphate buffer saline. It was shown that the obtained population of liposomes was homogeneous both in terms of size and structure of the nanocapsules.

**Key words:** hydrolysate, liposome, nanocapsule, potato juice

## WSTĘP

Sok z ziemniaka jest produktem ubocznym powstającym w procesie produkcji skrobi. Pomimo swej wysokiej wartości odżywczej jest uważany za materiał odpadowy, uciążliwy i trudny do zagospodarowania (Lubiewski i in., 2006). Tymczasem sok z ziemniaka jest surowcem o wielokierunkowej aktywności biologicznej. Najszerzej udokumentowane jest działanie przeciwzapalne w obrębie przewodu pokarmowego (Pouvreau i in., 2001; Ruseler-van Embden i in., 2004; Lewandowicz i in., 2014). Jest ono związane z działaniem antyproliferacyjnym w stosunku do komórek nowotworowych żołądka i jelit (Olejnik i in., 2011; Lewandowicz i in., 2012) bądź też ze stymulacją wzrostu probiotycznych bakterii *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, przy jednoczesnym zahamowaniu rozwoju szkodliwych — *Clostridium perfringens* i *E. coli* (Lee, 2005).

Najbardziej naturalnym sposobem wykorzystania aktywności biologicznej soku z ziemniaka wydaje się być jego zastosowanie do wzbogacania żywności (Kowalczewski i in., 2012 b). Jednak część związków bioaktywnych w nim zawartych może ulegać degradacji wskutek działania światła, tlenu, czy interakcji z innymi substancjami znajdującymi się w matrycy produktu spożywczego. Ponadto, przeciwutleniacze są adsorbowane jelitach w niewielkim stopniu, lub degradowane w procesie trawienia (Keller, 2001; Chen i in., 2009). Zwiększenie biodostępności oraz trwałości labilnych składników soku z ziemniaka można osiągnąć przez zakapsułkowanie ich wewnątrz liposomów. Liposomy są to bowiem sztuczne struktury kuliste (pęcherzykowe) zbudowane z

podwójnych warstw fosfolipidowych zawierające wewnątrz fazę wodną i będące również w fazie wodnej zawieszane. Są one nietoksyczne, biokompatybilne oraz charakteryzują się bardzo małymi rozmiarami (w granicach od 20 nm do  $> 1\mu\text{m}$ ). Mogą być zbudowane z jednej lub kilku dwuwarstw fosfolipidowych (Kozubek, 2004). Liposomy są rekomendowane głównie jako nośniki leków i składniki kosmetyków, jednak w ostatnich latach rośnie zainteresowanie zastosowaniem liposomów w wytwarzaniu żywności (Mozafari i in., 2008).

Pierwszy raz liposomy zostały opisane przez Banghama i współpracowników w 1965 roku. Przedstawiono wówczas metodę otrzymywania nanocząstek poprzez uwadnianie cienkiego filmu fosfolipidowego (Bangham i in., 1965). Następnie, opracowano wiele technik zarówno otrzymywania liposomów jak i obróbki mającej na celu redukcję ilości dwuwarstw budujących liposom i ujednoczenie rozkładu rozmiaru otrzymanej populacji. Wśród nich warto wymienić sonikację (Papahadjopoulos i in., 1967), zamrażanie-rozmrażanie (Freezing and Thawing FAT) (Hope i in., 1986), hydratację-dehydratację (Shew i in., 1985). Metoda Banghama (uwadnianie cienkiego filmu fosfolipidowego) jest najprostszą i najczęściej stosowaną techniką otrzymywania liposomów (Meure i in., 2008). W kombinacji z procedurą FAT, pozwala uzyskać stosunkowo jednorodną populację pęcherzyków o zadowalających wartościach wydajności enkapsulacji (Hope i in., 1986).

Ze względu na niewielkie rozmiary liposomów ich badanie jest niezwykle trudne. Klasyczna mikroskopia optyczna jest nieprzydatna ze względu na niewystarczającą rozdzielczość tego typu przyrządów. Konieczne jest zastosowanie mikroskopów elektronowych, przy czym ze względu na ruchy Browna jakim podlegają liposomy najkorzystniejsze rezultaty uzyskuje się przy zastosowaniu techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej w zamrożeniu ciekłym azotem (Khosravi-Darani i in., 2007). Wśród metod fizykochemicznych najbardziej powszechnie stosowane jest badanie mobilności cząstek koloidalnych w polu elektrycznym oraz ich potencjału  $\zeta$ . (Wagner i in., 2002; Vorauer-Uhl i in., 2002; Jaafar-Maalej i in., 2011). Jest to związane z tym, że źródłem stabilności liposomów w dyspersji wodnej, jest obecność ładunków na powierzchni ich cząstek. Ładunek ten powoduje powstanie atmosfery jonowej podobnej do tej jaka tworzy się wokół jonów. Jony gromadzą się wokół liposomów tworząc podwójną warstwę elektryczną. Promień sfery, która zawiera wewnętrzną, sztywną warstwę jonów, ściśle przylegających do powierzchni liposomów, nazywa się promieniem ścinania. Potencjał elektryczny w odległości równej promieniowi ścinania, liczony względem potencjału w punkcie odległym od cząstki znajdującym się w głębi roztworu, nazwa się potencjałem  $\zeta$  lub potencjałem elektrokinetycznym (Atkins, 2007). Potencjał  $\zeta$  nie jest mierzony bezpośrednio, jest natomiast obliczany z zastosowaniem modeli teoretycznych na podstawie pomiarów elektrokinetycznych (Delgado i in., 2005). Generalnie pomiary elektrokinetyczne są źródłem informacji na temat rozmiarów i stabilności cząstek rozproszonych w układach koloidalnych.

Alternatywą dla pomiarów elektrokinetycznych jest zastosowanie do badania liposomów cytometrii przepływowej. Technika ta umożliwia analizę ilościową i jakościową małych obiektów, głównie komórek mikroorganizmów, przepływających przez komorę pomiarową i skanowanych promieniem lasera. Analiza cytometryczna dostarcza informacji

o morfologii obiektów zarówno w aspekcie ich wielkości jak i struktury. Jest to możliwe dzięki równoczesnej rejestracji światła rozproszonego, mierzonego w przedłużeniu promienia lasera (forward scatter channel — FSC) i pod kątem 90° do promienia lasera (side scatter channel — SSC). Dodatkowe informacje można uzyskać dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych wykazujących zróżnicowane powinowactwo do poszczególnych elementów strukturalnych komórek. Wyniki badań uzyskane metodą cytometrii przepływowej stanowią konkluzje wynikające z wielowymiarowej analizy statystycznej cech komórek w badanej próbce. Są one zwykle przedstawiane w postaci jedno-, dwu- lub trójwymiarowych histogramów będących graficznym sposobem przedstawiania rozkładu empirycznego cech badanych komórek.

Cytometria przepływowa stosowana do badania liposomów umożliwia oszacowanie ilości fosfolipidu budującego pęcherzyk, ilość zakapsułkowanej substancji, strukturę liposomu, wielkość oraz rozkład tych cech w populacji (Sato i in., 2006).

Tworzenie się, struktura i stabilność powstających liposomów zależą od szeregu czynników związanych zarówno z kapsułkowanym materiałem, rodzajem fosfolipidów tworzących dwuwarstwę oraz warunków środowiskowych takich jak np. pH oraz siła jonowa. Ze względu na wielość czynników decydujących o efektywności procesu nanokapsułkowania w opisanym w pracy eksperymencie zdecydowano o użyciu przetworzonego i wystandaryzowanego surowca jakim jest hydrolizat skoncentrowanego soku z ziemniaka. Za użyciem hydrolizatu przemawiał również fakt iż aktywność biologiczna soku z ziemniaka zwiększa się wskutek hydrolizy frakcji białkowej (Kowalczewski i in., 2012 a).

Celem pracy była ocena przydatności lecytyn różnego pochodzenia biologicznego do nanokapsułkowania hydrolizatu soku z ziemniaka metodą uwadniania cienkiego filmu w kombinacji z procedurą wielokrotnego zamrażania i rozmrażania. Oznaczano efektywność kapsułkowania oraz wielkość, stabilność i jednorodność populacji powstających liposomów.

## MATERIAŁY I METODY

### **Przygotowanie hydrolizatu soku z ziemniaka**

Materiał przeznaczony do enkapsulacji stanowił hydrolizat enzymatyczny soku z ziemniaka. Sok ziemniaczany pozyskano z Zakładu Produkcyjnego w Stawie należącego do Wielkopolskiego Przedsiębiorstwa Przemysłu Ziemniaczanego w Luboniu. Surowcem do otrzymywania hydrolizatu był sok pięciokrotnie zatężony w procesie kriokoncentracji, a sam proces hydrolizy enzymatycznej prowadzono w reaktorze membranowym wyposażonym w ultrafiltracyjny moduł separacyjny. Metodyka procesów kriokoncentracji i hydrolizy została opisana przez Lewandowicz i współpracowników (Lewandowicz i in., 2010, 2012). Otrzymany produkt o stężeniu ekstraktu 30,5° Brix był kierowany do bioreaktora III (New Brunswick Scientific Co., Inc. USA) z membraną ceramiczną firmy Tami o punkcie odcięcia 5 kDa i powierzchni filtracyjnej 0,06 m<sup>2</sup>. Ustalono pH na poziomie 8,0, temperaturę 30°C, po czym dodawano enzym Alcalase 2,4L FG. Hydrolizę prowadzono w sposób ciągły.

### **Przygotowanie liposomów**

Do wytworzenia otoczek nanokapsułek liposomowych wykorzystano handlowe lecytyny dostarczone na nośniku skrobiowym: sojową (Soy Lecithin, Adlec), słonecznikową (Lecisol, Hortomex), z żółtka jaja kurzego (l-alfa lecytyna granulowana, Across).

Liposomy wytwarzano metodą uwadniania cienkiego filmu lipidowego (Bangham i in., 1965). W tym celu przyrządzano 1,13% roztwory lecytyn w chloroformie. Następnie rozpuszczalnik organiczny odparowywano na wyparce próżniowej (Laborata 4000 Efficient, Heidolph). Powstały suchy film lipidowy kierowano do procesu uwadniania będącego właściwym etapem formowania nanokapsułek liposomowych.

W celu zachowania właściwej, dla stabilności liposomów siły jonowej środowiska w procesie uwadniania stosowano hydrolizat soku z ziemniaka rozcieńczony w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej, zwyczajowo zwanym buforem PBS 1 × stężonym (1 × PBS). Stosowano trzy rozcieńczenia: dziesięciokrotne oznakowano jako I, stukrotne jako II i tysiąckrotne jako III. Proces uwadniania prowadzono w temperaturze  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , w czasie  $t = 2$  godz. Ponieważ w procesie uwadniania następowało wytrącanie nośnika skrobiowego, w celu jego oddzielenia od dyspersji liposomowej próby wirowano w czasie  $t = 4$  min., przy 2,5 tys. rpm (Mini Spin, Eppendorf), a następnie pobierano supernatant, a osad odrzucano.

W celu ujednoczenia populacji liposomów oraz zmniejszenia liczby dwu warstw fosfolipidowych otrzymane dyspersje poddawano dziesięciu cyklom zamrażania w ciekłym azocie i rozmrażania w łaźni wodnej  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Oznaczenie wydajności kapsułkowania**

Do oddzielania liposomów od niezakapsułkowanego hydrolizatu zastosowano metodę opracowaną przez Ruyschaert i in. (2005). Polega ona na oddzielaniu liposomów od substancji niezakapsułkowanych i potencjalnych zanieczyszczeń na drodze chromatografii żelowej. Stosowano złożę Sephadex G75 warunkujące optymalny rozdział przy stosunkowo niskim poziomie strat lipidu (Ruyschaert i in., 2005). Wykorzystano kolumnę chromatograficzną (Pharmacia Fine Chemicals) o objętości  $45\text{ cm}^3$ , równoważoną buforem 1 × PBS. Obecność liposomów w poszczególnych frakcjach weryfikowano poprzez pomiar absorpcji za pomocą spektrofotometru (Specord 205, Analytic Jena) przy długości fali  $\lambda = 340\text{ nm}$  umożliwiającej ocenienie stopnia zmętnienia próbek.

W celu wyznaczenia wydajności kapsułkowania przeprowadzono analizy metodą UV-Vis przy długości fali  $\lambda = 420\text{ nm}$  odpowiadającej maksimum absorpcji hydrolizatu soku z ziemniaka. Oznaczono absorbcję dla każdej z frakcji uzyskanej na drodze filtracji żelowej. Stosunek sumy wartości absorbcji frakcji bogatych w liposomy do sumy wartości absorbcji wszystkich frakcji, wyrażona w procentach, odpowiadała wydajności procesu enkapsulacji.

### **Elektrokinetyczne oznaczanie rozmiarów i stabilności liposomów**

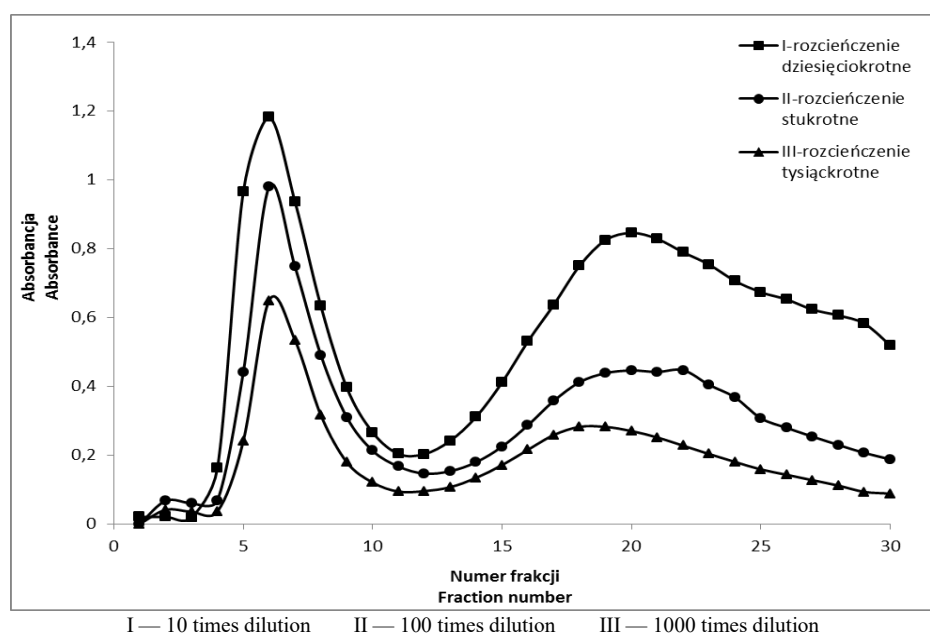
Połączone frakcje zawierające liposomy badano metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS-Dynamic Light Scattering) z wykorzystaniem aparatu Nano Series, Zeta Potential Analyzer. W analizie wyników zastosowano oprogramowanie stanowiące integralne wyposażenie analizatora i dostarczane przez producenta.

### Cytometria przepływowa

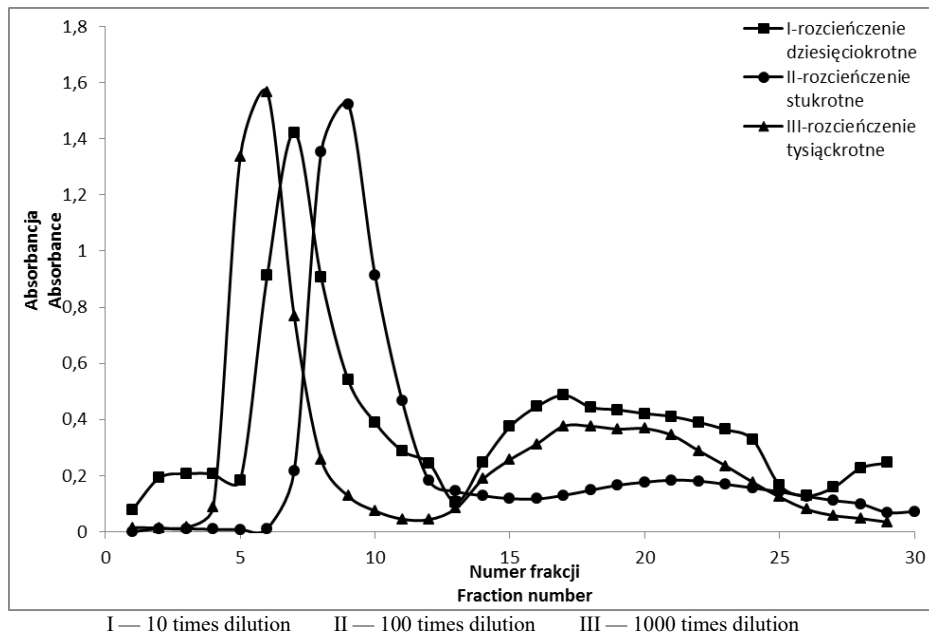
Do badań wykorzystano cytometr przepływowy z sorterem komórkowym BD FACS AriaTMIII firmy Becton Dickinson. Zastosowano barwniki fluorescencyjne: Thiazole Orange (TO, Sigma Aldrich) oraz DID (Lipophilic Carbocyanine DiIC<sub>18</sub>, Vybrant® Multicolor Cell-Labeling Kit DiD). Stanowią one unikalną kombinacji fluorochromów: wnikaącego do wnętrza liposomów TO (wykazującego zieloną fluorescencję) oraz wiążącego się z dwuwarstwą fosfolipidową DiD (charakteryzującego się czerwoną fluorescencją). Celem wybarwienia badanych obiektów pobierano 5  $\mu$ l DID na 1 ml próby i inkubowano przez 30 min w 37°C. Następnie, próby trzykrotnie wirowano przez  $t = 4$  min, 4 tys. rpm każdorazowo płucząc zawiesinę liposomów roztworem 1  $\times$  PBS. Przygotowywano 1  $\mu$ M roztwór TO w DMSO. Dodano 2  $\mu$ l roztworu TO na 1 ml próby i inkubowano 10 min w 37°C (Thermomixer Compact, Eppendorf).

### WYNIKI I DYSKUSJA

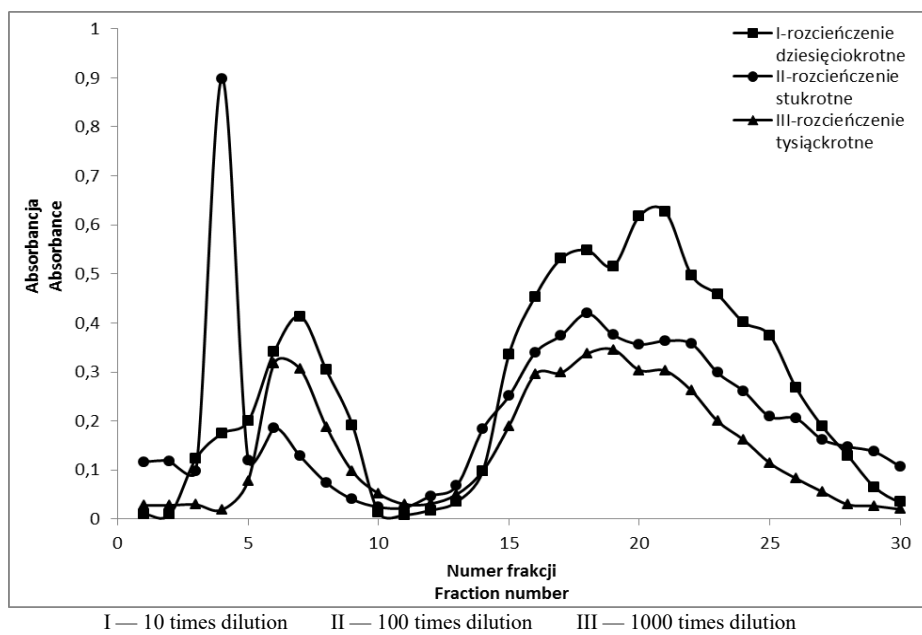
Przeprowadzone analizy z zastosowaniem filtracji żelowej (rys. 1–3), pozwoliły na zweryfikowanie czy w zastosowanym procesie uwodnienia cienkiego filmu trzech różnych lecytyn następuje formowanie liposomów.



Rys. 1. Zmętnienie frakcji prób uzyskanych z lecytyny sojowej  
 Fig. 1. Turbidity of the fractions for soy lecithin samples



Rys. 2. Zmętnienie frakcji prób uzyskanych z lecytyny słonecznikowej  
 Fig. 2. Turbidity of the fractions for sunflower lecithin samples



Rys. 3. Zmętnienie frakcji prób uzyskanych z lecytyny z żółtka jaja kurzego  
 Fig. 3. Turbidity of the fractions for egg yolk lecithin Samales

Zastosowana metodyka pomiaru (Ruysschaert i in., 2005) powodowała iż cząstki były eluowane z kolumny w zależności od rozmiaru: od największych, do najmniejszych, a pik pojawiający się na wykresach dla frakcji 5–10 odpowiada obecności liposomów. Wyższe wartości absorbancji dla frakcji >15 sugerują obecność niezakapsułkowanego hydrolizatu. Obliczone wartości wydajności kapsułkowania (tab. 1) wskazują, że najbardziej efektywnie proces ten przebiegał w przypadku lecytyny słonecznikowej. Wydajność kapsułkowania z zastosowaniem lecytyny słonecznikowej była około dwukrotnie wyższa niż dla lecytyny sojowej. W przypadku lecytyny z żółtka jaja wydajność była bardzo niska, zwłaszcza w przypadku bardziej stężonych roztworów hydrolizatu (próby I i II). Otrzymane wartości wydajności kapsułkowania z użyciem lecytyn sojowej, a zwłaszcza słonecznikowej, należy uznać za zadowalające ponieważ odpowiadają danym najczęściej przytaczanym w literaturze (Charcosset i in., 2005 oraz Jaafar-Maalej i in., 2005).

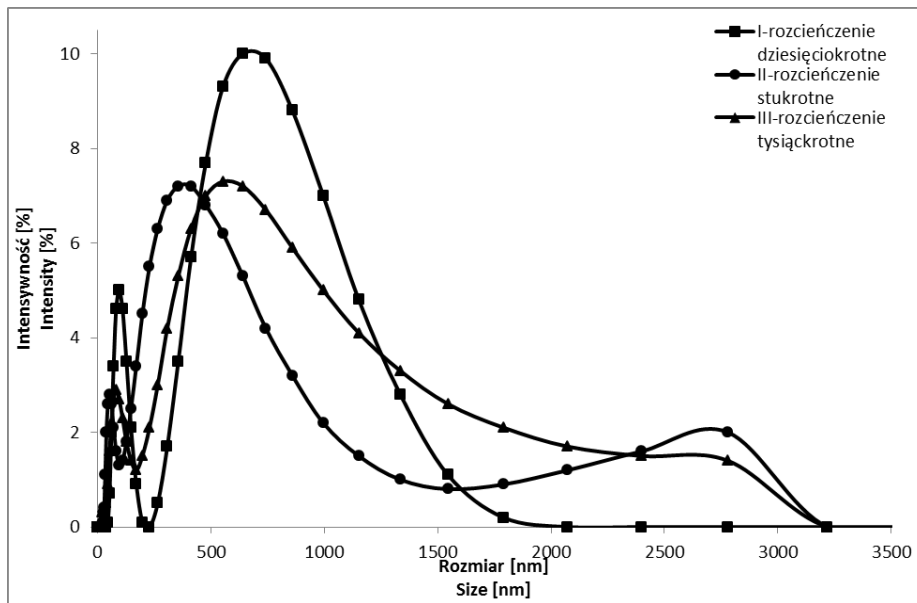
Tabela 1

**Podstawowa charakterystyka populacji liposomów**  
**The liposomes populations basic characteristics**

Pochodzenie lecytyny Origins of lecithin	Rozcieńczenie Dilution	Liczba zliczeń (kcps) Numer of counts (kcps)	Średni rozmiar (nm) Average size (nm)	Indeks polidispersyjności PDI Polydispersity index (PDI)	Potencjał Zeta (mV) ζ potential (mV)	Wydajność kapsułkowania (%) Encapsulation efficiency (%)
Soja Soybean	I	149,4	493,6	0,637	-31,2	36,11
	II	95,9	444,7	0,579	-30,5	33,18
	III	55,5	554,0	0,622	-30,9	29,43
Słonecznik Sunflower	I	118,3	413,2	0,587	-19,8	62,70
	II	216,6	550,0	0,539	-21	72,20
	III	223,2	387,6	0,614	-21,2	52,89
Żółtko jaja kurzego Egg yolk	I	23,0	229,2	0,475	-22,9	3,72
	II	9,4	223,9	0,475	-27,5	2,32
	III	26,2	426,4	0,958	-28,9	14,55

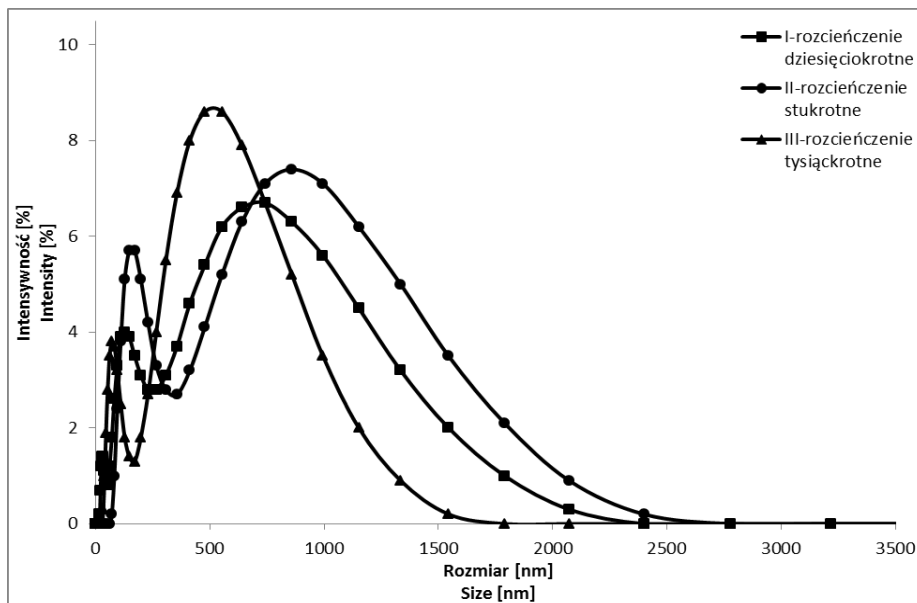
Pomimo iż wydajność kapsułkowania z zastosowaniem lecytyny żółtka jaja była niezadowalająca, do elektrokinetycznych badań stabilności liposomów zostały skierowane frakcje 5–10, zawierające liposomy. Wyniki przedstawiono na rysunkach 4–6 oraz w tabeli 1. W analizie danych przedstawionych graficznie należy wziąć pod uwagę, że intensywność sygnału uzyskana z aparatu Zeta Sizer nie zależy głównie od ilości cząstek obecnych w analizowanej próbce ale od ich wielkości. Stąd na rys. 4–6 możemy zaobserwować bardzo intensywne piki w zakresie powyżej 500 nm pomimo iż średnie wartości rozmiarów cząstek, obliczone przez oprogramowanie aparatu Zeta Sizer, przytoczone w tabeli 1 mieszczą się w granicach 230–550 nm. Obecność pików w zakresie powyżej 500 nm świadczy jedynie o obecności większych cząstek, niekorzystnie wpływających na jednorodność populacji liposomów. Na podstawie danych literaturowych, można wnioskować, że otrzymano głównie liposomy typu LUV (z ang. Large Unilamellar Vesicles) osiągające rozmiary >100 nm i zbudowane z jednej dwuwarstwy fosfolipidowej oraz DBV (z ang. Double Bilayer Vesicles) również osiągające rozmiary >100 nm, ale zbudowane z dwóch dwuwarstw fosfolipidowych (Kozubek, 2004). Oprócz głównej populacji zawierającej liposomy, zaobserwowano obecność drobnych zanieczyszczeń i większych cząstek (rys. 4–6).





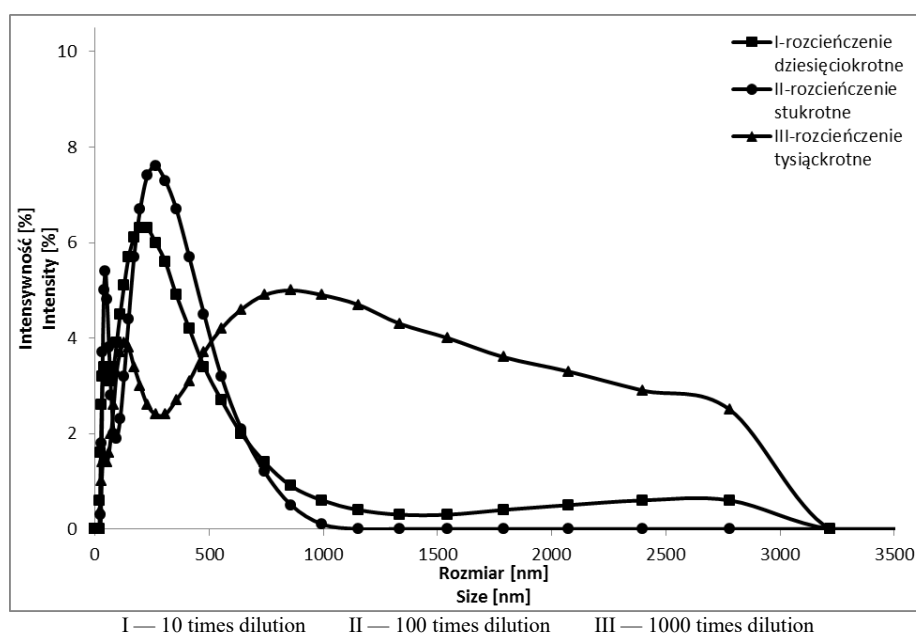
I — 10 times dilution    II — 100 times dilution    III — 1000 times dilution

**Rys. 4. Rozkład rozmiaru w populacji liposomów w lecytyny sojowej**  
**Fig 4. Size distribution for soy lecithin liposomes population**



I — 10 times dilution    II — 100 times dilution    III — 1000 times dilution

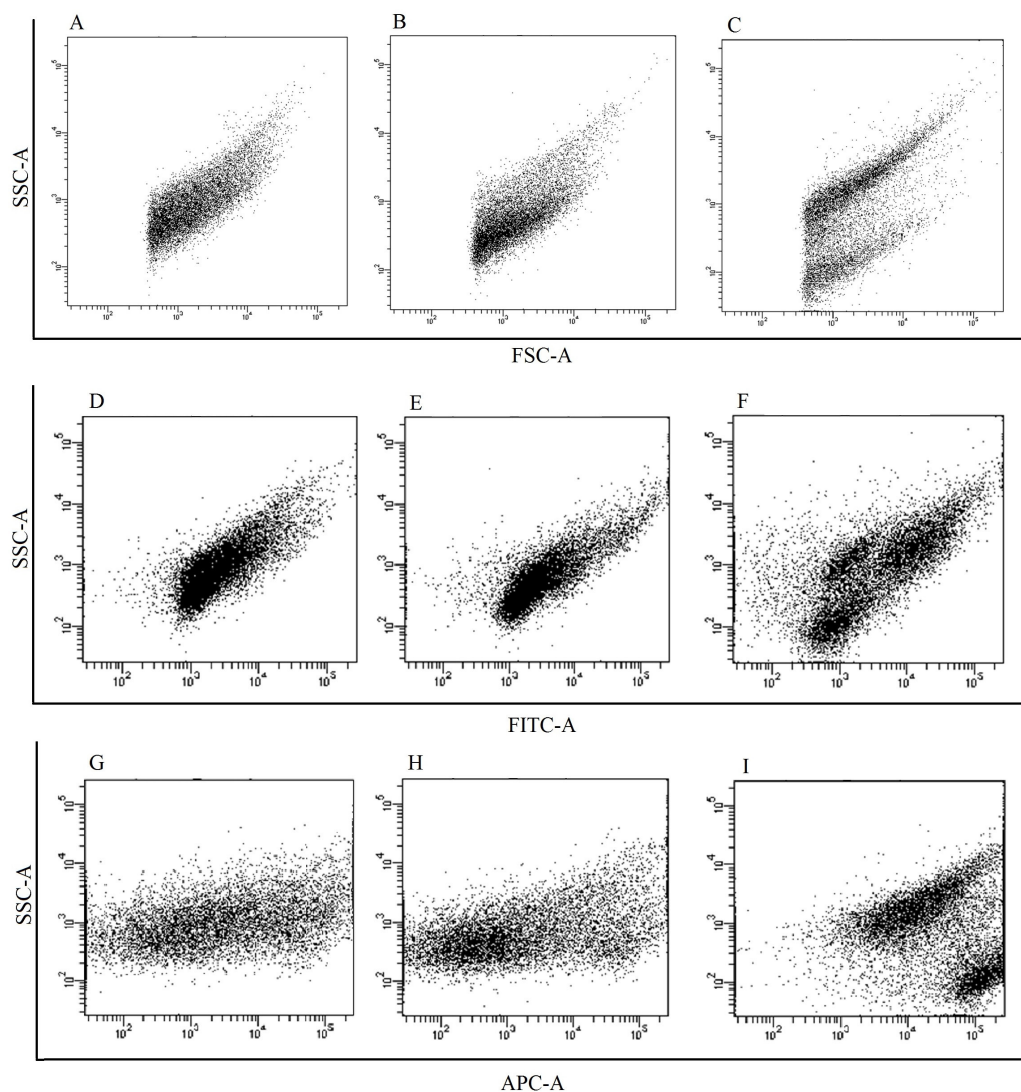
**Rys. 5. Rozkład rozmiaru w populacji liposomów w lecytyny słonecznikowej**  
**Fig. 5. Size distribution for sunflower lecithin liposomes population**



**Rys. 6. Rozkład rozmiaru w populacji liposomów w lecytyny z żółtka jaja kurzego**  
**Fig. 6. Size distribution for egg yolk lecithin liposomes population**

Bardzo ważnym parametrem oceny procesu kapsułkowania jest wartość potencjału  $\zeta$ , ponieważ określa on stabilność układu koloidalnego. Im wyższa bezwzględna wartość potencjału  $\zeta$ , tym większa stabilność dyspersji. W tym aspekcie najlepszą okazała się lecytyna sojowa, ponieważ bezwzględne wartości potencjału  $\zeta$ , bez względu na stopień rozcieńczenia hydrolizatu soku z ziemniaka były powyżej 30. Odpowiada to danym najczęściej przytaczanym w literaturze (Charcosset i in., 2005; Jaafar-Maalej i in., 2005). Sugeruje się, że poprzez modyfikację składu otoczki liposomów oraz optymalizację warunków procesu można dążyć do dalszego podwyższenia tych wartości (Wagner i in., 2006). W przypadku lecytyny słonecznikowej bezwzględne wartości potencjału  $\zeta$  były najniższe. Jest to prawdopodobnie związane z bardzo wysoką wydajnością procesu. Należy zwrócić uwagę, że wartość potencjału  $\zeta$  liposomów wytworzonych z lecytyny sojowej była najwyższa w przypadku najbardziej stężonego roztworu hydrolizatu (wariant I), co wskazuje na szczególną przydatność tego surowca do nanokapsułkowania. Biorąc to pod uwagę jak również wydajność procesu kapsułkowania i jednorodność populacji liposomów oraz ich trwałość do badań metodą cytometrii przepływowej skierowano jedynie liposomy z lecytyny sojowej.

Wyniki uzyskane z zestawienia sygnałów otrzymanych z FSC, SSC (detektorów światła rozproszonego) oraz obydwu detektorów zielonej i czerwonej fluorescencji (rys. 7A, D, G) wskazują, że najbardziej homogeniczną zarówno pod względem struktury jak i rozmiaru była populacja liposomów uzyskana w wyniku kapsułkowania najbardziej stężonego roztworu hydrolizatu (rozcieńczenie I, rys. 7 A).



**Rys. 7. Dwuwymiarowe histogramy populacji liposomów otrzymanych z użyciem lecytyny sojowej**

A, B, C — rozcieńczenie I; D, E, F, — rozcieńczenie II, G, H, I, — rozcieńczenie III

SSC-A — boczny detektor światła rozproszonego

FSC-A — przedni detektor światła rozproszonego

FITC-A — sygnał zielonej fluorescencji

APC-A — sygnał czerwonej fluorescencji

**Fig. 7. Two dimensional histograms of population of liposomes obtained using soy lecithin**

A, B, C — dilution I; D, E, F, — dilution II, G, H, I, — dilution III

SSC-A — Side Scatter Channel

FSC-A — Forward Scatter Channel

FITC-A — green fluorescence signal

APC-A — red fluorescence signal

Tylko nieco gorszą homogennością charakteryzowała się populacja liposomów otrzymana w wyniku kapsułkowania stukrotnie rozcieńczonego hydrolizatu (rozcieńczenie II, rys. 7D). Kapsułkowanie najsilniej rozcieńczonego soku skutkowało powstaniem dwóch populacji różniących się przede wszystkim strukturą (rozcieńczenie III, rys. 7G). Intensywność zielonej fluorescencji, rejestrowanej przez detektor zielonej fluorescencji (FITC-A) (rys. 7B, E, H) jest ściśle uzależniona od stopnia wybarwienia analizowanych cząstek fluorochromem TO. Barwnik ten wykazuje powinowactwo do wody, zatem sygnał będzie tym silniejszym, im więcej przestrzeni wodnej w liposomie. Silny, skoncentrowany sygnał obserwowano dla rozcieńczenia I (rys. 7 B) co świadczy o występowaniu cząstek o zbliżonej ilości przedziałów oraz ilości zakapsułkowanego hydrolizatu. Mniejszy, ale także skoncentrowany sygnał odnotowano dla rozcieńczenia II (rys. 7 E). W przypadku kapsułkowania najbardziej rozcieńczonego hydrolizatu (rozcieńczenie III, rys. 7 H) zaobserwowano trzy populacje o różnej wielkości i intensywności, co świadczy iż powstały wówczas liposomy o odmiennej strukturze i o odmiennej ilości dwuwarstw fosfolipidowych (rys. 7 H). Obserwacje te są w zgodzie z otrzymanymi wartościami wydajności procesu enkapsulacji największymi odpowiednio dla próby wariantu I, II i III (tab. 1).

Stopień intensywności sygnału czerwonej fluorescencji (APC-A), wskazuje na ilość fosfolipidu w cząstce, ponieważ barwnik ten wykazuje powinowactwo do lipidów. Przeprowadzona analiza wskazuje, że w przypadku najniższego rozcieńczenia hydrolizatu (rozcieńczenie I, rys. 7 C) uzyskano najbardziej homogeniczną populację liposomów. Rozcieńczenie II (rys. 7 F) wykazywało podobny rozkład ilości fosfolipidu w populacji liposomów. Należy zauważyć, że w obydwu przypadkach zaobserwowano szeroki rozrzut cech w ramach populacji (rys. 7 C i F). W przypadku najsilniejszego rozcieńczenia kapsułkowanego hydrolizatu soku z ziemniaka zaobserwowano występowanie dwóch odrębnych populacji, różniących się zawartością fosfolipidu (rys. 7 I). Podsumowując wyniki badania metodą cytometrii przepływowej należy stwierdzić, że potwierdzają one wnioski uzyskane z badań elektrokinetycznych wskazując równocześnie, że najlepsze rezultaty uzyskuje się w przypadku słabo rozcieńczonego hydrolizatu soku ziemniaczanego.

#### WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

- lecytyny sojowa i słonecznikowa mogą być zastosowane do nanokapsułkowania hydrolizatu soku ziemniaczanego;
- lecytyna z żółtka jaj, ze względu na niezadowalającą wydajność kapsułkowania nie może być rekomendowana do tego procesu;
- najwyższą wydajność kapsułkowania odnotowano przy zastosowaniu lecytyny słonecznikowej, jednak otrzymane liposomy charakteryzowały się niezadowalającą stabilnością;
- do nanokapsułkowania hydrolizatu soku z ziemniaka należy rekomendować przede wszystkim lecytynę sojową, która umożliwi uzyskanie trwałych liposomów z

zadowalającą wydajnością, bez konieczności silnego rozcieńczenia hydrolizatu w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej. Wykazano, że tak otrzymana populacja liposomów jest homogeniczna zarówno pod względem wielkości, jak i struktury nanokapsulek.

## LITERATURA

- Atkins W. A. *Chemia fizyczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
- Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 13 (1): 238 — 252.
- Charcosset C., El-Harati A., Fessi H. 2005. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor, *J of Controlled Release*, 108: 112 — 120.
- Chen Y., Lu Y., Chen J., Lai J., Sun J., Hu F., Wu W. 2009. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt, *Int. J. Pharm.* 376: 153 — 160.
- Delgado A.V., González-Caballero F., Hunter R.J., Koopal L.K., Lyklema J. 2005. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC Technical Report). *Pure & Applied Chemistry* 77 (10): 1753 — 1805.
- Hope M. J., Bally M. B., Webb G., Cullis P. R. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. characterization of size, distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta* 812: 55 — 65.
- Jaafar-Maalej C., Charcosset C., Fessi H. 2011. A new method for liposome preparation using a membrane Contactor. *J. Liposome Res.* 21 (3): 213 — 220.
- Keller B.C. 2001. Liposomes in nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* 12: 25 — 31.
- Khosravi-Darani K., Pardekhty A., Homerpishek H., Rao M., Mozafari M. R. 2007. The role of high-resolution imaging in the evaluation of nanosystems for bioactive encapsulation and targeted nanotherapy. *Micron.* 38: 804 — 818.
- Kowalczewski P., Celka K., Białas W., Lewandowicz G. 2012a. Antioxidant activity of potato juice. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11 (2): 175 — 181.
- Kowalczewski P., Lewandowicz G., Makowska A., Olejnik A., Obuchowski W. 2012b. Charakterystyka ekstrudowanych przekąsek zbożowych zawierających sok z ziemniaka. *Biul. IHAR* 266: 319 — 329.
- Kozubek A. 2004. Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław. Dostępne na: <http://www.ibmb.uni.wroc.pl/studia/liposomes.pdf>.
- Lee, H. S. 2005. Clinical effects of intake of Juice valley and Gogu valley towards fecal microflora of healthy human volunteers. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 540 — 542.
- Lewandowicz G., Leja K., Lubiewski Z., Białas W., Dembczyński R. 2010. Wpływ obróbki wstępnej soku ziemniaczanego na przebieg hydrolizy enzymatycznej frakcji białkowej w reaktorze membranowym. W: *Membrany i Procesy Membranowe w Ochronie Środowiska. Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska* vol. 65: 363 — 371.
- Lewandowicz G., Kowalczewski P., Białas W., Olejnik A., Rychlik J. 2012. Rozdział frakcji soku ziemniaczanego różniących się masą cząsteczkową i charakterystyka ich aktywności biologicznej. *Biul. IHAR* 266: 331 — 344.
- Lewandowicz G., Kowalczewski P., Olejnik A., Jodynis-Liebert J., Kujawska M., Lesiecki M. 2014. Sposób otrzymywania preparatu z soku ziemniaka oraz jego zastosowanie. Zgłoszenie Patentowe PL nr P.406918 z dnia 24.01.2014.
- Lubiewski Z., Śmigielska H., Lewandowicz G., Balcerek W. 2006. Charakterystyka odcieku po koagulacji białka pozyskiwanego w toku kampanii krochmalniczej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* z. 511: 617 — 626.
- Meure L. A., Foster N. R., Dehghani F. 2008. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *AAPS Pharm Sci. Tech.* 9 (3): 789 — 809.
- Mozafari M. R., Khosravi-Darani K., Borazan G. G., Cui J., Pardakhty A., Yurdugul S. 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11: 833 — 844.

- Olejniak A., Białas W., Tomczyk J., Lewandowicz G. 2011. Cytotoksyczność i genotoksyczność soku z ziemniaka. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu* 205: 118 — 125.
- Papahadjopoulos D., Miller N. 1967. Structural characteristics of hydrates liquid crystals. *BBA*. 75067: 624 — 638.
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S.R., van den Broek A. M., van Koningsveld G. A., Voragen A. G. J. 2001. Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2864 — 2874.
- Ruseler-van Embden J. G. H., van Lieshout L. M. C., Laman J.D. 2004. Methods and means for preventing or treating inflammation or puritis, Patent USA 6:723,354.
- Ruyschaert T., Marque A., Duteyrat J. L., Lesieur S., Winterhalter M., Fournier D. 2005. Liposomes retention in size exclusion chromatography. *BMC Biotechnology* 5 (11).
- Sato K., Obinata T., Sugawara., Urabe I., Yomo T. 2006. Quantification of structural properties of cel-sized individual liposomes by flow cytometry. *J Biosci Bioeng*, 102 ( 3): 171 — 178.
- Shew. R. L., Deamer D. W. 1985. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* 816: 1 — 8.
- Wagner A, Vorauer-Uhl K., Katinger H. 2002. Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54: 213 — 219.
- Wagner A., Platzgummer M., Kreismayr G., Quendler H., Stiegler G., Ferko B., Vecera G., Vorauer-Uhl K., Katinger H. 2006. GMP Production of liposomes-a new industrial approach. *J Liposome Res.* 16: 311 — 319.
- Vorauer-Uhl K., Wagner A., Katinger H. 2002. Long term stability of rh-Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD)-liposomes prepared by the cross-flow injection technique following International Conference on Harmonisation (ICH)-guidelines. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54: 83 — 87.