

Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi

Emrah Kırtıl, Mecit H. Öztop ✉

Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 06800 Ankara

Geliş Tarihi (Received): 23.07.2014, Kabul Tarihi (Accepted): 22.09.2014

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): mecit@metu.edu.tr (M.H. Öztop)

☎ 0 312 210 56 32 📠 0 312 210 27 67

ÖZET

Lipozomlar farmasötik uygulamalar başta olmak üzere yıllardır birçok uygulamada kapsülasyon maddesi olarak kullanılan çift katmanlı polar lipidlerden oluşan keseciklerdir. Doğal fosfolipit kompozisyonları olan lesitinlerden elde edilen bu keseciklerin gıdalarda kullanımı son yıllarda artış göstermiştir. Lipozomların gıdalarda kullanımı sonucunda kapsüllenmiş maddenin stabilitesini artırması ve bu maddenin bulunduğu ortamdaki diğer maddelerle etkileşimini minimize etmesi gibi faydalarının yanı sıra; diğer kapsülasyon maddelerine kıyasla oluşturulma metotlarının basitliği, tamamen doğal bileşiklerden oluşturulması gibi özellikleri, lipozomları birçok enkapsülasyon sisteminden ayıran belirgin özelliklerdir. Ancak lipozomların gıda uygulamalarında kullanılan yüksek sıcaklık, basınç, pH ekstremeleri ve fiziksel karıştırma gibi stres koşulları karşısında stabilitesini koruyabilmesi zordur. Bu konuda süregelen araştırmalar, lipozom stabilitesinin artırılması için uygulanabilecek metotların varlığını göstermiştir. Bu derleme, gıda bilimi konusunda çalışan araştırmacılara, lipozomların yapısı, kullanımının sağladığı avantajlar, oluşturma metotları, karakterizasyonu, stabilize sorunları ve gıdalarda uygulama alanlarıyla ilgili bilgi vermek ve lipozomları bir kapsülasyon maddesi olarak kullanmak amacıyla olan araştırmacılara da yol gösterecek bir kaynak olmayı hedeflemiştir.

Anahtar Kelimeler: Lipozom, Lesitin, Nanoemülsiyon, Karakterizasyon, Kapsülasyon

Liposomes as an Encapsulation Agent for Food Applications: Structure, Characterization, Manufacture and Stability

ABSTRACT

Liposomes are polar lipid bilayers vesicles used in pharmaceutical applications for years. These spherical vesicles are manufactured from natural phospholipid compositions known as lecithins. Their utilization in foods have recently attracted some interest. Using liposomes as encapsulating agents in foods provides a number of advantages like increased stability for the active agent and minimized interaction of capsuled material with the surrounding medium. However, what sets liposomes apart from other encapsulation agents is the ease of capsulation and its natural composition. Nevertheless, the fragile nature of liposomes poses some challenges with their use under extremes of temperature, pH or pressure. Studies have shown that a number of methods could help to increase liposomes' stability. This review is written with the purpose of providing food scientists, who plan to use liposomes as an encapsulation agent, with a Turkish source covering the chemical and physical structure of liposomes, the advantages they provide, production and characterization methods, stability issues, and their use in food related applications.

Key Words: Liposomes, Lecithin, Nanoemulsion, Characterization, Capsulation

GİRİŞ

Lipozomlar hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşiklerin kapsüle edilmesi amaçlı farmasötik, kişisel bakım, kimya ve gıda endüstrisinde kullanılan; polar lipitlerden oluşan iki tabakalı küresel lipit kesecikleridir. Polar lipitlerin su gibi polar bir ortamda dispers edilmeleri sonucunda oluşur [1, 2]. Polar lipitlerin doğadaki başlıca kaynakları; yumurta, soya ve ayçiçek lesitindir. Bu lesitinler yıllardır gıdalarda emülgatör veya yapı modifiye ajanı olarak kullanılmaktadır ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre *Genellikle Emniyetli Kabul Edilebilen* (GRAS) kategorisindedir [3, 4]. Lesitinlerin çift katmanlı küresel bir yapı oluşturacak şekilde bir araya gelmesiyle oluşan lipozomlar içlerine hem su hem de yağda çözülebilen fonksiyonel bileşenleri kapsüle edebilmesi açısından önemlidir [1, 3]. Fonksiyonel bileşenlerin lipozomlar içine hapsedilmesinin, kapsüllenen maddenin stabilitesini artırdığı, ortamla etkileşimini ortadan kaldırdığı, böylece normalde bozulmasına neden olacak ortamlarda daha uzun süre aktivitesini koruyabildiğini göstermiştir [5].

Lipozomlar, çapı 20 nm'den 20 µm'ye kadar değişen boyutlarda olabilirler [6]. Kesecikler bir veya birden fazla çift tabakalı membranlar halinde bulunabilirler. Bu çift katmanlı polar lipit yapılarıyla hücre membranlarının lipit bölümüne benzerlik gösterirler. Bu nedenle lipozomların araştırmalar için önceleri birincil incelenme nedeni hücre membranları için model bir sistem özelliği taşımalarıydı. Hücre membranı davranışını benzeştirme özelliği, lipozomların farmasötik uygulamalarda, (tümörlü hücreler gibi) belirli bir hedefe yönelik ilaç salınımında kullanımını sağlamıştır [7-9]. Son yıllarda; biyolojik, biyokimyasal, zirai ve gıda alanlarında da lipozomların birçok farklı aktif ajanın kapsüle edilmesi için ideal sistemler olduğu görülmüştür. Enzimler, antimikrobiyal maddeler ve antioksidanlar kapsüllenen maddelerden bazılarıdır [10-15].

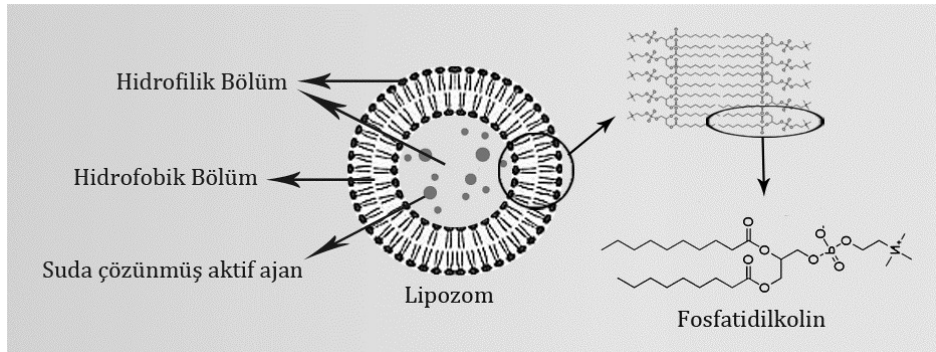
Gıda alanında lipozomların kullanımı endüstride pek yaygın olmamakla birlikte, konudaki araştırmalar son yıllarda artış göstermiştir. Lipozomların gıda endüstrisinde yaygın olmamasının nedenleri arasında, lipozomların gıda içindeki diğer bileşenlerle etkileşiminin pek bilinmemesi ve lipozom oluşumunun, hem hammadde hem de üretim açısından maliyetli bir prosedür olması sayılabilir. Ancak lipozomların fizikokimyasal özellikleri, kinetik ve termodinamik

stabiliteyi, gıda ile etkileşimi gibi fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasıyla ve kesintisiz yüksek basınç homojenizasyonu, ekstrüzyon filtreleme gibi gelişen üretim teknolojileriyle beraber; lipozomların antimikrobiallerin, aroma maddelerinin sağlığa olumlu etkileri kanıtlanmış aktif ajanların iletimi amaçlı fonksiyonel gıda üretiminde kullanımı daha uygulanabilir bir hale gelmiştir [1, 16-22].

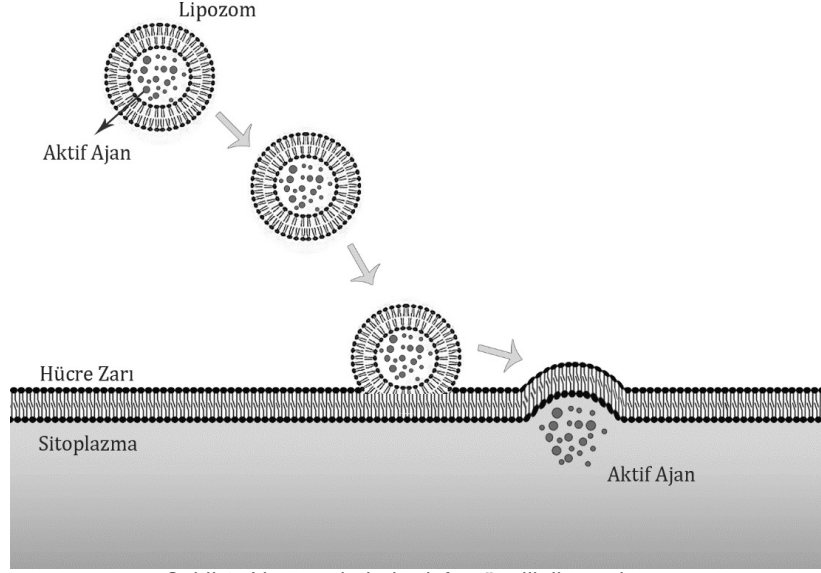
Lipozomlarla Kapsülasyonun Avantajları

Lipozomlarla kapsüllenen ajanların, içinde buldukları sistemle etkileşimlerinin kesilmesi sayesinde dış ortam etkisi ile gerçekleşebilecek bozunma reaksiyonlarını engellediği ve yine aktif ajanların ortama kontrollü salınımının gerçekleştirilebildiği, bu sayede kapsüllenen antimikrobiyal, antioksidan, vitaminler gibi bileşiklerin pastörizasyon, kurutma, pişirme, kızartma gibi işlemlere daha dayanıklı oldukları gözlemlenmiştir [1, 16, 23, 24]. Gıdalarda kontrollü salınım amaçlı da kullanılan lipozomlar, yüksek miktarlarda tüketildiğinde toksik etki gösteren A vitamininin kapsülasyonunda kullanıldığında, bu etkiyi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [25].

Lipozomları diğer kapsülasyon ajanlarından ayıran en önemli özelliği hücre membranına olan yapısal benzerliğidir. Bu özelliği sayesinde; *hücre içi* çalışmalarda bazı biyoaktif ajanların vücutta spesifik alanlara (hücrelere) dağıtımını ve salınımını gerçekleştirilebildiği görülmüştür (Şekil 1) [3, 7, 8]. Lipozomların bu özgün yapısı, bu nanopartiküllerin kanla taşınımı sonucunda hücreler arası alana girmesine olanak sağlar. İstenilen şekilde tasarlanmış lipozomlar, Şekil 2'de görüldüğü gibi hücrelerle iletişim içine girdiklerinde, hücreyle birleşerek içlerindeki ilacın tamamını hücre sitoplazmasına salırlar [1, 7, 8, 16, 26]. Bu özellik sadece farmasötik uygulamalarda değil, gıda uygulamalarında da fonksiyonel ajanların biyoyararlanımını artırmak amaçlı kullanılabilir. Oral uygulamalarda lipozomla kapsüllemiş aktif ajanın biyoyararlanımının arttığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni olarak lipozomların hücre zarına benzerliğinin yanı sıra; lipozomlarla kapsüllemiş ajanların sindirim sistemi içerisinde dış etkilerden korunarak kana karışana dek bozunumunun engellenmesi gösterilmiştir [25, 27, 28].



Şekil 1. Temsili bir lipozom görüntüsü



Şekil 2. Lipozomlarla hedefe yönelik ilaç salınımı

Lipozomların kapsülasyon maddesi olarak tercih edilmelerinin ön önemli nedeni; tamamen biyo-uyumlu, biyo-bozunur olmaları, toksik etkilerinin olmaması ve istenildiğinde kapsüllenmiş maddeyi salılabilmeleriyle açıklanabilir [2, 3, 5].

Lipozomların en büyük avantajlarından biri doğada var olan bileşenlerden yapılabiliyor olmalarıdır. Bu da gıdalarda kullanımında herhangi bir yasal düzenlemeyle karşılaşılmasını engeller [1]. Ayrıca lipozomlar; daha önce de bahsedildiği gibi hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin kapsüle edilmesi için kullanılabilir, hatta aynı anda çift enkapsülasyon sistemi görevi görebilir [2, 3, 6]. Polimer bazlı olmadıklarından ve oluşumlarında lesitin konsantrasyonu çok düşük olduğundan, diğer birçok kapsülasyon ajanının aksine koyuldukları eklendikleri sistemin reolojik özelliklerini değiştirmezler [29].

Lipozomların Kullanımında Karşılaşılabilecek Sorunlar

Lipozomlar kırılğan parçacıklardır. Bu fiziksel instabilite yüzünden içlerinde kapsüle edilmiş olan maddeyi sızdırabilir ve kaybedebilirler [3]. Ayrıca lipozomlar kıvrımlı olmadıkları zaman en düşük enerji seviyesindedirler; bu nedenle ufak lipozomlar bir araya gelip birleşirler ve kıvrımlarını azaltırlar. Bu da lipozomların partikül boyutlarının zamanla artmasına ve bir süre sonra lipozomların çökelti oluşturup dispersiyondan ayrılmasına neden olur. Bu durum lipozomların termodinamik olarak stabil olmamasıyla açıklanır [3, 16, 30]. Düşük pH'li ortamlarda lipozomların yüzey yükünün azalması ile beraber bu davranışın daha yoğun görüldüğü gözlenmiştir [5]. Lipozomlar fiziksel

stabilitesini artırmak için başka polimerler ile bir arada kullanılabilirler. Bu konu ileride 'Lipozom Stabilitesinin Artırılması' isimli bölümde detaylı tartışılacaktır.

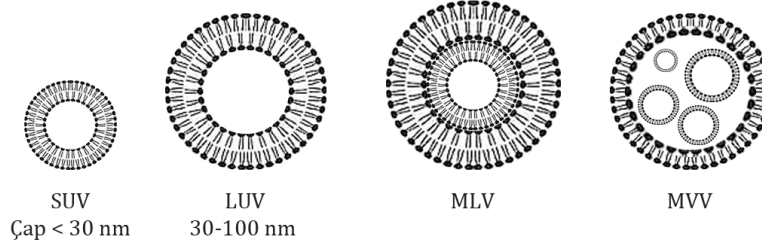
Kapsüllenen maddenin salınım hızının kontrol edilmesindeki zorluk da lipozom kullanımının bir başka sorunudur [16, 31]. Ayrıca, lipozom oluşumu için gerekli olan hammadde ve prosedürün nispeten yüksek maliyetli olması lipozomun gıda endüstrisinde kullanımını olumsuz etkileyebilecek nedenlerden biridir. Bu neden, alıcıların daha yüksek miktarlar harcamaktan çekinmediği farmasötik endüstrisini ise aynı oranda etkilememektedir [1, 16].

YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Fiziksel Yapı

Lipozomlar çift katmanlı yapı oluşturma özelliğine sahip amfifilik polar lipitlerin su gibi polar bir ortamda dağılması sonucunda oluşan yapılardır. Sıklıkla küre şekillilerdir ve bir veya birden fazla amfifilik membranların çiftli katmanlar halinde bir araya gelmesiyle oluşurlar [16, 32, 33].

Tek bir çift katmanlı yapıdan oluşan lipozomlar boyutlarına göre; *küçük tek katmanlı kesecikler* (çap < 30 nm) (SUVs) ve *büyük tek katmanlı kesecikler* (çapı 30-100 nm arası) (LUVs) olarak ayrılırlar. Birden fazla çift katman içeren lipozomlar ise; eğer tüm çift katmanlar ardarda sıralanmışsa *çok katmanlı kesecikler* (MLV), ya da farklı boyutlarda birden fazla çift katman başka bir çift katman tarafından kaplanmışsa *çoklu kesecikli kesecikler* (MVV) olarak adlandırılır (Şekil 3) [32, 33].



Şekil 3. Küçük ve büyük tek katmanlı kesecikler ile çok katmanlı ve çoklu kesecikli lipozomların şematik görüntüsü

300 nm'den büyük lipozomlar ışığı gözle görülebilecek kadar dağıtırlar ve böyle örneklerin bulutlu beyaz bir görüntüsü olur. Ancak 300 nm'den küçük boyutlarda lipozomlardan oluşan karışımlar, berrak ya da hafif mavimsi transparan bir görüntüde olurlar. Oluşum

sonrası ve depolama sırasındaki parçacık boyutu lipozomlar için önemli bir stabilite göstergesidir [16, 30]. Tablo 1'de farklı lipozom çeşitlerinin sınıflandırılması, karakteristik özellikleri ve oluşum metotları gösterilmiştir

Tablo 1. Lipozomların sınıflandırılması, oluşturulma yöntemleri ve karakteristik özellikleri [16, 32, 34]

| Lipozom Çeşidi | Oluşturma Yöntemleri | Karakteristik Özellikleri |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MLV | İnce-film kurutma/tekrar sulandırma | Oluşumu için düşük enerji yeterlidir. Yüksek kapsülasyon verimi. Basit hazırlanım ve malzeme ve ekipmanın düşük maliyeti. Maksimum depolama stabilitesi. |
| LUV | MLV'lerin membran ekstrüzyonu, ultrasonikasyon, yüksek basınç homojenizasyonu | Oluşumu için yüksek enerji gerekli değildir. Yüksek kapsülasyon verimi. SUV'lere kıyasla daha uzun depolama stabilitesi |
| SUV | MLV ve LUV'lerin membran ekstrüzyonu, ultrasonikasyon (uç veya banyo ile), MLV'lerin diyalizi, yüksek basınç homojenizasyonu | Daha yüksek homojenizasyon. Düşük kapsülasyon verimi. Berrak çözelti. |

Lipozomların iç bölümlerindeki boşlukta su vardır, iki katmanın arası ise hidrofobik özellik gösterir ve yağ gibi non-polar fazların saklanması için idealdir. Polar gruplar iç ve dış yüzeyle temas içindeyken, apolar gruplar çift katmanın iç tarafına doğru yön alırlar. Böylece hidrofobik bölümler içinde bulunduğu solüsyonla minimal derecede etkileşim içindeyken hidrofobik başlar solüsyona tam anlamıyla maruz kalmış durumdadır [1]. Bu nedenle lipozomların içi oluşturulduğu ortamla aynı kimyasal kompozisyona sahiptir, ve burada hidrofobik materyaller enkapsüle edilebilir. İki polar lipid katmanın arası ise non-polar bir özellik gösterir ve burası lipofilik materyallerin kapsülü için idealdir [3, 35]. Bu özellik sayesinde çift kapsülasyon sistemi kurularak; tek bir lipozomda hem hidrofobik (iç bölümde) hem de hidrofobik (iki polar lipid arası) ajanlar saklanabilir [2].

Kimyasal Yapı

Her ne kadar galaktolipitler gibi başka lipitler de dahil olabilese de, lipozomlar temel olarak fosfolipitlerden oluşur. Fosfolipitler ya sfingolipitler ya da fosfogliseratlar olarak bulunur [35, 36]. En yaygın bulunan fosfolipit, lesitin olarak da bilinen fosfatidilkolindir (PC) [37].

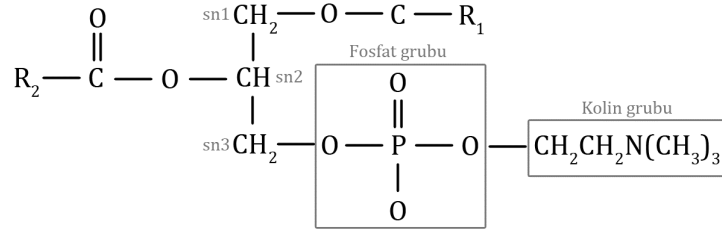
Şekil 4'te de görülebileceği gibi, PC sn-1 ve sn-2 pozisyonlarında gliserin tabanına ester bağlarıyla bağlı hidrokarbon zinciri varken, sn-3 pozisyonunda bir kolin gruba bağlı bir fosfat grubu bulunmaktadır. İki hidrokarbon zinciri hidrofobik kuyrukları oluştururken, fosfakolin ise polar başı oluşturur [36].

Çalışmalarda yoğun olarak kullanılan doğal fosfolipit kaynakları soya, yumurta ve ayçiçeği lesitini birden fazla farklı fosfolipitin birleşiminden oluşur; ancak bu lesitinlerin büyük bir miktarı (yaklaşık %75) fosfatidilkolin'den oluşur [3, 5]. Doğal kaynaklı lesitinler tohum ve çekirdeklerden yağ üretiminin degumming aşamasının bir yan ürünüdür ve tamamen saflaştırılmış (tek bir fosfolipitten oluşan) lesitinlerin aksine nispeten düşük maliyetli ve daha yaygındır [2].

Fosfolipit Çeşitleri

Lipozom oluşturmak için birçok farklı fosfolipit kullanılabilir. En çok kullanılan bazı doğal ve sentetik fosfolipitler Tablo 2'de gösterilmiştir;

Bu fosfolipitler jel-sıvı dönüşüm (transition) sıcaklığı, akışkanlık, yüzey yükü gibi özellikler açısından farklılık gösterirler [6, 37]. Tablo 3'te bazı fosfolipitlerin jel-sıvı dönüşüm sıcaklıklarının kıyaslaması verilmiştir.



Şekil 4. Fosfatidilkolin'in kimyasal yapısı

Tablo 2. Lipozom yapımında en çok kullanılan fosfolipitlerden bazıları [6]

| Doğal Fosfolipitler | Sentetik Fosfolipitler |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Fosfatidilkolin (PC) | Distearoylfosfatidilkolin (DSPC) |
| Fosfatidilserin (PS) | Dipalmitoylfosfatidilkolin (DPPC) |
| Fosfatidiletanolamin (PE) | Dimyristoylfosfatidilkolin (DMPC) |
| Fosfatidilgliserol (PG) | Dilaurylfosfatidilkolin (DLPC) |
| | Distearoylfosfatidiletanolamin (DSPE) |

Tablo 3. Farklı fosfolipitlerin jelden sıvı forma geçiş sıcaklıkları [6, 37]

| Lipit | Dönüşüm Sıcaklığı (°C) |
|-------------------------|------------------------|
| DLPC (C ₁₂) | 0 |
| DMPC (C ₁₄) | 23 |
| DPPC (C ₁₆) | 41 |
| DSPC (C ₁₈) | 58 |
| DBPC (C ₂₂) | 75 |
| Egg PC | -5'den -15'e |
| Soy PC | -20'den -30'a |

Fosfolipitlerin çoğu (doğal yumurta ve soya lesitini de dahil olmak üzere) geniş bir pH aralığında negatif yüklüdür. Pozitif veya nötr lipozom üretmek için Fosfatidiletanolamin (PE) gibi pozitif yüklü polar lipitler kullanılmalıdır, ki bunlar da çoğunlukla daha yüksek maliyetlidir. Bu nedenle eksi yüklü fosfolipitler tercih edilir ve elektrostatik depozisyon yapılacaksa üstüne pozitif yüklü bir polimer kaplanır (kitosan bu amaçla yaygın kullanılır) [5].

Sentetik fosfolipitler arasında en çok kullanılanlardan biri L- α -Dipalmitoylfosfatidilkolin'dir (DPPC). DPPC yüksek faz geçiş sıcaklığı nedeniyle daha geniş bir sıcaklık aralığında stabilitesini koruyabildiğinden bazı durumlarda PC'ye tercih edilir [37, 38].

LİPOZOM ÜRETİMİ

Fosfolipitler suda çözündüklerinde hidrofobik uçlar birbirine, hidrofilikler dışarı bakacak şekilde ikili düz katmanlar oluştururlar (Şekil 1). Lipozomlar bu ikili lipit katmanlarının parçalanıp kürecikler halinde kapanması ile oluşurlar (Şekil 1). Bu oluşum spontan olarak gerçekleşmez, yani lipozomların oluşması için sisteme enerji uygulamak gerekir. Lipozomlu sistemin, önceki haline kıyasla serbest enerjisi daha yüksektir. Lipozomlar bu nedenle termodinamik açıdan stabil yapılar değildirler. Oluşturulmak istenen lipozoma göre koyulması gereken enerji miktarı belirgin şekilde değişir [16, 35, 39].

Örneğin MLV'ler suya eklenen fosfolipitlerin hafif karıştırılması ile oluşabilirken, LUV ve SUV üretmek için sisteme önemli miktarda enerji vermek gerekmektedir. Verilen bu enerji ile ilkin oluşan MLV ve MVV ler tek çift katmanlı (bi-layer) yapılara dönüştürülür [33, 40].

Genellikle lipozomlar, emülsiyonlar gibi, fiziksel stabilitelelerin belirli bir süre koruyabilirler. Buna "kinetik olarak stabil" denilmektedir. Zaman içinde partiküller birleşir ve partikül boyutu artar. Emülsiyonlara olan bu benzerlikleri hazırlanma biçimlerinde de kendini gösterir. Lipozomlar; mekanik yöntemler ile oluşturulabilecekleri gibi, mekanik olmayan metotlarla da oluşturulabilirler. Şimdi lipozomların bu üretim bu metotlardan bazıları daha detaylı incelenecektir.

Mekanik Metotlar

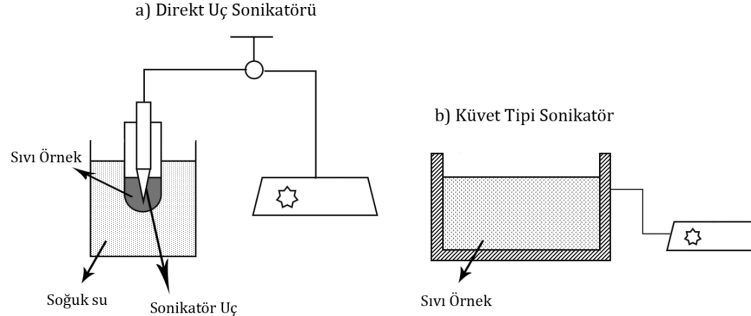
Yüksek Şiddetli Ultrasonikasyon

Bu yöntemle SUV ve LUV'ler üretilebilir. Yöntemin ana prensibi frekansı 16 ile birkaç yüz kHz arasında değişen ses dalgalarının çözeltiye uygulanması sonucunda sistemde ufak oyuklar oluşturulması fikrine dayanır. Ses dalgaları ile oluşup tekrar dağılan bu küresel oyuklar, her dağılmada yakın çevresinde yüksek basınç ve sıcaklık artışlarına ve beraberinde de yüksek hızda bir türbülans akışa neden olur. Bu ufak ve geçici türbülans akışların çevresine uyguladığı baskı sonucunda büyük boyutlu lipozomlar parçalanır, böylece LUV ve SUV'ler elde edilir [1, 41]. Lipozom üretimi için, direk uç sonikatörü ve indirekt kuvvet tipi sonikatör olmak üzere iki çeşit ultrasonikasyon sistemi kullanılabilir.

Direk uç sonikatör (Şekil 5) ultrasonik bir jeneratörün paslanmaz çelik veya titanyum bir uca bağlanmasından oluşmuştur. Bu uç direk olarak solüsyona daldırılır, ve sonikasyon gerçekleşir [1]. Direk uç sonikatörler ile; sisteme çok yüksek enerji uygulanabilir, böylece kuvvet tipi sonikatörle hazırlanan numunelere kıyasla daha düşük boyutlu partiküller elde edilebilir. Ancak bu tip sonikatörlerin bazı dezavantajları da vardır. Sonikasyon uygulanan solüsyonda enerji dağılımı homojen değildir.

Bu nedenle, partikül boyutları daha çeşitlidir. Tekrarlanabilirlik düşüktür. Tüm sonikasyonlarda yüksek enerji girişi nedeniyle, solüsyonda ısınma gerçekleşebilir; ve direk uç sonikatörlerde kuvvet tipi olanlarına göre sıcaklık kontrolü zordur. Ayrıca zamanla

metal ucun degradasyonu solüsyondaki iyon konsantrasyonunu artırabilir ki bu da birçok bozunma reaksiyonlarını tetikleyebilir (lipit oksidasyonu gibi) [33, 35, 40].



Şekil 5. En çok kullanılan lipozom oluşturma yöntemlerinden a) Direkt uç sonikatörü b) Kuvvet tipi sonikatör

Kuvvet tipi sonikatörler ile, eşit enerji dağılımı sağladıklarından daha homojen partikül boyutları elde edilir. Ayrıca direk uç sonikatörlerin aksine metal uç ile solüsyon arasında direk bir temas olmadığı için iyon kontaminasyonu söz konusu değildir. Bunun yanı sıra; kuvvet tipi sonikatörler daha iyi sıcaklık kontrolü sağlarlar. Ancak bu sonikatörler, direk uç sonikatörlere kıyasla sisteme daha az enerji sağlarlar [39, 40]. Tüm bunlar göz önüne alındığında kuvvet tipi sonikatörler, MLV ve MVV veya mikro boyutlarda LUV oluşturmak için daha uygunken; direkt tip sonikatörler ise nano boyutlu LUV ve SUV üretimi için daha idealdir.

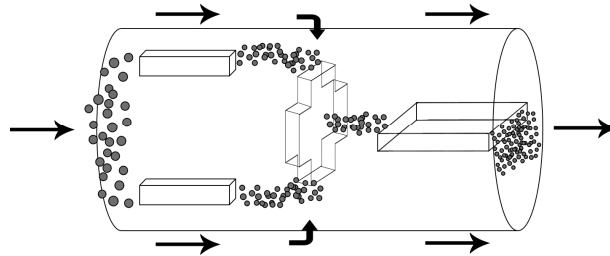
Sonikasyon lipozom oluşturmada kullanılan yaygın bir yöntemdir ve özellikle stabil SUV'ler üretmek için ideal bir yöntem olarak kendini kanıtlamıştır. Ancak sonikasyon kullanımında birkaç sorunla karşılaşabilir. Bunlar;

- Bazı lipit dispersiyonlarının sonikasyonunun yoğun köpük oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir.
- Ayrıca sonikasyonun enkapsüle edilen maddenin bazı özelliklerinde modifikasyona neden olabildiği görülmüştür.

- Sonikasyonla üretilmiş kesecikler metastabil, zamanla büyüebilir. Bu nedenle sonikasyonla üretilmiş lipozomların kullanım öncesi 24 saatten uzun bir süre dinlendirilip daha stabil bir partikül boyutuna ulaşmalarının beklenmesi tavsiye edilir [42, 43].

Yüksek Basınç Homojenizasyonu

Yüksek basınç homojenizatörleri, 10 ile 100 MPa arasında basınç içeren bir halka içinden 200 m/s'den yüksek hızlarla geçen dispersiyonların; partikül boyutlarını belirgin bir şekilde düşürebilir. Sistemin verimi giriş ve çıkış arasındaki basınç farkıyla bağlantılıdır. Özel bir yüksek basınç homojenizatörü olan *mikroakışkanlaştırıcı*'da (Şekil 6) ise, partikül boyutunda küçülme, sisteme giren sıvının öncelikle iki ayrı mikroakışma ayrılması ve sonrasında bu iki yüksek hızlı akışların çarpışması sonucunda elde edilir [42]. Mikroakışkanlaştırıcı kullanımı yüksek kapsülasyon verimi sağlarlar, ve çoğunlukla benzer yüksek basınç homojenizatörlere kıyasla daha küçük partiküller elde edilebilir [40].



Şekil 6. Mikroakışkanlaştırıcı çalışma prensibinin şematik gösterimi

Mikroakışkanlaştırıcı, ultrasonikasyon ile beraber en sıklıkla kullanılan lipozom hazırlama metodlarından biridir (Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer). Standard bir lipozom

hazırlama prosedüründe ilk adım olarak, su ve lesitinin yüksek hızlı bir karıştırıcı ile karıştırılmasından çoklu katmanlı ve kesecikli lipozomlar (MLV ve MVV) elde edilir. Mikroakışkanlaştırıcı bu adımda devreye girip

sisteme uyguladığı yüksek enerji ile keseciklerin parçalayıcı özellik gösterir [42]. Elde edilen lipozomların parçacık boyutu, sistemin uyguladığı basınç ve dispersiyonun sistemden geçirilme sayısı ile ters orantılıdır [44]. Mikroakışkanlaştırıcılarda diğer homojenizasyon metotlarına göre işlem süresi daha kısadır ve sistem hem sürekli hem de yığın çalışma mantığıyla işleyebilir [45]. Ancak mikroakışkanlaştırıcıların en önemli avantajı düşük ve yüksek skaladaki cihazların çalışma prensiplerinin benzerliği sayesinde, laboratuvar seviyesi (düşük skalada) üretimin, endüstriyel seviyeye (yüksek skalada) kolaylıkla taşınabilmesidir [42, 45].

Ekstrüzyon Homojenizasyonu

Ekstrüzyon veya membran homojenizasyonu yönteminde, büyük boyutlu lipozomlar içeren akışkan sistem, eşit gözenek boyutlu bir filtreden geçmeye zorlanır. Böylece daha küçük ve homojen yapıda lipozomlar içeren numuneler elde edilir [1]. Ancak metoden bazı zayıflıkları vardır. Ekstrüzyon ile membrana giren büyük lipozomlar parçalanır ve çıkışta tekrar oluşur; bu işlem sırasında lipozomların içindeki madde ortama akar. Böylece kapsül edilen madde miktarı azalabilir ya da kaybedilebilir. Bunu önlemek için ekstrüzyon kapsüllenecek ajanın yüksek konsantrasyonda var olduğu bir ortamda yapılmalıdır [42]. Ayrıca lipit membranların yüzeyler arası reolojik özellikleri lipozomların faz durumuna göre değişim gösterir. Eğer sıcaklık jel-sıvı geçiş sıcaklığının altındaysa, bu metot çoğunlukla başarısız olur. Metodun işlemesi için lipozomların akışkanlığı daha yüksek olan sıvı-kristal fazda olmaları gerekmektedir. Bu fazdayken lipozomların yapısında bir bozulma olsa dahi, keseciklerin kendilerini tamir edebilme becerileri daha yüksektir [6]. Bu nedenle ekstrüzyon ve membran homojenizasyonu sıcaklık, ve basınç gibi dışsal etkenlerden dolayı olarak etkilendir [39].

Mekanik Olmayan Metotlar

Ters Faz Buharlaşması

Ters Faz Buharlaşması (TFB) uygulamasında, çift katmanlı kesecik oluşturma potansiyeline sahip polar lipitler (fosfolipitler gibi) düşük kaynama noktalı organik bir sıvıda (dietil eter, isopropil eter, kloroform ya da metanol gibi) dağıtılırlar. Sonrasında kapsüllenecek maddeyi içeren sulu bir çözelti bu organik faza eklenir ve karışım kısa bir homojenizasyon işleminden geçer. Oluşan emülsiyonda hidrofilik başlar su ile kontak içindeyken yağ asit zincirleri ise organik çözücü ile temas halindedir. Çözücü düşük basınç altında buharlaştırıldığında, geride suda dağılmış lipit kesecikleri kalır [1]. Organik çözücüyü tamamen buharlaştırmak için sonrasında sistem nitrojen gazına maruz bırakılabilir [46, 47]. Bu yöntemle oluşturulan lipozomlar bunu takip eden ikinci bir yöntemle daha küçük ve homojen boyutlu bir hale getirilebilir.

Dondurarak Kurutma-Tekrar Sulandırma

Bu teknikler lipozom oluşturmaktan ziyade oluşmuş lipozomları modifiye etmek ve özelliklerini geliştirmek amaçlı kullanılır [1]. Hazırlanmış lipozomlara uygulanan dondurarak kurutma ve ardından jel-sıvı dönüşüm sıcaklığının (T_M) üstünde tekrar sulandırma ile yüksek verimli (%45'e kadar) büyük boyutlu (çoğunlukla $>1 \mu m$) MLV'ler ve MVV'ler elde edilebilir. Sürecin ardarda tekrarlanmasıyla enkapsülasyon veriminin daha da arttığı görülmüştür [48, 49].

LİPOZOMLARDA STABİLİTE

Kimyasal Stabilitite

Kimyasal instabilite oksidasyon veya hidroliz sonucunda lipozomal yapının bozulması ile ortaya çıkar. Lipit oksidasyonu sonucunda lipozomların yapısı bozulur ve fonksiyonlarını kaybederler. Bu problem, özellikle doymamış yağ asitlerinden oluşan fosfolipitler için önemli bir sorundur. Oksidasyonu tetikleyebilecek nedenlerden biri de ortamda geçiş metallerinin varlığıdır (demir gibi). Bu metaller oksidasyon reaksiyonunu destekler özellik gösterirler [2, 50].

Lipozomların oksidatif bozunumlarını minimize etmek için;

- Düşük seviyede hidroperoksit ve geçiş metali içeren lesitinler tercih edilmelidir.
- Lipozom karışımı hazırlanırken, dispersiyonun metallerle iletişimi minimum tutulmalıdır.
- Yüksek miktarda doymuş yağ asitleri içeren fosfolipitler kullanılmalıdır.
- Lipozomların yüzey yükü oksidasyonu azaltacak şekilde modifiye edilmelidir [30, 50].

Lipozomların üzerine ortamla ilişkisini azaltabilecek kalın bir polimer kaplanması (kitosan gibi) veya bir antioksidanla beraber (EDTA, fenolik bileşikler gibi) kullanılmasının bu sorunu büyük miktarda ortadan kaldırdığı görülmüştür [2, 3, 50]. Antioksidanların bilinen etkisinin yanı sıra, kitosan kaplı lipozomların da oksidasyona daha az maruz kaldığı, Panya ve ark. [50]'nın yaptığı çalışmada gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, kitosanın kationik bir polimer olması nedeniyle elektrostatik itiş ile artı yüklü geçiş metallerinin lipozom yüzeyine ulaşmasını engellemesi olarak açıklanmıştır.

Fiziksel İnstabilite

Lipozomlar faz dönüşümü geçirdiklerinde veya çift katmanlı yapıları bir araya gelip birleştiğinde iç katmanda saklanan materyaller kapsülden dışarı akarak fiziksel instabiliteye neden olur. Bu nedenle fiziksel stabilite araştırmalarında partikül büyüklüğü ve faz değişim kontrolleri gerçekleştirilir. Optimum sıcaklık, pH, partikül boyutu, iyonik güç ve doğru fosfolipit çeşidi/aktif ajan kombinasyonunu bulmak, lipozomlarla enkapsülasyon yapmak isteyenler için önemli faktörlerdir [1, 38]. Lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitesi; mekanik stres, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi dışsal

etkenlerle beraber fosfolipit konsantrasyonu, kompozisyonu, kapsüle edilen materyalin çeşidi ve konsantrasyonu gibi içsel etkenlere bağlıdır. Şimdi bu unsurlardan bazıları daha detaylı incelenecektir.

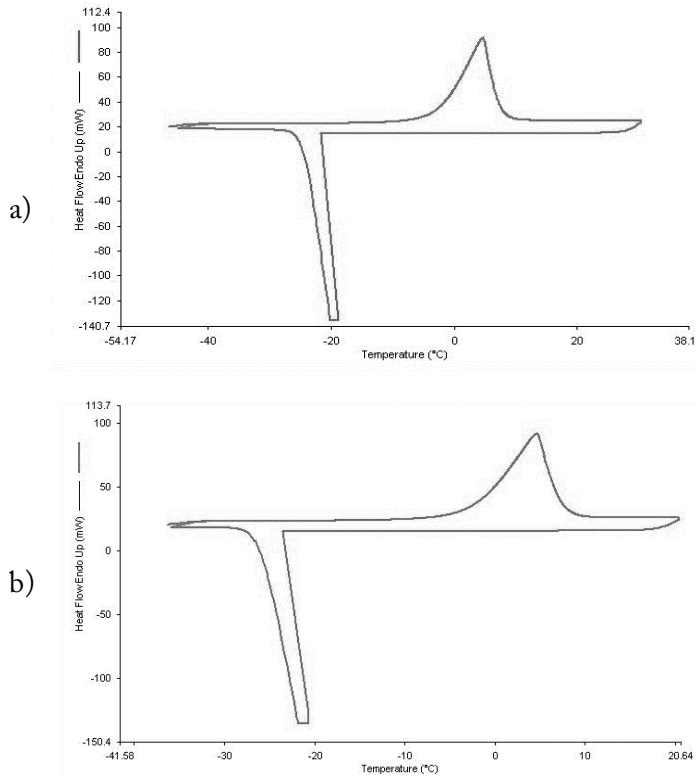
Stabiliteyi Etkileyen Unsurlar

Sıcaklık (Faz Dönüşümü) Etkileri

Lipozomlar ısı ile karmaşık faz dönüşümleri gösterebilirler. Bu süreçte lipozomların reolojik özellikleri dramatik bir değişim gösterir ve lipozomlar mekanik strese (basınç gibi) çok duyarlı olurlar, bu da lipozomlarda dağılmaya ve/veya kapsüllenmiş içeriğin katmanlardan sızmasına veya tamamen salınımına neden olabilir. Bu nedenle faz dönüşümleri, lipozomların stabilitesi için bir göstere olarak kullanılabilir [51, 52]. Fosfolipit içeren sistemlerin faz

geçişleri komplekstir. Bulunduğu sıcaklık veya kompozisyonuna göre birden fazla sıvı-kristal veya mezomorfik formda bulunabilirler. Lipozomal sistemler için en önemli parametrelerden biri jelden sıvı-kristale dönüşüm sıcaklığıdır. Bu sıcaklıkla, hidrokarbon zincirlerinin erimesi sonucunda lipozomlar çift katman düzenli diziliminin çoğunu kaybeder [1, 37]. Bu nedenle lipitlerin erime aralığını belirleyen hidrokarbon zincir uzunluğu, doymuş/doymamış yağ asidi miktarı, trans/sis izomerizmi gibi özellikler fosfolipitlerin dönüşüm sıcaklığını da etkiler [6].

Bu geçimleri gözlemlemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DTK) kullanılabilir. DTK'de faz geçişleri ısıtma döngüsünde endotermik tepcikler olarak kendini gösterir. Lipozomal sistemler DTK ile incelendiğinde üç farklı dönüşüme denk gelen üç tane tepcik gözlemlenir (Şekil 7). Bunlar;



Şekil 7. a) Lipozomların (Yumurta lesitini 1% kütle) b) Kitosan ile kaplanmış lipozomların (Yumurta lesitini %1, kitosan %0.5 kütle) DTK termogramı (ısıtma, soğutma, ısıtma döngüsü)

Ara-dönüşüm: Katı-katı geçişi temsil eden ve sadece C₁₆ ile C₁₈ doymuş yağ asitlerinde görülen yarı jel den jele geçiş sıcaklığı.

Ön-dönüşüm: İki farklı jel yapısı arasında geçişi temsil eden ön geçiş sıcaklığı.

Dönüşüm: Hidrokarbon zincirlerinin eridiği jel den sıvıya geçişi temsil eden dönüşüm sıcaklığı [6, 51].

Olarak listelenebilir.

Bu dönüşümler sırasında hidrokarbon zincirlerinin yapılarının değişmesi nedeniyle yeniden dizilim gerçekleşir. Bu da lipozomların içerisindeki kapsüllenmiş

maddenin dışarı sızmasına neden olur. Bu nedenle bu geçişlerin lipozomların normal depolama veya tüketim sıcaklıklarında gerçekleşmemesi gereklidir. DSC, EPR ve FTIR bu geçişlerle ilgili verdikleri bilgiler ile lipozomal sistemlerin stabilitesinin incelenmesi için kullanılabilir [38]. Fosfolipitlere kolesterol eklenmesi sonucunda oluşturulan lipozomlarda, kolesterol miktarı artırdıkça ön geçişte da bir yok olma ve dönüşüm sıcaklığında bir yükselme görülmektedir. Dönüşüm basamaklarındaki bu azalma ve jel-sıvı dönüşüm sıcaklığındaki artış, lipozomların depolama sırasındaki stabilitesini olumlu etkiler [6].

Yüzey Yükü ve pH Etkileri

Lipozomların kapsülleme verimi, içinde bulunduğu ortamdaki diğer materyallerle etkileşimine bağlıdır; ki bu da yüzeyler arası özelliklerle belirlenir (yüzeyler arası reolojik özellikler, hidrofobisite, ve yüzey yükü gibi). Lipozomların bu özellikleri oluştuğu madde, çözücü türü, iyonik güç, ve sıcaklık gibi koşullara bağlıdır [1]. Lipozomların yüzey yükü de ortamdaki materyallerle etkileşimi dolayısıyla lipozom enkapsülasyonunu etkileyen nedenlerden bir diğeridir. Yüklü fosfolipitler ile yüklü bileşikler elektrostatik etkileşim içinde bulunur. Örneğin, yüklü lipozom membranları aynı miktarda yük taşıyan bileşiklerin membrandan geçmesini engelleyebilir, ki bu da lipozomların içinde kapsülene edilen maddelerin dışardaki çözücü içindeki bileşiklerle bir araya gelmesini engelleyen faktörlerdendir [53].

En yaygın kullanılan fosfolipitlerden biri olan PC çift kutuplu özellik gösterir, yani geniş bir pH aralığında baş grubunun yükü sıfırdır. Ancak Makino ve arkadaşları [54], tarafından yapılan bir çalışmada çift kutuplu baş grubunun oryantasyonu sıcaklık ve iyonik güç ile değişmiştir ve bununla birlikte de net yük değerlerinde bir değişim gözlenmiştir. Bu da lipozomların net yükünün sadece fosfolipit molekülünün özelliklerine değil aynı zamanda onun çevredeki moleküllerle etkileşimine de bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Lipozom geçirgenliğinin ve stabilitesinin; sıcaklık, faz dönüşümü, iyonik içerik, pH, fosfolipit çeşidi ve ortamdaki diğer maddelerle etkileşimi gibi etkenlerle değişimi; hücre membranlarına özgü kompleks biyokimyasal sistemlerin doğru işlenmesini sağlayan seçici geçirgen özellik ile bağdaşmaktadır. Gibbs ve ark. [2], (%75'i fosfatidilkolinden oluşan) soya lesitiniyle yaptığı çalışmalarda pH'nın lipozom yüzey yükü üzerindeki etkisini göstermiştir. Buna göre, zeta potansiyel ölçümü ile, pH 3 te -21.8 olarak ölçülen lipozomların yükü pH 11 e çıktığında -57.7 olarak ölçülmüştür.

LİPOZOM STABİLİTESİNİN ARTIRILMASI

Polimer Kaplanması

Lipozomların stabilitesini artırmak için bir başka biyopolimer katmanıyla kaplanması bilinen bir yöntemdir. Böylece lipozom sistemi endüstriyel koşullara daha uygun bir hale getirilebilir. Bu amaçla çoğunlukla elektrostatik depozisyon metodu kullanılır. Bu metod zıt yüklü polimerlerin birbiri üstüne iki veya daha fazla katman halinde kaplanması prensibine dayanır [2].

Yaygın olarak kullanılan fosfolipitlerin (yumurta ve soya lesitini) negatif yüklü olması nedeniyle oluşturulan lipozomlar eksi yüklüdür, üzerine de bu yöntemle artı yüklü bir polimer kaplanır ki bu amaçla da sıklıkla kitosan kullanılır. Kitosan biyo-uyumlu, biyo-bozunabilir olduğu ve toksik etki göstermeyen, antimikrobiyal özellikli bir polimerdir [2, 5]. Kitosanın yüksek yük yoğunluğu; kitosan ile kaplanan lipozomların pozitif yüklü olmasına neden olur. Bu sayede sistemin stabilitesini daha da artırmak amaçlı ikinci bir negatif yüklü polimer kaplanabilir. Gibbs ve ark.'ın (2012) , lipozomu üzüm çekirdeği özütünü kapsüllemek için

kullandıkları çalışmalarında, kapsüllerin stabilitesini artırmak için üst üste iki polimer; kitosan ve sitrus pektini kullanmışlardır. Sonuç olarak lipozom-kitosan-pektin katmanlarının altında kalan üzüm çekirdeği özütünün çevresiyle olan ilişkisinin tamamen koparıldığı, ve ulaşılabilir özütün her kat katmanla azaldığı böylece kapsülasyon veriminin katmanlar arttıkça arttığı gözlemlenmiştir [2].

Konu üzerine Chun ve ark. [5], tarafından yapılan bir başka çalışmada, lipozomlar ardarda kitosan-yüksek metoksi pektin ve kitosan-λ karragenan'ın tekrarından oluşan 6 katmanlı iki ayrı şekilde kaplanmıştır. Çalışmada kitosan-yüksek metoksi pektin katmanlı lipozomlar iki seferden fazla kaplanamazken, kitosan - λ karragenan kombinasyonu ise en fazla dört katmana kadar stabilitesini korumuştur. Elektrostatik depozisyon , lipozom stabilitesini artırmak için önemli bir metottur. Lipozomların elektrostatik depozisyon ile kaplanmaları sonucunda [55-57] ulaşılan önemli sonuçlar aşağıda listelenmiştir.

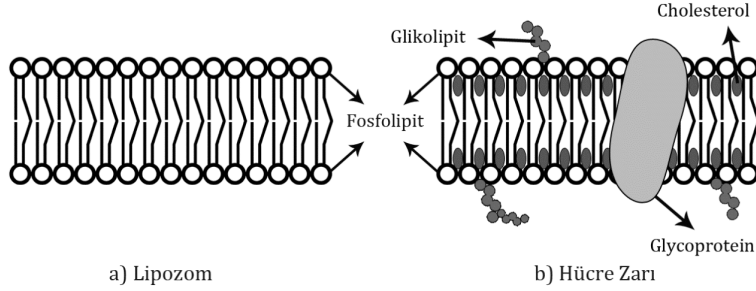
- Lipozomların tamamını homojen bir şekilde ikinci bir polimerle kaplamak zordur.
- Doğru optimum polimer konsantrasyonlarını belirlemek ise elektrostatik depozisyonun zorluklarından bir diğeridir. Örneğin, kitosan molekülleri düşük kritik bir konsantrasyonda (lipozomun yükünü nötrlediği aralıkta) lipozomlar yerine birbirleri ile etkileşim içerisine girerek köprüye benzer yapılar oluşturur. Bu da *köprü flokülasyonu* denilen soruna neden olur.
- Yük yoğunluğu birbiri ile uyumlu polimerlerin kombinasyonları halinde kullanılması şarttır.
- Tüm lipozomların yüzeyinin ikinci uygulanan polimer ile kaplandığından emin olmak için ihtiyaç duyulandan fazla polimer uygulanır. Bu da solüsyonda lipozomlara bağlanmadan kalan; fazla yüklü polimerlerin bir sonraki zıt yüklü polimerle bir araya gelmesine ve çökelti oluşturmasına neden olur. Sıklıkla karşılaşılan bu soruna tüketme flokülasyonu denir. Bu sorun stepler arası jel filtrasyonu ile büyük ölçüde engellenir.
- Her polimer uygulanmasında, partiküllerin büyüklüğü artar; bu da bir sonraki adımda daha fazla polimer kullanılmasını gerektirir. Artan partikül boyutu ve polimer miktarı çözeltinin fiziksel özelliklerinde dramatik değişimlere neden olur. Ayrıca her kaplama ile optimum konsantrasyonu ayarlamak daha da zorlaşır [55-57].

Bu sorunlar nedeniyle elektrostatik depozisyonun ardarda defalarca uygulanması zordur. Ancak lipozomların sadece kitosan veya beraberinde başka polimerlerle de kaplanması; lipozomların depolama stabilitesini artırmıştır [2, 3, 58]. Laye ve ark.'ın [3] araştırmasına göre kitosan ile kaplanan lipozomların partikül büyüklüğü 45 gün içinde belirgin bir artış göstermiştir [3]. Bunun yanı sıra kimyasal bozunma (oksidasyon) karşı da kitosan kaplamanın olumlu etkileri gözlemlenmiştir [50]. Kitosan ile kaplanmış lipozom fiziksel ve kimyasal bozunmaya karşı korunmasının yanı sıra, lipozoma lipaz enziminin ulaşımını yavaşlatarak, kapsüllenmiş maddenin daha uzun bir sürede kana karışmasını da sağlar [3].

Kolesterol Kullanılması

Şekil 8'de de görüldüğü gibi hücre membranı fosfolipitler içerisinde yerleşmiş kolesterol molekülleri ile çeşitli

proteinlerinden oluşur. Kolesterol hücre membranının bütünlüğünü korumasına yardımcı olur, akışkanlık sağlar ve membrandaki proteinlerin görevlerini gerçekleştirmesine destekler [59].



Şekil 8. Hücre membran yapısı

Aynı şekilde lipozomlar üzerine yapılan çalışmalarda kolesterolün lipozom stabilitesine olumlu etkileri gözlemlenmiştir. Daha önce de bahsedildiği üzere, jel-sıvı faz dönüşüm sıcaklığının altında lipozom sert, esnekliği ve geçirgenliği düşük bir yapı gösterirken; üzerinde ise, esnek, akışkan, geçirgenliği yüksek bir yapı gösterir [6]. Lipozomların fosfolipit ve kolesterol karışımından oluşturulması sonucunda hücre membran yapısına benzerlik gösteren bir yapı elde edilebilir.

Kolesterol ile oluşturulan lipozomların faz dönüşüm sıcaklığı altında fosfolipit zincirlerinin daha yumuşak ve mobil olduğu görülmüştür. Bunun nedeni kolesterol moleküllerinin hidrokarbon zincirlerinin sert kristal jel yapıda bir araya gelmesini engellemesidir. Faz dönüşüm sıcaklığının üstünde ise kolesterol eklenmesi, yapıyı daha az sıvı bir hale getirmiş, dağılıma ihtimalini ve geçirgenliğini azaltmıştır. Bu da sert sterol moleküllerinin hidrokarbon zincirlerinin hareketini kısıtlamasından kaynaklanır [1, 38]. Bunu destekleyen çalışmalar da mevcuttur. PC/kolesterol lipozomların, sadece PC'lerden oluşan lipozomlara kıyasla, içeriklerini değişen sıcaklıklarda daha az sızdırdığı gözlemlenmiştir [1].

LİPOZOMAL SİSTEMLERİN KARAKTERİZASYONU

Kimyasal Stabilite Kontrolü

Lipozomların kimyasal stabilitesinin kontrolü için hidroperoksit ve hekzanal ölçümü yapılır. Lipozomal sistemin depolama süresince oksidasyon ile uğradığı bozunma böylece gözlemlenmiş olur. Gibis ve ark. [2] lipozomların içerisinde bir antioksidan maddenin kapsüle edilmesinin lipozomların oksidatif stabilitesini nasıl etkilediğine dair çalışmalarında; üzüm çekirdeğinden elde edilmiş fenolik bileşikler ile doldurulmuş lipozomlar ile boş lipozomlarda 150 gün boyunca belli aralıklarla hexanal değişimine bakmıştır. Dolu lipozomlarda çok az bir hekzanal oluşumu görülürken, boş lipozomların hekzanal miktarı depolama süresince belirgin bir artış göstermiştir.

Konuyla ilgili Panya ve ark.'ın [50] yaptığı çalışmalarda kitosan ile kaplanmış lipozomların kaplanmamış lipozomlara kıyasla oksidatif stabilitesini daha uzun süre koruduğu, ancak en etkili oksidatif korunmanın EDTA veya rosmarinik asit gibi antioksidanlar eklenmesiyle sağlandığı görülmüştür. Antioksidan varlığında ise kitosan ile kaplanmış ve kaplanmamış lipozomlar arasında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Hekzanal ve hidroperoksit ölçümü için GC-MS ve UV spektroskopisi içeren farklı metotlar kullanılmıştır. Konuda bir başka çalışma olan Forarada ve ark. tarafından yapılan çalışmada oksidasyon kontrolü için aralıklı olarak karıştırılarak 37 derecede bekletilen örnekler 2 saatlik, 1 günlük ve 1 haftalık endoperoksit ölçümleri tiyobarbitirik asit (TBA) testi ile gerçekleştirilmiştir [47].

Fiziksel Stabilite Kontrolü

Lipozomal sistemlerin fiziksel stabilitesi iki farklı prensipten yola çıkarak incelenebilir. Birincisi (ve daha çok kullanılan) partikül boyutundaki değişimin izlenmesi, bir diğeri ise lipozomların saklanacağı (depolama) sıcaklık aralığındaki faz değişimleridir. Daha önce de bahsedildiği üzere, lipozomlar birleşip daha büyük parçacıklar oluşturduklarında içlerinde kapsüllenmiş maddeyi sızdırabilirler veya faz dönüşümü sırasında mekanik strese oldukça duyarlı olduklarından yine içlerine hapsedilmiş maddeyi ortama sızdırma ihtimali söz konusudur. Şimdi bu yöntemler detaylı olarak incelenecektir.

Partikül Boyut Ölçümü

Çökme Kontrolü

Partikül çapı 300 nm'den büyük olan lipozomal sistemler gözle yapılan bir kontrol ile daha küçük boyutlu sistemlerden ayırt edilebilirler [1]. Daha büyük ve stabil olmayan sistemlerde, dipte çökelti gözlemlenebilir. Laye ve ark. [3] tarafından yapılan çalışmada lipozom tanelerinin boyutları ne kadar küçükse çözeltinin o kadar berrak olduğu gözlemlenmiştir. Kitosan gibi bir polimer kullanıldığında çözeltinin görüntüsünün daha da opaklaştığı görülmüştür. Kritik konsantrasyon olan %0.02 konsantrasyonda ise kitosanların çöktüğü gösterilmiştir. Bu kritik konsantrasyonun üstünde ise

kitosanların bulanık ama daha stabil bir yapıda olduğu göz incelemesiyle görülebilmektedir [3, 5].

Göz ile yapılabilen çökme kontrolünün yanı sıra, mikro ve nano partikül boyutlu sistemlerin partikül çapı ölçümü için birçok farklı metot da kullanılabilir, bunlardan bazılarından aşağıda bahsedilmiştir.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Foton korrelasyon spektroskopisi olarak da bilinen bu metotta parçacıkların ışığı yama miktarından yararlanılarak koloidal sistemlerin partikül çapı belirlenebilmektedir. Hassas ve yaygın kullanılan bir partikül boyutu belirleme metodudur [2].

Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM)

Bu yöntem çok ince bir tabaka halindeki incelenecek cismin içinden bir elektron hüzmesi geçirilmesi ve bu elektronların cisimle olan etkileşiminin ölçümü prensibiyle işler. Optik mikroskopa göre çok daha küçük boyutlardaki partiküllerin görülmesine olanak veren bu sistem, çalışmalarda 100 nm'den küçük partikül çapına sahip lipozomal sistemlerin hem kalitatif gözlemi hem kantitatif (boyut ölçümü) amaçlı kullanılmaktadır [38].

PFG – Nükleer Manyetik Rezonans

Vurgulu Alanda Gradyentli Nükleer Manyetik Rezonans yöntemi ile parçacıklı sistemlerin partikül boyutlarının belirlenebildiği görülmüştür. Bu sistemin dinamik ışık saçılımı (DIS) metoduna kıyasla avantajı DIS yüksek seviyede seyreltilme gerektirirken, bu yöntemle derişik sistemlerin de partikül boyutlarının belirlenebilmesidir. Sistem nispeten hızlı olması, örnek için bir ön hazırlık gerektirmemesi ve örneğe zarar vermemesi de bazı diğer avantajlarıdır.

Ancak bu yöntemin bazı sınırlamaları vardır;

- Yöntem nanoemülsiyonlara uygulanamaz, aslında ancak partikül çapı boyu 2 ile 30 µm arasında olan sistemler için doğru sonuçlar verir.
- Yöntemin yağ içinde su emülsiyonlarında kullanılması için en az %10 (hacim bazlı konsantrasyon) yağ içermelidir (ki bu da lipozomal sistemler için çok yüksek bir orandır).
- Yağın tamamı sıvı halde olmalıdır, yani fosfolipitler tamamen doymamış yağlardan oluşmalıdır.
- Kullanılan yağın difüzyon katsayısı belirli limitler dahilinde olmalıdır.

Bu sınırlamalar yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır [60, 61].

Çökme kontrolünün gözle incelenmesinin yanı sıra optik mikroskop da kullanılır. 100 kat büyültme sağlayan optik mikroskop ile çapı 500 nm'den büyük partiküller gözlemlenebilir [2, 3, 5].

Yük İncelenmesi

Fosfolipitlerin yüzey yüklerinin kapsülasyon verimliliğine ve lipozom stabilitesine etkisi önceki bölümlerde tartışılmıştır. Bu etkilerinden dolayı lipozom yükleri de stabilite göstergesi olarak sistemin üretiminden hemen sonra veya elektrostatik depozisyon uygulamalarında her polimer uygulaması öncesi kontrol amaçlı gerçekleştirilir [2, 3, 5]. Bu işlem koloidal sistemlerin net yükünü ölçen zeta potansiyel ölçümü ile gerçekleştirilir.

Kapsülasyon Verimi Ölçümü

Kapsülasyon verimi, kapsüllenmek istenen ajanın ne kadarının kapsüllenebildiğinin sayısal değeridir. Kapsülleme veriminin incelenmesi için lipozom veya bulunduğu ortam ile reaksiyona girme potansiyeli göstermeyen (inert) ve ölçümü nispeten kolay olan maddeler kullanılır. Bu amaçla en çok kullanılan maddelerden biri kalseindir [62, 63]. Kalsein, lipozom karakterizasyonunda, kapsülleme verimi ölçümü amaçlı birçok çalışmada kullanılan hidrofilik bir maddedir [62-65]. Kalsein floresan ışık yayma özelliği sayesinde floresan spektroskopisi ile tespit edilmesi kolay bir madde olduğundan dolayı lipozomların bütünlüğünde veya geçirgenliğindeki değişimleri incelemek amaçlı kullanılır. Farmasötik aplikasyonlarda; ilaçların vücutta spesifik alanlara ulaştırılması amaçlı lipozomal kapsülasyon sistemlerinin tasarımında, tahmin edilebilir salınım özellikleri sergilemesi nedeniyle lipozomlardan kapsüllenen maddenin salınım kinetiğinin incelenmesi amaçlı da kullanılmaktadır [62, 64]. Lesitin keseciklerinin hidrofilik iç haznesine hapsedilen kalsein miktarı kapsülleme öncesi ve sonrası; floresan spektroskopisi yöntemi ile eksitasyon dalga boyu 490 nm ve emisyon dalga boyu 520 nm ayarlanarak ölçülür [62, 65]. Kapsüllemmeden sonra dispersiyonlardaki toplam kalsein miktarını belirlemek için ise, Triton X-100 eklenerek parçalanmış lipozomların aynı metotla ışınımını ölçülebilir.

$$\% \text{Verim} = [1 - (F_T - F_0) / (F_\infty - F_0)] \times 100 \quad (1)$$

Kapsülasyon verimi ise eşitlik (1)'den hesaplanabilir (F_T dolu örneklerin ışınımı, F_0 boş örneklerin ışınımı ve F_∞ parçalanmış lipozomlu sistemin ışınımı göstermektedir) [65].

Faz Dönüşüm İncelenmesi

Faz dönüşümün stabilite üzerindeki etkileri önceki bölümlerde tartışılmıştır. Lipozomal sistemlerin depolama sıcaklık aralığında faz dönüşümü geçirip geçirmediği ve bu dönüşümün cinsi; Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK), Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) veya Elektron Paramanyetik Rezonans (EPR) gibi metotlarla incelenebilir [6, 38, 51]. Şimdi bu metotlardan DSC daha detaylı işlenecektir.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

Bu sistem, bir örneğin sıcaklığını artırmak için gerekli olan ısı miktarını gösteren termoanalitik bir yöntemdir. Bu yöntemde faz değişimleri endotermik veya

ekzotermik oluşuna göre tepcikler veya çukurlar halinde görülür. Isı gerektiren faz değişimleri DTK eğrilerinde tepcikler olarak gözlemlenebilmektedir. DTK eğrilerinden faz değişiminin başlangıç sıcaklığı (T_0), faz değişim tepe sıcaklığı (T_m), dönüşümün yarı noktasının genişliği, sürecin entalpisi (ΔH) gibi bilgiler elde edilebilmektedir [51, 66].

Daha önce lipozomların fiziksel stabilitesinden bahsederken, faz değişimi dışında lipozomun içinde bulunduğu fazın da sistemin fiziksel durumunu (sertlik, akışkanlık, geçirgenlik, kırılgenlik, esneklik gibi özellikleri) etkilediği belirtilmişti [66, 67]. Biltonen ve Lichtenberg'in [51] yaptıkları çalışmada, T_m 'in altında yeterince uzun süre tutulan SUV'lerin birleşip LUV'e dönüştükleri görülmüştür. Bu dönüşüm DSC ile SUV'ler ile LUV'lerin jel-sıvı dönüşüm sıcaklığı farkından yararlanılarak gözlemlenebilmektedir (SUV $T_m=37$ °C, LUV $T_m=41$ °C). Ayrıca aynı çalışmada LUV'lerin SUV'lere kıyasla daha geniş bir sıcaklık aralığında faz dönüşümlerini tamamladıkları, pH değişimi ile T_m 'lerinde ciddi değişimlerin gerçekleşebildiği ve sistemde hesabı katılmayan kontaminasyonların DSC ile gözlemlenebileceğinden bahsedilmiştir [51].

LİPOZOMLARIN GIDALARDA KULLANIMI

Lipozomların; vücuttaki belirli hücrelerde hedefe yönelik ilaç aktarımı [8, 16, 26], hücre dışı çalışmalarda model membran sistemi olarak [68, 69], kozmetik endüstrisinde deri yoluyla aktif ajanların aktarımı amaçlı [70, 71], biyoteknolojik çalışmalarda hücrelere DNA transferi [72, 73] gibi birçok alanda uygulamaları uzun yıllardır mevcuttur.

Ancak lipozomlar gıda alanında kendine diğer kapsülasyon ajanları kadar çok yer edinmemiştir [1]. Bunun nedenleri arasında gıda işlenmesi sırasındaki ağır stres koşullarına karşı sadece fosfolipitlerden üretilmiş lipozomların yeterince dirençli olmaması, üretildiği fosfolipitlerin saflaştırılmış (metalik iyonlardan ve diğer lipitlerden ayrıştırılmış) olması nedeniyle nispeten yüksek maliyeti, lipozomların gıda içindeki diğer bileşenlerle etkileşiminin pek bilinmemesi, lipozomlarla ilgili yeterince kontrollü salınım çalışması olmaması sayılabilir [1-3, 5, 16, 50]. Yine de lipozomlar sahip oldukları avantajlar ile gıdalarda da kendine uygulama alanı bulmaktadır. Gıda endüstrisinde lipozomlar proteinlerin, enzimlerin, vitaminlerin, antioksidanların ve aromaların kapsülasyonu için kullanılmıştır [1, 23, 24].

Süt ve Süt Ürünlerinde Kullanımı

Lipozomların gıdalarda kullanımının özellikle süt ve süt ürünlerinde yaygın örnekleri vardır. İlk örneklerden biri olarak Law ve King [74] MLV'lere hapsedilmiş proteaz enziminin sütteki β -kazein'in hızlı proteolaz olmasını engellediğini ve böylece daha sert yapıda peynirler elde edilebileceğini göstermiştir. Sonrasında peynirin yapısını geliştirme üzerine yapılan benzer çalışmalarda farklı türlerde lipozomlarla kapsüllenmiş maddelerin farklı hızlarda salınım gösterdiği ve proteolaz enziminin tamamının peynire salınımının 6 aya kadar uzatılabildiği

gözlemlenmiştir [75]. Bu sayede olgunlaştırma amaçlı bekletilen peynirlerin proteaz enzimi yüzünden gerçekleşen yumuşaması engellenmiştir. Sonrasında konuyla ilgili farklı türde peynirlerle gerçekleştirilen diğer çalışmalarda bu sonuçlar onaylanmış [76, 77], ayrıca Picon ve ark. [18, 78] tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise lipozom ile kapsüllenmiş proteaz enziminin peynirlerin duysal ve reolojik özelliklerini negatif açıdan etkilemediği gösterilmiştir.

Bu çalışmaların yanı sıra, yine peynirde daha yakın zamanlarda, lipaz enziminin lipozomlarla kapsülasyonunun etkileri araştırılmıştır [79]. Kapsüllenmiş lipaz içeren peynirlerde kontrole göre daha düşük sertlik değerleri gözlemlenmiş, daha yüksek elastiklik ve yapışkanlık değerleri bulunmuştur [79]. Ancak bu sonuçla beraber lipaz enziminin peynirdeki serbest yağ asidi oranlarını da değiştirdiği ve tat üzerine konsantrasyon spesifik etkiler yarattığı gözlemlenmiştir. Belli konsantrasyonların üzerinde kapsüllenmiş enzim içeren peynirlerin 6 ila 9 aylık olgunlaşma süreci sonucunda istenmeyen sabunumsu bir tat oluşturduğu görülmüştür [79]. Bunun nedeni olarak hem peynirin içindeki yağların parçalanması ile ortaya çıkan yağ asitleri, hem de lipozomların kendilerinin hidrolize olması sonucunda açığa çıkan bazı yağ asitleri gösterilmiştir. Bu nedenle çalışılan sistemle etkileşim olmasını engelleme amaçlı, kullanılan lipozomun kimyasal kompozisyonuna ve konsantrasyonuna dikkat edilmelidir.

Peynirlerin duysal özelliklerini geliştirme amaçlı çalışmaların yanı sıra, lipozomlar süt ürünlerinin besin değerini vitamin katkısıyla artırma amaçlı da kullanılmıştır. Banville ve arkadaşları lipozomla kapsüllenmiş Vitamin D'ye kıyasla kapsüllememiş Vitamin D'nin peynirdeki stabilitesinin daha yüksek olduğunu göstermiştir [80]. Bunun yanı sıra laktoz intoleransı hastaları için geliştirilmiş ürünlerdeki, laktozun daha tatlı olan glikoz ve galaktoza parçalanması sonucunda ortaya çıkan yüksek şekerli tadı engellemek amaçlı yapılan çalışmalarda; lipozomlarla kapsüllenmiş β -galaktosidaz enziminin +5°C'de 20 gün ile 1 ay arasında enzim aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir [81, 82]. Yine Rao ve ark. tarafından yapılan çalışmada düşük pH koşullarında (pH = 2.0-4.0) kapsülasyonun tamamen dağıldığı, böylece dolaptaki sütün içinde aktivitesini göstermeyen β -galaktosidaz enziminin, mide gibi asidik bir ortamda kapsüllerden tamamen salınarak etki edebileceği gösterilmiştir [82].

Gıda Bileşenlerinin Bozulmaya Karşı Korunması

Süt ve süt ürünlerindeki kullanımının yanı sıra, lipozomlar gıda bileşenlerinin çevreyle veya birbirleriyle etkileşimi sonucunda bozunmasına karşı koruma amaçlı gıdalarda kullanılmıştır. Panya ve ark. [50] tarafından yapılan bir çalışmada lipozomların içine hapsedilen antioksidan rosmarinik asit'in kapsüllememiş rosmarinik asite göre antioksidan aktivitesini daha uzun süre koruduğu görülmüştür. Gibis ve ark. [2] tarafından yapılan başka bir çalışmada ise üzüm çekirdeği özütünden elde edilen fenolik bileşiklerin lipozomların

içine kapsüllemesi sonucunda içinde buldukları ortama ilişkisinin tamamen kesilebildiği görülmüştür. Bu da fenolik bileşiklerin çevredeki proteinlerle bileşik oluşturarak sistemde çökelti ve faz ayrımı oluşturma ihtimalini ve bunun sonucunda antioksidan özelliklerini kaybetme riskini ortadan kaldırmıştır [2]. Başka bir çalışmada, zerdeçaldan elde edilen kurkumin bileşiğinin lipozomla kaplandığında baharatın işlenmesi sırasında ortaya çıkabilecek yüksek sıcaklık koşullarına daha yüksek direnç gösterdiği, aynı zamanda bir serbest radikal olan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)'ı toplama özelliğinin kapsüllememiş kontrole göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [83]. Hsieh ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise sterik asit ve α -tokoferol ile hazırlanan lipozomlarla kapsüllemiş α -amilaz'ın ortamdaki pepsin ile ilişkisinin kesildiğini, ayrıca sıcaklık ve pH gibi dış koşullara karşı direncinin artırıldığı görülmüştür [17]. Enzim immobilizasyonu sonucunda enzim geri kazanımının, aktivitesinin ve stabilitesinin artırılması amaçlı bir başka çalışmada ise, kitozanaz enzimi içeren lipozomların farklı ekstrem pH ve sıcaklık koşullarında daha yüksek stabilize gösterirken, lipozomların enzimin etki ettiği yüzey alanını artırması sonucu; enzim aktivitesinin belirgin şekilde artırıldığı gözlemlenmiştir [84]. Tüm bu örnekler, lipozomal kapsülasyonunun gıdalarda dış etkiler sonucunda bozunma yaşayabilecek bileşiklerin korunabileceğinin göstergesidir.

Antimikrobiallerin Lipozomlarla Kapsülasyonu

Son yıllarda lipozom üzerine çalışmaların artış gösterdiği bir başka uygulama alanı da lipozomların içerisine peptit bazlı antimikrobiallerin kapsüllemesi ile gıdaya salınımlarının kontrollü olarak gerçekleştirilmesi ve böylece verimlerinin artırılması üzerinedir. Konuda yapılan ilk çalışmalardan birinde, Degnan ve Luchansky [85], bir bakteriosin olan pediosin ACH'in lipozom ile kapsülasyonu sonucunda, pişirilmiş etlerin artan sularından %28 civarında antimikrobiyal bozunmadan geri alabildikleri [85]. Süt ürünlerinde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada pediosin geri kazanımının %62'ye kadar çıkarılabildiği gösterilmiştir [86]. Bu metoda sayesinde bakteriosin verimi artırılırken, bakteriosinlerin gıdalardaki yağ ve protein ile etkileşim içine girip proteolize neden olması engellenmiştir [85, 86].

Günümüzde bu konudaki çalışmalar gıdalarda kullanımına izin verilen tek bakteriosin olan nisin üzerine yoğunlaşmıştır [87]. Nisin'in; Nisin A ve Nisin Z olmak üzere iki türüdür. Bu iki tür arasında sadece amino asit zincirlerindeki bir protein açısından fark vardır; Nisin A , 27. amino asit olarak histidin içerirken Nisin Z , asparagine içerir [88], ve bu fark Nisin Z'ye Nisin A' ya kıyasla daha yüksek bir difüzyon hızı sağlar. Bu da kapsüllemeye aranan bir özelliktir. Bu nedenle nisinin lipozomal kapsülasyonunda çalışmalar Nisin Z ile gerçekleştirilmektedir.

Laridi ve ark. [89] çedar peyniri yapımında lipozomlara kapsüllemiş nisin Z'nin etkisini araştırmıştır. Kapsüllemiş nisin Z'nin indikatör bakteri olarak kullanılan canlı *lactococci* sayısını belirgin bir şekilde düşürürken, peynirin doğal fermentasyonuna bir etkisi

olmadığı, ve peynir yapımı boyunca sıcaklık değişimlerine karşı direnç gösterdiği ortaya konulmuştur. Benech ve ark. [13] tarafından nisin Z ile gerçekleştirilen çalışmada lipozom ile kapsüllemiş nisin Z'in peynirin duysal, yapısal ve fizikokimyasal özellikler üzerine etkisi 6 aylık olgunlaşma süreci boyunca izlenmiştir. Lipozomla kapsüllemiş nisin Z içeren peynirler, kontrol olarak direk nisin Z üreten bakteriyel kültür (*Lactococcus lactis* üst türünden) eklenen peynirle kıyaslanmıştır ve kontrol peynirlerinde proteolitik ve lipolitik reaksiyonlar sonucu gözlemlenen acımsı bir tat görülürken, kapsüllemiş nisin Z içeren peynirlerde diğerlerinin aksine tatta ve peynirin yapısında bir bozunma gözlemlenmemiştir [13]. Were ve ark.'ın [90] yaptıkları çalışmada lipozomların içine kapsüllemiş nisin Z'nin serbest nisin Z'ye kıyasla hedef bakteri sayısında 2 log daha fazla azalma gösterdiği gözlemlenmiştir. Nisin ve bakteriosin-benzer madde P34'ün soya lesitinden elde edilen PC-kolesterol lipozomlarla kapsülendiği bir başka çalışmada, Malheiros ve ark. [91], 21 gün boyunca 7°C de bekletilen başlangıçta hedef bakteri ile kontamine edilmiş örneklerde yaptığı gözlemlerde; serbest bakteriosinlere kıyasla kapsüllemiş bakteriosinin hedef bakteri sayısını azaltmakta belirgin bir şekilde etkili olduğunu göstermiştir. Minimum bakteri sayısı ise 10 gün sonunda elde edilmiştir. Tüm bu örnekler antimikrobiyal olarak bakteriosinlerin kapsülasyonunun bakteriosinlerin etkisini, verimini, stabilitesini ve geri kazanımını artırırken; ortamdaki diğer maddelerle etkileşimini keserek gıdalarda oluşabilecek duysal negatif etkili bozunmaları minimize ettiğinin göstergesidir.

SONUÇ

Lipozomların gıdalarda kullanımı yeni keşfedilen ve halen gelişmekte olan bir alandır. Gıda bilimciler lipozomları proteinler, enzimler, vitaminler ve aromalar gibi fonksiyonel bileşenlerin kontrollü salınımı için çeşitli gıda uygulamalarında kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar lipozomların gıdalarda da kullanımının uygulanabilir ve birçok açıdan diğer kapsülasyon ajanlarından daha avantajlı olduğunu göstermiştir. Lakin lipozomların gıdalarda kullanımına ilişkin salınım kinetiği çalışmaları, saflaştırılmamış lesitinden lipozom üretilerek maliyetin düşürülmesi, lipozomların gıdalara yerleştirildikten sonraki depo ve raf ömrü boyunca gıda ile ilişkisinin izlenmesi gibi bazı alanlarda halen yeterli çalışma bulunmamaktadır. Gelecekteki lipozom ve gıda ilişkili araştırmalar bu alanlara yönelmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] Taylor, T.M., P.M., Davidson, B.D., Bruce, Weiss, J., 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(7-8): 587-605.
- [2] Gibis, M., Vogt, E., Weiss, J., 2012. Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & Function* 3(3): 246-254.
- [3] Laye, C., McClements, D.J., Weiss, J., 2008. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. *Journal of Food Science* 73(5): N7-N15.

- [4] Administration, U.S.F.a.D., 2006. Guidance for industry: Guidance on the labeling of certain uses of lecithin derived from soy under section 403(w) of the federal food, drug, and cosmetic act.
- [5] Chun, J.Y., Choi, M.J., Min, S.G., Weiss, J., 2013. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocolloids* 30(1): 249-257.
- [6] Taylor, K.M.G., Morris, R.M., 1995. Thermal-analysis of phase-transition behavior in liposomes. *Thermochimica Acta* 248: 289-301.
- [7] Lasic, D.D., 1998. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* 16(7): 307-321.
- [8] Gabizon, A., Shmeeda, H., Horowitz, A.T., Zalipsky, S., 2004. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56(8): 1177-1192.
- [9] Jain, P.T., Seth, P., Gewirtz, D.A., 1999. Estradiol enhances liposome-mediated uptake, preferential nuclear accumulation and functional expression of exogenous genes in MDA-MB231 breast tumor cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1451(2-3): 224-232.
- [10] Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C.N., 1999. Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50(3): 213-224.
- [11] Chonn, A., Cullis, P.R., 1998. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 30(1-3): 73-83.
- [12] Chai, R., Zhang, G., Sun, Q., Zhang, M.Y., Zhao, S.J., Qiu, L.Y., 2013. Liposome-mediated mycelial transformation of filamentous fungi. *Fungal Biology* 117(9): 577-583.
- [13] Benech, R.O., Kheadr, E.E., Lacroix, C., Fliss, I., 2003. Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of Lactobacillus added-Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* 86(6): 1895-1909.
- [14] Wechtersbach, L., Ulrich, N.P., Cigic, B., 2012. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT-Food Science and Technology* 45(1): 43-49.
- [15] Hideshima, T., Kato, Y., 2006. Oscillatory reaction of catalase wrapped by liposome. *Biophysical Chemistry* 124(2):100-105.
- [16] Barenholz, Y., 2001. Liposome application: problems and prospects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6(1): 66-77.
- [17] Hsieh, Y.F., Chen, T.L. Wang, Y.T., Chang, J.H., Chang, H.M., 2002. Properties of liposomes prepared with various lipids. *Journal of Food Science* 67(8): 2808-2813.
- [18] Picon, A., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 1994. The effect of liposome encapsulation of chymosin derived by fermentation on Manchego cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 77(1): 16-23.
- [19] Malheiros, P.D., Daroit, D.J., Brandelli, A., 2010. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology* 21(6): 284-292.
- [20] Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Decker, E.A., 2007. Yellow discoloration of the liposome system of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) as influenced by lipid oxidation. *Food Chemistry* 102(1): 219-224.
- [21] Rasti, B., S. Jinap, M.R. Mozafari, and A.M. Yazid, 2012. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry* 135(4): 2761-2770.
- [22] Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheiriloom, A., Cleymand, F., Linder, M., 2012. Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant L-carnosine. *Food Chemistry* 134(2): 632-640.
- [23] Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z.E., Singh, H., 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(13): 2038-2045.
- [24] 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(4): 833-844.
- [25] Singh, A.K., Das, J., 1998. Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophysical Chemistry* 73(1-2): 155-162.
- [26] Zhang, X.X., Guo, S.Y., Fan, R., Yu, M.R., Li, F.F., Zhu, C.L., Gan, Y., 2012. Dual-functional liposome for tumor targeting and overcoming multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells. *Biomaterials* 33(29): 7103-7114.
- [27] Hickey, S.R., Roberts, H.J., Miller, N.J., 2008. Pharmacokinetics of oral vitamin C. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* 17(3): 169-177.
- [28] Marsanasco, M., Marquez, A.L., Wagner, J.R., Alonso, S.D., Chiaramoni, N.S., 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International* 44(9): 3039-3046.
- [29] Fennema, O.R., 1996. *Food Chemistry*, Third Edition. 1996: Taylor & Francis.
- [30] Grit, M. and J.A. Crommelin, 1993. Chemical-stability of liposomes - implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids* 64(1-3): 3-18.
- [31] Reineccius, G.A., 1995. Liposomes for controlled-release in the food-industry. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* 590: 113-131.
- [32] Meisner, D., Mezei, M., 1995. Liposome ocular delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16(1): 75-93.
- [33] Torchilin, V.P., Weissig, V., 2003. *Liposomes: A Practical Approach*. 2003: OUP Oxford.
- [34] Fang, Z.X., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology* 21(10): 510-523.

- [35] Lasch, J., Berdichevsky, V.R., Torchilin, V.P., Koelsch, R., Kretschmer, K., 1983. A method to measure critical detergent parameters - preparation of liposomes. *Analytical Biochemistry* 133(2): 486-491.
- [36] W.W., C. 2013. Phosphatidylcholine and related lipids structure, occurrence, biochemistry and analysis. 2013 [October 10, 2013]; Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pc/index.htm>.
- [37] Koynova, R., Caffrey, M., 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes* 1376(1): 91-145.
- [38] Sulkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K., Sulkowska, A., 2005. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure* 744: 737-747.
- [39] Barenholz, Y., Gibbes, D., Litman, B.J., Goll, J., Thompson, T.E., Carlson, F.D., 1977. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry* 16(12): 2806-2810.
- [40] Woodle, M.C., Papahadjopoulos, D., 1989. Liposome preparation and size characterization. *Methods in Enzymology* 171: 193-217.
- [41] Payne, N.I., Browning, I., Hynes, C.A., 1986. Characterization of proliposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75(4): 330-333.
- [42] Rodriguez, R.B., Xamani, M.S., 2003. Liposomes prepared by high-pressure homogenizers. *Liposomes: Part A* 367: 28-46.
- [43] Memoli, A., Palermi, L.G., Travagli, V., Alhaique, F., 1995. Egg and soya phospholipids - sonication and dialysis - a study on liposome characterization. *International Journal of Pharmaceutics* 117(2): 159-163.
- [44] Barnadas-Rodriguez, R., Sabes, M., 2001. Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *International Journal of Pharmaceutics* 213(1-2): 175-186.
- [45] Kulshreshtha, A.K., Singh, O.N., Wall, G.M., 2009. Pharmaceutical Suspensions: From Formulation Development to Manufacturing. 2009: Springer.
- [46] Cho, E.C., Lim, H.J., Shim, J., Kim, J., Chang, I.S., 2007. Improved stability of liposome in oil/water emulsion by association of amphiphilic polymer with liposome and its effect on bioactive skin permeation. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 299(1-3): 160-168.
- [47] Foradada, M., Pujol, M.D., Bermudez, J., Estelrich, J., 2000. Chemical degradation of liposomes by serum components detected by NMR. *Chemistry and Physics of Lipids* 104(2): 133-148.
- [48] Wang, T., Deng, Y.J., Geng, Y.H., Gao, Z.B., Zou, H.P., Wang, Z.Z., 2006. Preparation of submicron unilamellar liposomes by freeze-drying double emulsions. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1758(2): 222-231.
- [49] Gregoriadis, G., Bacon, A., Caparros-Wanderley, W., and McCormack, B., 2003. Plasmid DNA vaccines: Entrapment into liposomes by dehydration-rehydration. *Liposomes: Part A* 367: 70-80.
- [50] Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D.J., Decker, E.A., 2010. Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(9): 5679-5684.
- [51] Biltonen, R.L., Lichtenberg, D., 1993. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids* 64(1-3): 129-142.
- [52] Marcelja, S., Wolfe, J., 1979. Properties of bilayer membranes in the phase-transition or phase-separation region. *Biochimica Et Biophysica Acta* 557(1): 24-31.
- [53] Heurtaut, B., Saulnier, P., Pech, B., Benoit, J.P., Proust, J.E., 2003. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 30(3): 225-235.
- [54] Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., Kondo, T., 1991. Temperature-induced and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta-potential data. *Biophysical Chemistry* 41(2): 175-183.
- [55] Angelini, G., Boncompagni, S., De Maria, P., De Nardi, M., Fontana, A., Gasbarri, C., Menna, E., 2007. Layer-by-layer deposition of shortened nanotubes or polyethylene glycol-derivatized nanotubes on liposomes: A tool for increasing liposome stability. *Carbon* 45(13): 2479-2485.
- [56] Volodkin, D.V., Michel, M., Schaaf, P., Voegel, J.C., Möhwald, H., Ball, V., 2008. Chapter 1 Liposome Embedding into Polyelectrolyte Multilayers: A New Way to Create Drug Reservoirs at Solid - Liquid Interfaces, in *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, A.L.L. Professor Dr, Editor. 2008, Academic Press. p. 1-25.
- [57] Blomberg, E., Claesson, P.M., Warnheim, T., 1999. Surface interactions in emulsions and liposome solutions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* 159(1): 149-157.
- [58] Guo, J., Ping, Q., Jiang, G., Huang, L., Tong, Y., 2003. Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics* 260(2): 167-173.
- [59] Masterjohn, C., 2005. Cholesterol's Importance to the Cell Membrane. <http://www.cholesterol-and-health.com/Cholesterol-Cell-Membrane.html>
- [60] Fridjonsson, E.O., Flux, L.S., Johns, M.L., 2012. Determination of mean droplet sizes of water-in-oil emulsions using an Earth's field NMR instrument. *Journal of Magnetic Resonance* 221: 97-102.
- [61] Denkova, P.S., Tcholakova, S., Denkov, N.D., Danov, K.D., Campbell, B., Shawl, C., Kim, D., 2004. Evaluation of the precision of drop-size determination in oil/water emulsions by low-resolution NMR spectroscopy. *Langmuir* 20(26): 11402-11413.
- [62] Shimanouchi, T., Ishii, H., Yoshimoto, N., Umakoshi, H., Kuboi, R., 2009. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* 73(1): 156-160.

- [63] Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R., Brandl, M., 2001. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 223(1-2): 55-68.
- [64] Cho, E.C., Lim, H.J., Kim, H.J., Son, E.D., Choi, H.J., Park, J.H., Kim, J.W., Kim, J., 2009. Role of pH-sensitive polymer-liposome complex in enhancing cellular uptake of biologically active drugs. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* 29(3): 774-778.
- [65] Sroda, K., Michalak, K., Maniewska, J., Gryniewicz, G., Szeja, W., Zawisza, J., Hendrich, A.B., 2008. Genistein derivatives decrease liposome membrane integrity - Calcein release and molecular modeling study. *Biophysical Chemistry* 138(3): 78-82.
- [66] Castile, J.D., Taylor, K.M.G., Buckton, G., 1999. A high sensitivity differential scanning calorimetry study of the interaction between poloxamers and dimyristoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 182(1): 101-110.
- [67] Voinova, M.V., Galkin, V.L., Kosevich, A.M., 1990. Kinetics of liposome volume and permeability changes during the lipid phase-transitions. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 24(2): 143-154.
- [68] Lundahl, P., Beigi, F., 1997. Immobilized liposome chromatography of drugs for model analysis of drug-membrane interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23(1-3): 221-227.
- [69] Min, B., Nam, K.C., Ahn, D.U., 2010. Catalytic mechanisms of metmyoglobin on the oxidation of lipids in phospholipid liposome model system. *Food Chemistry* 123(2): 231-236.
- [70] Yu, H.Y., Liao, H.M., 1996. Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* 127(1): 1-7.
- [71] Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., Leuenberger, H., 2005. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics* 296(1-2): 44-54.
- [72] Yarosh, D., Klein, J., 1996. The role of liposomal delivery in cutaneous DNA repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 18(3): 325-333.
- [73] Tseng, W.C., Huang, L., 1998. Liposome-based gene therapy. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1(5): 206-213.
- [74] Law, B.A., King, J.S., 1985. Use of liposomes for proteinase addition to cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 52(1): 183-188.
- [75] Kirby, C.J., Brooker, B.E., Law, B.A., 1987. Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme. *International Journal of Food Science and Technology* 22(4): 355-375.
- [76] Kheadr, E.E., Vuillemand, J.C., El-Deeb, S.A., 2003. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International* 36(3): 241-252.
- [77] Vafabakhsh, Z., Khosravi-Darani, K., Khajeh, K., Jahadi, M., Komeli, R., Mortazavian, A.M., 2013. Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposomes. *Biochemical Engineering Journal* 72: 11-17.
- [78] Picon, A., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 1997. Proteinases encapsulated in stimulated release liposomes for cheese ripening. *Biotechnology Letters* 19(4): 345-348.
- [79] Kheadr, E.E., Vuillemand, L.C., El-Deeb, S.A., 2002. Acceleration of cheddar cheese lipolysis by using liposome-entrapped lipases. *Journal of Food Science* 67(2): 485-492.
- [80] Banville, C., Vuillemand, J.C., Lacroix, C., 2000. Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. *International Dairy Journal* 10(5-6): 375-382.
- [81] Matsuzaki, M., Mccafferty, F., Karel, M., 1989. The effect of cholesterol content of phospholipid-vesicles on the encapsulation and acid resistance of beta-galactosidase from *Escherichia coli*. *International Journal of Food Science and Technology* 24(4): 451-460.
- [82] Rao, D.R., Chawan, C.B., Veeramachaneni, R., 1995. Liposomal encapsulation of beta-galactosidase - comparison of 2 methods of encapsulation and in-vitro lactose digestibility. *Journal of Food Biochemistry* 18(4): 239-251.
- [83] Niu, Y.M., Ke, D., Yang, Q.Q., Wang, X.Y., Chen, Z.Y., An, X.Q., Shen, W.G., 2012. Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. *Food Chemistry* 135(3): 1377-1382.
- [84] Ngo, K.X., Umakoshi, H., Shimanouchi, T., Sugaya, H., Kuboi, R., 2010. Chitosanase displayed on liposome can increase its activity and stability. *Journal of Biotechnology* 146(3): 105-113.
- [85] Degnan, A.J., Luchansky, J.B., 1992. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin ach and liposome-encapsulated pediocin ach. *Journal of Food Protection* 55(7): 552-554.
- [86] Degnan, A.J., Buyong, N., Luchansky, J.B., 1993. Antilisterial activity of pediocin ach in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International Journal of Food Microbiology* 18(2): 127-138.
- [87] Hansen, J.N., 1994. Nisin as a model food preservative. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34(1): 69-93.
- [88] Devos, W.M., Mulders, J.W.M., Siezen, R.J., Hugenholtz, J., Kuipers, O.P., 1993. Properties of nisin-Z and Distribution of its gene, nisz, in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 59(1): 213-218.
- [89] Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuillemand, J.C., Lacroix, C., Fliss, I., 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal* 13(4): 325-336.
- [90] Were, L.M., Bruce, B.D., Davidson, P.M., Weiss, J., 2003. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27): 8073-8079.

- [91] Malheiros, P.D., Sant'Anna, V., Barbosa, M.D., Brandelli, A., Franco, B.D.G.D., 2012. Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156(3): 272-277.
-