

نانوکپسولسیون لیپیدی زیگزانتین و ارزیابی مقاوت سرمایی آن در مدل غذایی شیر

رویا اصائلو^۱، مزگان امتیازجو^{۲*}، اقدس بنایی^۳، محمدعلی حصارى نژاد^۴، فاطمه اشرفی^۵

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۳- گروه پژوهشی نانو و بیوفیزیک، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی (ACECR)، تهران، ایران

۴- گروه فرآوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۵- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

* تهران، ایران

M_emyazjoo@iau-tnb.ac.ir; Moz_emyazjoo@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۰۸

چکیده

غنی سازی غذای انسان با استفاده از فناوری نو مثل نانوحامل های لیپیدی، یک ابزار ساده و قابل دسترس است. بر این اساس، در مطالعه حاضر با هدف ارزیابی حسی و تولید فراورده غذایی سالم و مفید به بررسی غنی سازی شیر با نانوکپسول های لیپیدی زیگزانتین و ارزیابی محافظت سرمایی آن پرداخته شد. طی تحقیق تجربی- آزمایشگاهی، استخراج زیگزانتین از اسپیرولینا پلاتنسیس، نانوحامل های تولید شده برای غنی سازی شیر به عنوان یک سیستم مدل غذایی استفاده شد. سه نمونه شیر خام، شیر غنی شده با نانوحامل لیپیدی حاوی زیگزانتین و شیر غنی شده با نانوحامل لیپیدی به صورت مستقیم (در غلظت مشابه نانوحامل) بررسی شد. برای بررسی کارایی نانوحامل های تولید شده، ترکیب های محافظ سرما (گلوکز، سوربیتول، گلیسرین، لاکتوز و ساکارز)، به شیر اضافه شد. ساکاروز بهترین محافظ سرما شناخته شد. ارزیابی حسی شیر غنی شده در مقیاس هدونیک پنج نقطه ای صورت پذیرفت و پارامترهای حسی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. داده ها با استفاده از نرم افزار Mini-tab ۲۰۱۶ آنالیز شد. نتایج تفاوت معنی داری بین ویژگی های حسی شیر شاهد با شیر غنی شده با نانوحامل ها ($P < 0/05$) مشاهده نشد. کمترین اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی در پوشش نانوحامل های با ترکیبات محافظ سرما، به ترتیب، ۳۲۰/۸۲ و ۰/۲۶ تا ۰/۳۱ به دست آمد. پتانسیل زتا، ۶/۰۳- گزارش شد. با استفاده از غنی سازی شیر با نانوحامل های حاوی زیگزانتین، علاوه بر سلامت بینایی و پوست می توان مشکلات مربوط به کمبود افزودنی های طبیعی مفید و عدم حلالیت فراورده غذایی را رفع کرد.

کلید واژگان: غنی سازی، نانوحامل لیپیدی، زیگزانتین، محافظ سرما، ارزیابی حسی

۱- مقدمه

مفهوم غذاهای غنی شده، شامل مواد غذایی است که بر روی سلامت میزبان تأثیر مفید داشته و علاوه بر اثرات تغذیه‌ای، منجر به کاهش خطر ابتلاء به بیماری‌های مزمن می‌شوند. با توجه به پتانسیل بالای بازار، توسعه غذاهای غنی شده رونق یافت [۱]. زیگزانتین به‌عنوان فیلترهای نور آبی و پاک‌کننده‌های اکسیژن فعال در شبکه می‌باشند تا سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو محافظت کند. از آنجا که انسان قادر به سنتز گزانتوفیل‌ها نیست دریافت رژیم غذایی حاوی گزانتوفیل، برای تأمین این عناصر غذایی به بدن بسیار حیاتی است [۲]. متوسط مصرف زیگزانتین حدود ۲ میلی‌گرم در روز است [۳]. در دسترس قرارگرفتن این محصول برای تمامی اقشار جامعه از جمله سالمندان، کودکان و نوجوانان، مردان و زنان لازم است. بنابراین، زیگزانتین برای سلامت بینایی در افرادی که رژیم غذایی فقیری دارند، به‌ویژه برای سالمندان پیشنهاد شده است. مواد غذایی غنی‌شده مشابه مواد غذایی عادی هستند که به‌عنوان قسمتی از رژیم غذایی معمول مصرف می‌شوند، اما علاوه بر ویژگی تغذیه‌ای اولیه، سلامت پایه را بهبود می‌دهند [۳]. ترکیبات غنی‌شده، محصولات یا ترکیباتی هستند که از مواد غذایی استخراج‌شده (مانند زیگزانتین از اسپیرولینا) و سپس به شکل شیر غنی‌شده یا دارویی مانند قرص، کپسول، پودر یا شربت عرضه می‌شوند، این ترکیبات فواید فیزیولوژیکی داشته و در مقابل بیماری‌های مزمن نقش محافظتی دارند. ترکیب غذایی غنی‌شده، یک مکمل رژیمی و شکل تغلیظ‌شده‌ای از یک عامل زیست فعال موجود در مواد غذایی، برای بهبود سلامتی است [۴]. ارتباط بین غذا و پیش‌گیری از بیماری، سبب شده است تا غذاها و نوشیدنی‌های اصلی را با مواد غذایی غنی‌کنند و غذاهای کاربردی تولید کنند. با این حال، با توجه به اینکه نانوحامل‌های حاوی زیگزانتین

نمی‌توانند به طور کامل در آب و نوشیدنی حل شوند، بنابراین، در محصولاتی مانند نانوحامل‌های لیپیدی در شیر پرچرب می‌توانند حلالیت خوبی داشته باشند [۵]. غنی‌سازی غذاهای مبتنی بر محیط چربی به دلیل حلالیت ضعیف ماده زیست فعال در آب و زیست‌فراهمی پایین، سبب وجود آمدن نانوحامل‌های لیپیدی شده است [۵]. شیر حاوی نانوحامل لیپیدی یک ترکیب مغذی قابل حل در چربی است و عملکرد اصلی آن افزایش جذب کلسیم روده‌ای، تنظیم تعادل فسفر و ایجاد استخوان‌سازی و کانی‌سازی طبیعی است. وجود سطح کافی نانوحامل حاوی زیگزانتین می‌تواند سبب سلامت چشم و جوانی پوست شود. به‌ویژه در بزرگسالان سبب کاهش خطر ابتلا به دژنراسیون ماکولا و آب مروارید می‌شود [۵،۳].

امروزه بحث این است که با افزایش استفاده از نانوذرات برای مقاصد تجاری و صنعتی، آیا مزایای متعدد نانوذرات می‌تواند بر هزینه‌های اقتصادی، اثرات زیست محیطی و خطرات ناشناخته ناشی از استفاده از آنها غلبه کند یا خیر. مطالعات اندکی در مورد اثرات سمی و زیست محیطی ناشی از قرار گرفتن مستقیم و غیرمستقیم با نانوذرات انجام شده است. بنابراین، مطالعات کافی برای تعیین خطرات واقعی و دقیق استفاده از نانوذرات مورد نیاز است [۶].

پژوهش Abdulaziz Almalik و همکاران در سال ۲۰۱۷ بر تأثیر محافظت از انجماد بر پایداری اندازه ذرات و حفظ نانوذرات کیتوزان توسط محافظت‌کننده سرما (ساکارز، گلوکز، ترهالوز، مانیتول، پلی‌اتیلن گلیکول و پلی‌اتیلن) نشان داد قندهای ساکارز و ترهالوز دارای بیشترین اثر محافظتی را داشت [۷]. Kiani و همکاران (۲۰۱۸) در نتایج ارزیابی حسی از شیر غنی‌شده با نانوحامل‌های لیپیدی نانو ساختار (NLCs) حاوی ویتامین D₃ و شیر غنی شده با استفاده از ویتامین به‌طور مستقیم،

مطالعه تاثیر ترکیبات مختلف محافظ سرما شامل لاکتوز، ساکارز، سوربیتول، گلوکز و گلیسیترین بر نانوحامل زیگزانتین، غنی سازی شیر با استفاده از این ترکیب و بررسی ویژگی های حسی آن بود. و نتایج حاصل از این پژوهش دارای اهمیت ویژه ای در حوزه مدیریت این ماده غذایی بوده و می تواند در صنایع غذایی کاربرد داشته باشد.

۱- مواد و روش ها

۲-۱ استخراج زیگزانتین

در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی زیگزانتین با استفاده از جلبک *اسپیروولینا پلاتنسیس* با وزن تقریبی ۱۰ گرم استخراج شد. زیگزانتین توسط روش Chen و همکاران استخراج و خلص سازی شد [۴، ۱۰]. به طور خلاصه ۲۵ میلی لیتر محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ مولار، حاوی ۲/۵ درصد اسید آسکوربیک به میکروجلبک خشک اضافه شد. سپس، مخلوط با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۱۰۰۰۰ xg به مدت ۱۵ دقیقه از هم جدا شد و مایع رویی جمع آوری شد. در این مرحله دو فاز با قیف جداکننده از هم جدا شدند. فاز آلی به وسیله تبخیرکننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تا خشک شدن کامل تبخیر شد. بعد از آن تا زمان استفاده در دمای ۲۲- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای شناسایی و درصد خلوص زیگزانتین، از دستگاه کروماتوگرافی ضد جریان با سرعت بالا (HPLC) مدل Todd Lorenz, (2000) Hewlett Packard 1046A HP استفاده شد. زیگزانتین استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) در ۹۱/۴ درصد جدا شد. نمونه خام با کروماتوگرافی ضد جریان با سرعت بالا توسط [۱۱] جدا سازی شد. برای تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی از یک سیستم HPLC سری Agilent ۱۲۰۰ با پمپ چهارتایی و گاززدا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی D۱۳۱۵G و از ستون Eurosphere RP (۵-۱۰۰

اختلاف معنی داری بین نمونه های شیر و نمونه های شیر غنی شده برای کلیه ویژگی های مورد بررسی مشاهده نشد. به طور کلی، نتایج ارزیابی حسی نشانگر پذیرش شیر غنی شده با NLC حاوی ویتامین D₃ بوده است [۸]. مطالعه Fathi و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که غنی سازی مستقیم شیر با هسپرتین سبب افزایش معنی دار ($P < 0/05$) تلخی، زردی و کاهش معنی دار ($P < 0/05$) میزان یکنواختی و پذیرش کلی شیر می شود. کاهش یکنواختی هسپرتین به دلیل حلالیت پایین آن در محیط آبی می باشد. از طرف دیگر نتایج قابل قبولی با استفاده از شیر غنی شده با نانوحامل های هسپرتین به دست آمد. یافته ها نشان داد تفاوت معنی داری بین ویژگی های حسی شیر شاهد با شیر غنی شده با نانو حامل ها ($P > 0/05$) وجود ندارد [۹]. زردینی و همکاران در سال ۲۰۱۸، از روش کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتونی استفاده کرد. مقدار ماده زیست فعال آزاد شده را در طول موج ۴۷۲ نانومتر از طیفسنجی اندازه گیری کرد [۴].

با توجه به تغییر سبک زندگی و افزایش روز افزون کمبود مواد مغذی برای استفاده همه افراد جامعه، از جمله کودکان و سالمندان، و نیز با توجه به عوارض گسترده بالینی، اجتماعی و اقتصادی بیماری های حاصل از سوء تغذیه و اثرات کاربردی و مفید شیر غنی شده با پوشش نانوحامل های لیپیدی در بدن [۳، ۱] و همچنین نظر به اینکه عمده مطالعات در خصوص شیر غنی شده حاوی نانوحامل های پوشیده شده با ترکیبات محافظ سرما یا بدون محافظ، در ماست و یا سایر رنگدانه های کاروتنوئیدی بوده اند، تحقیقات محدودی در حوزه غنی سازی شیر حاوی نانوحامل های لیپیدی زیگزانتین انجام گرفته است. بر این اساس پژوهش حاضر به غنی سازی شیر با نانوکپسول های لیپیدی زیگزانتین و ارزیابی مقاوت سرمایی نانوکپسول ها می پردازد. هدف از این

حرارتی نانوحامل‌ها، بخشی از نانودیسیپرسیون تولیدی در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۱ میلی‌بار به مدت ۴۸ ساعت تحت فرایند خشک کردن انجمادی (Christ Alpha LD, Germany) قرار گرفتند [۱۱].

۲-۲ روش به کارگیری محافظ‌های سرما (Cryoprotectants)

آسیب دیدگی نانوحامل‌ها طی فرایند خشک کردن انجمادی امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین، استفاده از ترکیبات محافظ سرما (Cryoprotectants) توصیه می‌شود. محلول نانوحامل به نسبت یک به یک حجمی توسط محلول‌های مختلف (ترکیبات محافظ سرما) گلوکز، سوربیتول، گلیسرول، لاکتوز و ساکارز (۱/۵ درصد وزنی حجمی) رقیق شدند [۱۲] و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شد. نمونه‌های لیوفیلیزه توسط آب دیونیزه بازیابی و اندازه ذرات شاخص بس پاشیدگی^۳ (PDI) و پتانسیل زتا آنها اندازه‌گیری شد.

۱-۳-۲ تعیین اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی در نانو حامل‌های حاوی ترکیب محافظ سرما

متوسط اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی، بر مبنای روش تفرق نور پویا و توسط دستگاه آنالیز اندازه ذرات (Partical Size Analyzer (VASCO), Cordouan Technologies, France) در زاویه ثابت ۹۰ درجه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری اندازه ذرات و پراکندگی آن‌ها، نانوسوسپانسیون‌ها به نسبت ۱ به ۱۰ با آب دیونیزه رقیق‌سازی شدند [۱۳].

۳-۲-۲ اندازه‌گیری پتانسیل زتا در نانو حامل‌های حاوی ترکیب محافظ سرما

با استفاده از دستگاه زتامتر (Zeta Compact, CAD instrumentation, France) در این آزمون ابتدا تحرک الکتروفورتیک ذرات دیسیپرسیون در

ستون ۱۸C، ۴/۳۶۰۰ میلی‌متر (Knauer، آلمان) استفاده شد. متانول-دی کلرومتان-استونیتریل-آب (v/v/v/v ۶۷/۵/۵/۲۲/۵/۹/۰/۵) به‌عنوان فاز متحرک، با سرعت جریان ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دما در ۲۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داشته شد و پس‌اب در طول موج ۴۵۳ نانومتر اندازه‌گیری شد.

۲-۲ تولید نانوحامل لیپیدی حاوی زیگزانتین

تولید نانوحامل‌های لیپیدی از ترکیب دو روش هوموژنیزاسیون با نیروی برشی بالا و امواج فراصوت انجام شد. برای تولید حامل‌های لیپیدی نانو ساختار و نانوذرات لیپیدی جامد، فاز آبی (حاوی امولسیفایر تویین ۸۰) و فاز لیپیدی (حاوی لسیتین و زیگزانتین) به‌طور جداگانه تهیه شدند. برای تولید فاز چربی، یا مخلوط چربی‌ها در بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد گرم شد. بارگذاری زیگزانتین با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم زیگزانتین به ازای هر گرم چربی به آن افزوده شد. بعد از آماده‌سازی محلول آبی حاوی ۳ درصد امولسیفایر تویین ۸۰، دو فاز در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای رسیدن به دمای یکسان قرار داده شدند. بعد از آن، محلول آبی به فاز روغنی افزوده شد و با التراتوراکس (T 25 digital ULTRA- TURRAX, IKA, Germany) در ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت یک دقیقه هوموژن‌سازی انجام شد. پیش‌امولسیون تولیدشده توسط پروب فراصوت (XL 2020, Misonix, USA) با توان خروجی ۲۵ درصد و تعداد سیکل ۵۰ (۴ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) تحت تیمار فراصوت قرار گرفت. بعد از پایان این مرحله، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه التراتوراکس در ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه هوموژن شدند. در نهایت نمونه‌های تولیدی به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ قرار گرفته تا ضمن تشکیل نانوذرات لیپیدی در آن، دمای نمونه‌ها کاهش یابد. برای بررسی ویژگی‌های

^۳ Particle dispersion index

سانتی‌گراد در اختیار ارزیابان قرار گرفت. ارزیابی در مقیاس هدونیک پنج نقطه‌ای انجام شد [۱۵].

۳- نتایج

۳-۱ استخراج زیگزانتین از اسپیرولینا پلاتنسیس

استخراج زیگزانتین با استفاده از دستگاه HPLC انجام شد و درجه خلوص ۹۱/۴ درصد گزارش شد (نمودار ۱).

۳-۲ تولید نانوحامل‌های لیپیدی زیگزانتین

نتایج حاصل از تولید نانوحامل‌های لیپیدی زیگزانتین با ترکیب دو روش هموژنیزاسیون با نیروی برشی بالا و امواج فراصوت نشان دادند که نانوحامل‌های NLC نسبت به SLN، کارایی و بارگذاری بهتری داشت [۱۱].

۳-۳ تاثیر محافظ سرماها بر نانوحامل‌های زیگزانتین

با توجه به نتایج پژوهش انجام شده [۱۱]، نانوحامل NLC بهترین اندازه، پتانسیل زتا، کارایی انکپسولاسیون و رفتار رهایش را داشت. در مجموع توصیفات بیان شده، این نمونه برای مطالعه تاثیر محافظ سرماها انتخاب شد.

۳-۳-۱ تعیین اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی در

نانو حامل‌های حاوی ترکیب محافظ سرما

اندازه ذرات نانوحامل‌های تولیدی با استفاده از تکنیک پراش نور لیزر تعیین شد (نمودار ۲- و نمودار ۳-).

یک میدان الکتریکی توسط روش‌های میکروسکوپی تعیین، و پس از آن پتانسیل زتا با استفاده از معادله اسمولو چوسکی (معادله ۱) توسط دستگاه زتامتر محاسبه شد.

(۱)

$$U_{\delta} = \frac{4\pi\epsilon_r\epsilon_0}{6\pi\mu} \zeta(1 + kr)$$

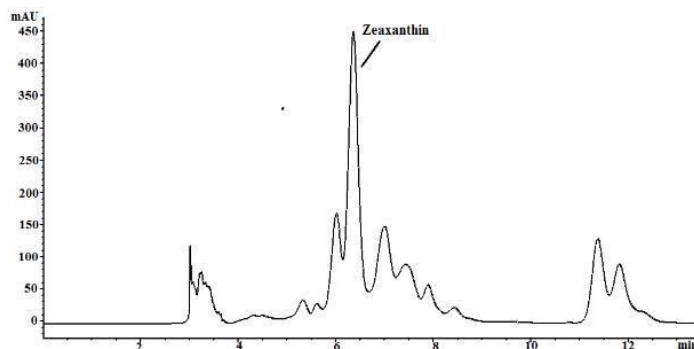
در این رابطه ϵ_0 و ϵ_r به ترتیب ثابت دی‌الکتریک نسبی و نفوذپذیری الکتریکی خلاء R شعاع ذره، ویسکوزیته سوسپانسیون و k پارامتر دبی-هاکل و مقداری ثابت می‌باشد [۱۳].

۲-۴ غنی سازی شیر با نانوحامل حاوی زیگزانتین

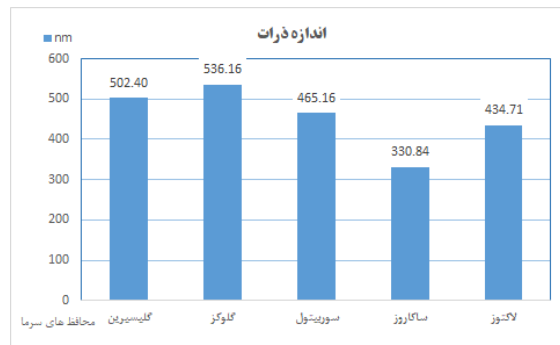
در سیستم مدل غذایی شیر به‌عنوان یک نمونه ماده غذایی برای بررسی امکان استفاده از نانوحامل تولیدشده برای غنی سازی استفاده شد. سه نمونه شیر شاهد (شیر ۳/۵ درصد چربی استریل)، شیر غنی شده با زیگزانتین (۰/۱ درصد وزنی حجمی) و شیر غنی شده با نانوحامل لیپیدی به‌صورت مستقیم (در غلظت مشابه نانوحامل) یعنی محاسبه محتوای زیگزانتین که داخل نانو حامل بوده و نانوحاملی با محتوای همون ۰/۱ درصد زیگزانتین اضافه شده است، بررسی شد.

۲-۵ ارزیابی حسی شیر غنی شده

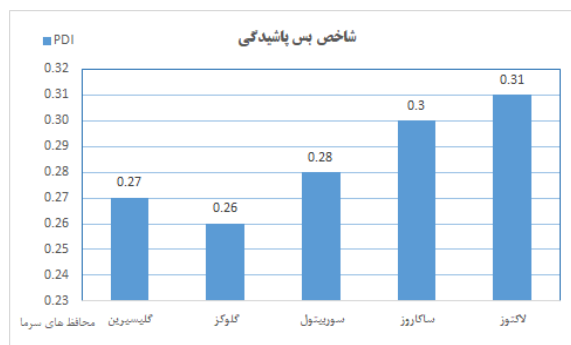
ویژگی‌های حسی شیر غنی شده توسط ۸ ارزیاب آموزش دیده بررسی شد. شیر برای ارزیابی در دمای ۵ درجه



نمودار ۱ کروماتوگرام مربوط به نمونه استخراج شده زیگزانتین در طول موج ۴۳۵ نانومتر



نمودار ۲ تاثیر استفاده از محافظ سرماهای مختلف (لاکتوز، ساکارز، سوربیتول، گلوکز و گلیسرین) بر اندازه ذرات، پس از بازیابی برای نمونه نانو حامل لیپیدی



نمودار ۳ تاثیر استفاده از محافظ سرماهای مختلف (لاکتوز، ساکارز، سوربیتول، گلوکز و گلیسرین) بر PDI، پس از بازیابی برای نمونه نانو حامل لیپیدی

است و به خارج از نانو حامل نشت نکرده است و پایدار مانده است [۱۱].

۳-۴ ارزیابی حسی شیر غنی شده

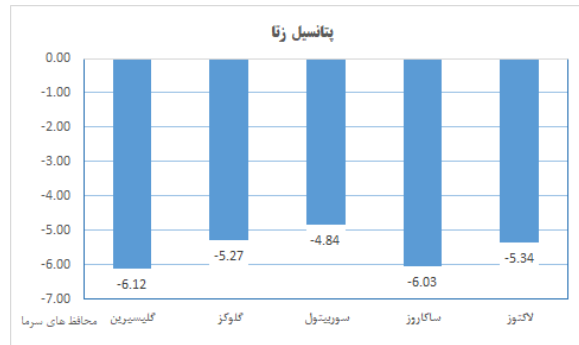
فاکتورهای ملاک ارزیابی حسی در شیر غنی شده با زیگزانتین به طور مستقیم، شیر غنی شده با نانوحامل های حاوی زیگزانتین و شیر شاهد در پارامترهای حسی مختلف، شامل حالت خامه ای، شیرینی، پس طعم، رنگ، میزان یکنواختی و پذیرش کلی مورد بررسی قرار گرفتند (نمودار- ۵).

۳-۳-۲ اندازه گیری پتانسیل زتا در نانو حامل های حاوی ترکیب محافظ سرما

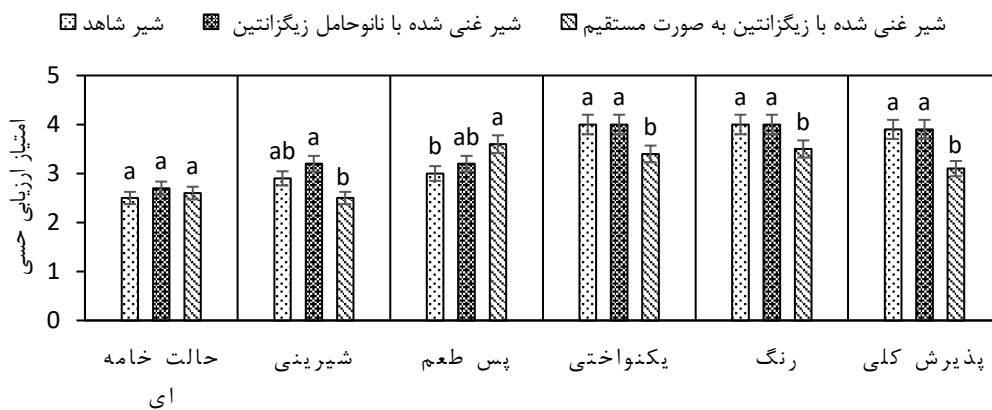
پتانسیل زتا نانوحامل های تولیدی با استفاده از دستگاه زتامتر، اندازه گیری شد (نمودار - ۴).

۳-۳-۳ پایداری نانو حامل های تولیدی

نتایج پایداری نانوحامل های تولیدی نشان دهنده این است که نانو حامل هایی که از پایداری بالایی در طول ذخیره سازی در دو دمای ۲۵ و ۴ درجه سانتی گراد، در طی ۶۰ روز برخوردار بودند، اندازه ذرات کمتر از ۱۳۰ گزارش شد و تغییرات معنی داری نداشته است. به نظر می رسد زیگزانتین در نانوحامل کاملاً محصور شده



نمودار ۴ تاثیر استفاده از محافظ سرماهای مختلف (لاکتوز، ساکاروز، سوربیتول، گلوکز و گلیسرین) بر پتانسیل زتا (بار سطحی)، پس از بازیابی نمونه نانوحامل لیپیدی



نمودار ۵ نتایج ارزیابی حسی شیر شاهد، شیر غنی شده با نانوحامل زیگزانتین با استفاده از ترکیب محافظ سرما ساکاروز و شیر غنی شده با زیگزانتین به صورت مستقیم

۱-۴ تاثیر محافظ سرما بر نانوحامل های زیگزانتین

محافظ سرما بر اندازه ذرات تاثیر کمی گذارد و از کارایی بالایی برخوردار است. معمولاً در لیوفیلیزاسیون نانوحامل ها برای کاهش یا از بین بردن تجمع آنها، با ترکیبات محافظ سرما پوشش داده می شود. پوشش دهی سطحی سبب محافظت نانوحامل ها در برابر شرایط فیزیکی می شود که یکی از ویژگی های محافظ های سرماست. کربوهیدرات ها و پلی ال ها تاثیر محافظت کنندگی در برابر انجماد برای نانوحامل ها از خود نشان

۳-۵ آنالیز آماری

برای آنالیز آماری از نرم افزار ۲۰۱۶ Mini-tab استفاده شد. برای تعیین نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری، مقایسه میانگین ها و اهمیت داده ها در سطح معنی داری کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد. نمودارها توسط نرم افزار اکسل (Microsoft Office Excel ۲۰۱۶) ترسیم شدند.

۴- بحث

داده اند [۱۶]. یکی دیگر از ویژگی‌های محافظ‌های سرما، کاهش واکنش شیمیایی و نقش محافظت کربوهیدرات‌ها از طریق جلوگیری از نشت ماده موثره و به هم چسبیدن ذرات در حین فرایند خشک کردن انجمادی است. نقش محافظ‌های سرما در جلوگیری از به هم چسبیدگی به وضعیت بلورینگی لپیدها است [۱۷]. در این پژوهش از گلوکز، سوربیتول، گلیسرین، لاکتوز و ساکارز برای ترکیبات محافظ سرما از نانوحامل‌های تولید شده استفاده شد.

قابلیت این قند‌ها، محافظت از بلورهای یخ را فراهم می‌کند که در طی لیوفیلیزاسیون و در مراحل بعدی در طی پراکندگی سبب آسب به نانوحامل‌های لپیدی می‌شود. بعد از لیوفیلیزاسیون، اکثر نانوحامل‌های لپیدی بدون پوشش با غلظت‌های مختلف ساکارز، گلوکز یا ترهالوز به‌عنوان ترکیب محافظ سرما، رفتار تقریباً متداولی را نشان می‌دهد [۸]. اگر نانوحامل‌های لپیدی بدون هیچگونه ترکیب محافظت سرما لیوفیلیزه شوند، تشکیل بلورهای یخ می‌تواند مانع از پراکندگی مجدد نانوحامل‌های لپیدی شود، و بنابراین بر اندازه آنها تأثیر می‌گذارد. به همین ترتیب، پس از انجماد به دلیل پیوند هیدروژن بین و درون مولکولی، تجمع تشکیل می‌دهند مگر اینکه از محافظت سرما استفاده شود [۱۸]. فاز انجماد از تجمع جلوگیری می‌کند و سبب جدا شدن ذرات می‌شود. یک محافظ سرما باعث کاهش ویسکوزیته شده و احتمال تعامل ذرات در هنگام انجماد را کاهش می‌دهد [۱۹]. از این رو، برای پایداری اندازه نانوحامل‌های لپیدی، باید از محافظ‌های سرما هنگام خشک شدن انجمادی استفاده شود تا رطوبت اضافی از بین برود و ذخیره طولانی مدت افزایش یابد. استفاده از سوربیتول یا گلیسرول به‌عنوان محافظت‌کننده سرما، یک روش کارآمد در هنگام خشک شدن انجماد نانوحامل‌های لپیدی برای حفظ خواص فیزیکی آنها

است [۱۸]. بهترین محافظت از نظر اندازه ساکاروز بود. مطالعات نشان داد که دی ساکاریدهایی مانند ساکارز در مقایسه با مونو ساکاریدها، محافظ سرمایه‌ی کارآمدتری هستند و بنابراین کارایی بهتری در حفظ ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانوحامل‌ها در طول لیوفیلیزاسیون نشان می‌دهند [۱۹].

۴-۱-۱- تعیین اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی

(PDI) در نانوحامل‌های حاوی ترکیب محافظ سرما

اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی نانوحامل لپیدی به همراه پوشش ترکیبات محافظ سرما در نمودار ۲ و نمودار ۳ نشان داده شده است. کمترین اندازه ذرات ۳۳۰ نانومتر است که آن نشانگر توزیع اندازه نسبتاً یکنواخت آنها بود، در صورتی‌که در نانوحامل‌های بدون استفاده از محافظ سرما اندازه ذرات کمتر از نصف بود [۲۱، ۸]. به نظر می‌رسد تأثیر معنی‌دار در اندازه نانوذرات به سبب توزیع قطرات به وسیله ترکیبی از فشار هموژنیزاسیون و تعداد دورهای هموژنیزاسیون ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه نیز می‌باشد [۱۱]. با توجه به نمودار ۱ - نانوحامل‌های همگن‌سازی و فراصوت‌سازی به دلیل ویسکوزیته بیشتر فاز پراکنده در حضور ماده زیست فعال می‌تواند دلیل دیگری برای اندازه ذرات بیشتر نانوذرات بارگذاری شده توسط زیگراتین باشد [۲۱]. استفاده از گلیسرول دی استئارات، توئین ۸۰ و لسیتین به همراه تری گلیسیریدهای متوسط زنجیره (MCT)، با کاهش ویسکوزیته سبب ایجاد اندازه مناسب و پراکندگی یکنواخت شد [۲۳، ۲۱]. MCT علاوه بر فرمولاسیون باعث کاهش کشش سطح می‌شود و به دلیل کاهش ویسکوزیته، در داخل NLC، ذرات کوچک‌تر ایجاد می‌شود [۴]. از مزایای این روش هزینه کم و قابلیت اجرا در مقیاس آزمایشگاهی می‌باشد [۲۴]. با توجه

به نمودار ۳- میزان PDI نزدیک به صفر نشان دهنده اندازه ذرات هوموژن و بزرگتر از ۰/۵ نشان دهنده ذرات با توزیع اندازه غیریکنواخت است. میزان PDI نانوحامل های بدون پوشش و با پوشش محافظ سرما هیچ تغییر محسوسی نداشتند [۲۰]، این ترکیب منجر به تولید یک پودر نرم و یک محلول با کوچکترین اندازه و کمترین PDI پس از بازیابی شد. نتایج تجزیه و تحلیل اندازه گیری ذرات با توزیع اندازه پیش بینی شده را نشان می دهد که در شرایط صحیح می توانند بسیار قابل تولید باشند. با این حال، نانوحامل ها ناپایدار هستند و ذرات پس از ذخیره سازی طولانی مدت بدون لیوفیلیزاسیون با محافظ های انجماد تجمع می یابند. بنابراین، لیوفیلیزاسیون راهی مؤثر برای ادامه حفظ اندازه ذرات برای مدت های طولانی، جلوگیری از تجمع قابل توجه، تخریب نانوحامل های لیپیدی و نشسته محتویات ناشی از نانوحامل های بارگیری شده از ماده محافظ سرما در حین لیوفیلیزاسیون محسوب می شود [۸].

۴-۱-۲- اندازه گیری پتانسیل زتا در نانوحامل های حاوی ترکیب محافظ سرما

پتانسیل زتا نانوحامل های پوشیده شده با ترکیبات محافظ سرما در نمودار ۴- نشان داده شده است. پتانسیل زتا، شاخصی از بار الکتریکی سطح نانوذرات می باشد، در واقع نشان دهنده بار سطحی یکسان و دافعه بین ذرات و میزان پایداری ذره است. هر چه این میزان به صفر نزدیکتر باشد نامطلوب تر می باشد. پتانسیل بالای زتا پایداری بهتر پراکندگی را نشان می دهد. بهترین پتانسیل زتا، در ترکیب ساکاروز است. بار سطحی ایجاد شده به دلیل استفاده از لسیتین و MCT (تری گلیسیریدهای متوسط زنجیر) می باشد. البته تئوئین ۸۰ نیز در ایجاد بار سطحی در مقیاس کم نیز می تواند دخیل باشد [۴].

۴-۲- ارزیابی حسی شیر غنی شده

برای بررسی کارایی نانوحامل های تولید شده برای غنی سازی مواد غذایی، نانوحامل لیپیدی خشک شده به روش انجمادی، با استفاده از ترکیب محافظ سرمای ساکارز، به شیر به عنوان یک سیستم غذایی نمونه برای بررسی توانایی نانوذرات توسعه یافته برای تقویت مواد غذایی است. نتایج ارزیابی حسی سه نمونه شاهد، شیر غنی شده با نانوحامل های زیگزانتین و شیر غنی شده با زیگزانتین به صورت مستقیم، در نمودار ۵-، نمایش داده شد. در مطالعه فتحی و همکاران (۲۰۱۳)، کاهش یکنواختی ماده زیست فعال به دلیل حلالیت پایین آن در محیط آبی می باشد. آنها با استفاده از شیر غنی شده با نانوحامل حاوی ماده زیست فعال به نتایج قابل قبولی دست یافتند. در پژوهش حاضر نیز نتایج حسی غنی سازی مستقیم شیر با زیگزانتین سبب کاهش معنی دار رنگ، شیرینی، میزان یکنواختی و پذیرش کلی ($P < 0/05$) شیر شد. کاهش معنی دار این میزان به دلیل حلالیت پایین زیگزانتین در محیط آبی می باشد [۹]. نتایج این پژوهش ها نشان داد که امکان غنی سازی مستقیم ماده غذایی با زیگزانتین وجود ندارد و استفاده از نانوکپسولاسیون می تواند سبب رفع معایب شود. چرا که نتایج قابل قبولی با استفاده از شیر غنی شده با نانوحامل زیگزانتین به دست آمد. یافته ها نشان داد تفاوت معنی داری بین ویژگی های حسی شیر شاهد با شیر غنی شده با نانوحامل ها ($P < 0/05$) وجود ندارد. در پژوهش نوری و همکاران (۲۰۱۷)، پارامترهای مورد ارزیابی در هر سه گروه شامل طعم و مزه، بافت و قوام، و خصوصیات ظاهری و پذیرش کلی بررسی شد [۲۵]. در پژوهش حاضر نیز پارامترهای مورد ارزیابی حسی در حالت خامه ای، شیرینی، پس طعم، رنگ، میزان یکنواختی و پذیرش کلی در هر سه گروه شیر غنی شده با زیگزانتین به طور مستقیم، شیر غنی شده با نانوحامل های حاوی زیگزانتین و شیر شاهد تفاوت معنی داری مشاهده نشد. از مزایای سیستم نانو

[1]Mehnert, W. and Mäder, K. (2012) Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 83–101.

[2]Yu, B, *et al.* (2012) Spirulina is an effective dietary source of zeaxanthin to humans. *Br. J. Nutr.*, vol. 108, no. 4, pp. 611–619, doi: 10.1017/S0007114511005885.

[3]Sajilata, M. G., R. S. and Singhal, Kamat, M. Y. (2008) Pigment Zeaxanthin — A Review Sajilata. M. G., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2008). Pigment Zeaxanthin — A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*. 7, 29–49.” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 7, pp. 29–49.

[4] Akhoond A, Mohebbat Z, Reza M, Shadi F. (2018) Production and characterization of nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles containing lycopene for food fortification. *J Food Sci Technol*. 55:287–298, doi.org/10.1007/s13197-017-2937-5.

[5]Amjadi, F., Shahedi, T. M., Varshosaz, J. and Nasirpour, A. (2013) Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 19, pp. 29–43, 2013, doi: 10.1016/j.ifset.03.002.

[6]Taghavi, S. M., Momenpour, M., Azarian, M., Ahmadian, M., Souri, F., Taghavi, S. A., ... & Karchani, M. (2013). Effects of nanoparticles on the environment and outdoor workplaces. *Electronic physician*, 5(4), 706, doi: 10.14661/2013.706-712.

[7]Almalik A, Alradwan I, Abul M, Alshamsan A. (2017) Effect of cryoprotection on particle size stability and preservation of chitosan nanoparticles with and without hyaluronate or alginate coating. *Saudi Pharm J*. 25:861–867. doi.org/10.1016/j.jsps.2016.12.008.

[8]Kiani, A., Fathi, M. and Ghasemi, S. M. (2016) Production of novel vitamin D 3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. *Int. J. Food Prop.*, vol. 20, no. 11, pp. 2466–2476, 2017, doi: 10.1080/10942912.1240690.

[9]Fathi, M. Varshosaz, J. Mohebbi, M. and Shahidi, F. (2013) Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 6, pp. 1464–1475, doi: 10.1007/s11947-012-0845-2.

[10]Chen, F. Li, H. Wong, R. N. B. Ji, and Jiang Y. (2005) Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high-speed counter-current chromatography. vol. 1064, pp. 183–186, 2005, doi: 10.1016/j.chroma.12.065.

[11]Osanlou, R., Emtiazjoo, M., Banaei, A., and M, Ali. (2022) “Production of zeaxanthin lipid nanocarriers and evaluation of their physicochemical properties,” pp. 1–25,

انکپسولاسیون، تولید سوپانسیون حاوی نانوحامل‌های شفاف (به دلیل اندازه کوچکتر)، پوشش طعم‌های نامطلوب و همچنین افزایش حلالیت نانوحامل تولیدی است؛ چرا که ترکیبات زیست فعال و آب‌گریز با کازئین‌های شیر می‌توانند پیوند برقرارکنند. نیروهای هیدروفوبیک میان میسل‌های کازئینی، مسئول توانایی در باند کردن ترکیبات آبگریز کوچک است. بخش‌های کوچکی از چربی و فسفولیپیدها که متصل به ترکیبات آبگریز هستند، در میان میسل‌های کازئینی وجود دارند. شناخت ساختار میسل‌های کازئینی و توانایی آنها در باند شدن با ترکیبات دیگر، نمایانگر احتمال قوی متصل شدن ماده زیست فعال به میسل‌های کازئینی است [۱۸].

۵- نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیب‌های محافظ سرما بر نانوحامل منتخب NLC نشان داد که ساکاروز بهترین ترکیب محافظ سرما است. زیرا نسبت به سایر ترکیب‌ها، اندازه نانوحامل کوچکتر بود. شاخص بس پاشیدگی همه محافظ‌های سرما به صفر نزدیک بود. اندازه ذرات هوموژن و یکنواخت بود و پتانسیل زتای خوبی داشت. کارایی نانوحامل تولیدی منتخب در غنی‌سازی شیر، مورد ارزیابی حسی قرار گرفت و پارامترهای حسی مختلف بررسی شد. یافته‌ها تفاوت معنی‌داری بین ویژگی‌های حسی شیر شاهد با شیر غنی شده با نانوحامل‌ها ($P < 0/05$) نشان نداد. بنابراین، می‌توان از نانوحامل‌های حاوی زیگزانتین برای غنی‌سازی شیر مورد استفاده قرار داد تا کمبود مواد مغذی برای افراد جامعه به‌ویژه سالمندان رفع شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت‌های معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام شده است. بدینوسیله از زحمات تمامی همکارانی یاریگر در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

۶- منابع

- containing solid lipid nanoparticles encapsulating amphotericin b: Ion paired complexes with distearoyl phosphatidylglycerol. Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR, 19(3), 45, doi.org/10.3109/03639045.2013.841187.
- [20]Campos, E. V. R. *et al.* (2015) Polymeric and Solid Lipid Nanoparticles for Sustained Release of Carbendazim and Tebuconazole in Agricultural Applications. *Sci. Rep.*, vol. 5, no. August, pp. 1–14, doi: 10.1038/srep13809.
- [21]Sadati Behbahani, E., Ghaedi, M. Abbaspour, M. Rostamzadeh, K. and Dashtian, K. (2019) Curcumin loaded nanostructured lipid carriers: In vitro digestion and release studies. *Polyhedron*, vol. 164, pp. 113–122, doi: 10.1016/j.poly.2019.02.002.
- [22]Kumar S. and J. Randhawa K. (2013) High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 4, pp. 1842–1852, doi: 10.1016/j.msec.2013.01.037.
- [23]Tamjidi, F. Shahedi, M. Varshosaz, J. and Nasirpour, A. (2014) Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 26, pp. 366–374, 2014, doi: 10.1016/j.ifset.06.012.
- [24]Jinno, J. I. *et al.* (2005) Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J. Control. Release*, vol. 111, no. 1–2, pp. 56–64, 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.11.013.
- [25] Noori, N., Noudoost, B., Gandomi Nasrabadi, H., & Akhondzadeh Basti, A. (2017). Effects of green tea extract nanoencapsulation on the survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* in symbiotic ice cream. *Journal of Veterinary Research*, 72(2). doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128588
- [12]Siaterlis, A. Deepika, G. and Charalampopoulos, D. (2009) Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying. *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 295–301, doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02529.x.
- [13]Apiratikul, N. Penglong, T. Suksen, K. Suksen, Svasti, S. A. (2013) Chairoungdua, and B. Yingyongnarongkul, “In vitro Delivery of Curcumin with Cholesterol-Based Cationic Liposomes. *Биоорганическая Химия*, vol. 39, no. 4, pp. 497–503, doi: 10.7868/s0132342313030032.
- [14]Frøst, M. B., Dijksterhuis, G., & Martens, M. (2001). Sensory perception of fat in milk. *Food Quality and Preference*, 12(5-7), 327-336.
- [15]De Campo, C., Assis, R. Q., da Silva, M. M., Costa, T. M. H., Paese, K., Guterres, S. S., ... & Flôres, S. H. (2019). Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. *Food chemistry*, 301, 125230.
- [16]Crowe J. H. *et al.* (1988) Interactions of sugars with membranes. *BBA - Rev. Biomembr.*, vol. 947, no. 2, pp. 367–384, doi: 10.1016/0304-4157(88)90015-9.
- [17]Freitas, C. and Mu ,R. H. (2013) Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN TM). vol. 46, pp. 145–151, 1998.
- [18]Haratifar, S. and Corredig M. (2014) Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chem.*, vol. 143, pp. 27–32, doi: 10.1016/j.foodchem.07.092.
- [19] Yeganeh, E. M., Bagheri, H., & Mahjub, R. (2020). Preparation, statistical optimization and in-vitro characterization of a dry powder inhaler (Dpi)

Lipid Nanoencapsulation of zeaxanthin and evaluation of its cryoprotectants in milk food model

Roya Osanlou¹, Mozhgan Emtiazjoo^{2*}, Aghdas Banaei³, Mohammad Ali Hesarinejad⁴, Fatemeh Ashrafi⁵

1. Department of Biology, Faculty of Biosciences, Islamic Azad University, North Branch, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

3. Department of Biology, Research Institute of Applied Science, Academic Center of Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

4. Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

5. Department of Biology, Faculty of Biosciences Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

M_emtiazjoo@iau-tnb.ac.ir, Moz_emtiazjoo@yahoo.com

Receipt: 2021/12/29

Accepted: 2022/09/26

Abstract

Enriching human food using new technology such as lipid nanocarriers is a simple and accessible tool. Accordingly, the present study aimed to evaluate the sensory and production of healthy and useful food products to evaluate the enrichment of milk with zeaxanthin lipid nanocapsules and to evaluate its cryoprotectants. During experimental-laboratory research, zeaxanthin extraction from *Spirulina platensis*, nanocarriers produced for milk enrichment were used as a food model system. Three samples of milk, milk enriched with lipid nanocarriers containing zeaxanthin and milk enriched with lipid nanocarriers were examined (at similar concentrations of nanocarriers). In order to check the efficiency of produced nanocarriers, cold protective compounds (glucose, sorbitol, glycerin, lactose and sucrose) were added to milk. Sucrose was recognized as the best cryoprotectants. Sensory evaluation of enriched milk was performed on a five-degree hedonic scale and different sensory parameters were examined. Data were analyzed using Minitab (v. 2016). Results No significant difference was observed between the sensory characteristics of control milk and milk enriched with nanocarriers ($P < 0.05$). The lowest particle size and dispersion index were obtained in the coating of nanocarriers with cold protective compounds, respectively, 320.82 and 0.26 to 0.31. Zeta potential was reported as -6.03. By enriching milk with zeaxanthin-containing nanocarriers, in addition to visual and skin health, problems related to the lack of useful natural additives and insolubility of food products can be eliminated.

Keywords: Enrichment; Lipid nanocarrier; Zeaxanthin; Cryoprotectants; Sensory evaluation