مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 2، تابستان 1395، صفحات 84-75

نانو ریزپوشانی روغن دانه انار با روش تعلیق مایع در مایع و رهایش روغن در محیط شبیه‌سازی شده معده

حمید توکلی پور[1]، محسن مختاریان[2]

1- نویسنده مسئول: گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران. پست الکترونیکی: h.tavakolipour@gmail.com
2- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: 94/3/19 تاریخ پذیرش: 94/7/8

چکیده

سابقه و هدف: روغن دانه انار حاوی مقادیر قابل توجهی از استرول‌های سودمند از جمله بتاسیتوسترول، استیگماسترول و کمپسترول و نیز توکوفرول‌های آلفا، بتا و گاما است. این پژوهش با هدف درون‌پوشانیِ روغن هسته انار در درون نانوذرات پروتئین زئین ذرت، بررسی پایداری ترکیبات زیست فعال درون‌پوشانی شده در سامانه‌های غذایی مدل (نوشیدنی شفاف اسیدی) و گذر از شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و رهایش کنترل شده آنها در روده، اندازه‌گیری اندازه ذرات و ویژگی‌های ریخت‌شناختی ذرات انجام شد.

مواد و روش‌ها: زئین به روش شیمیایی در حضور کاتالیست قلیایی هیدروکسید سدیم درهم‌تنیده شد. سپس آب به عنوان ضد حلال برای ترسیب زئین و تولید ذرات زئین بدون هسته و ذرات بارگیری شده با روغن هسته‌ی انار استفاده گردید. محیط شبیه‌سازی شده معده توسط آنزیم پپسین در حضور اسید کلریدریک انجام و برای تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: متوسط اندازه ذرات تولید شده از زئین درهم تنیده شده و درهم تنیده نشده به ترتیب 350 و 246 نانومتر بود. راندمان درون‌پوشانی (روغن درون‌پوشانی در کپسول‌ها) در اثر ایجاد اتصالات عرضی از 87 درصد به 95 درصد افزایش یافت. مشاهده با میکروسکوپ الکترونی ثابت کرد که ذرات کروی شکل هستند. با بکارگیری طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه، تشکیل اتصال شیمیایی بین اسید سیتریک و زئین تأیید شد. همچنین مشخص شد که روغن صرفاً به طور فیزیکی در درون زئین محصور شده است.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که اسید سیتریک در حضور کاتالیزور هیدروکسید سدیم توانسته است به طور موفقیت‌آمیزی برای تولید مولکول‌های زئین درهم‌تنیده شده مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نانو ذرات زئین، اسید سیتریک، اتصال عرضی، ترسیب، روغن هسته انار

• مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* از خانواده پونیکاسه بومی مناطق نیمه گرمسیری ایران می‌باشد. استان‌های فارس، خراسان، یزد، اصفهان، مرکزی و تهران مهم‌ترین استان‌های انارخیز کشور هستند. دانه‌های انار معمولاً به صورت کاملاً تازه مصرف می‌شوند. اگرچه اخیراً به عنوان یکی از اجزای مربا، نوشیدنی‌های الکلی و غیرالکلی نیز استفاده می‌شود. یکی از کاربردهای جدید این میوه، استفاده صنعتی از روغن هسته انار است. روغن هسته انار بین 12 تا 20 درصد وزن دانه‌ها را تشکیل می‌دهد (1) و ماده‌ای با ارزش اقتصادی بالا است. روغن هسته انار حاوی اسیدهای پونیسیک (75/11 درصد)، اولئیک (8/48 درصد)، پالمتیک (3/89 درصد) و استئاریک (2/81 درصد) است. روغن انار غنی‌ترین منبع گیاهی شناخته شده از استروژن استروئیدی به نام استران می‌باشد. روغن انار حاوی مقادیر قابل توجهی از استرول‌ها از جمله بتاسیتوسترول، استیگماسترول و کمپسترول و نیز توکوفرول‌های آلفا، بتا و گاما است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی (از جمله ویتامین C، ویتامین E، بتاکاروتن، کاتشین‌ها و آنتوسیانین‌ها و غیره) هستند (2).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

اثرات سلامت‌بخش روغن هسته انار، به ترکیباتی به نام ترکیبات زیست فعال نسبت داده می‌شود. ترکیبات زیست فعال، ترکیباتی هستند که مصرف آنها موجب کاهش خطر ابتلا به انواع بیماری‌ها و باعث افزایش طول عمر مصرف‌کننده می‌شود. یکی از راه‌های تولید غذاهای سلامت افزا، غنی‌سازی محصولات غذایی با ترکیبات زیست فعال است. غنی‌سازی محصولات غذایی با ترکیبات زیست فعال، موجب اثرات نامطلوب در طعم و بافت محصولات غذایی می‌گردد. از طرفی دیگر، این ترکیبات ناپایدار بوده و تحت تأثیر شرایط مختلف فرآوری (دمای بالا، نور و اکسیژن) و pH اسیدی معده انسان، تجزیه می‌شوند. درون‌پوشانی راهی برای غلبه بر این دسته ناپایداری‌های ترکیبات زیست فعال است و امکان رهایش کنترل شده آنها را در روده کوچک فراهم می‌سازد. مسئله این پژوهش، افزایش پایداری ترکیبات زیست فعال روغن هسته انار (به عنوان مدلی از ترکیبات زیست فعال آبگریز) با استفاده از نانودرون‌پوشانی است. زئین به طور معمول به عنوان یک پلیمر زیستی ایمن و به عنوان یک ترکیب زیست‌تخریب‌پذیر (Biodegradability) و زیست سازگار (Biocompatibility) شناخته شده است. زئین به خانواده پرولامین تعلق دارد که حاوی اسیدهای آمینه هیدروفوبیک نظیر پرولین، لوسین و آلانین می‌باشد (3).

رضوی زاده و همکاران (1393) ویژگی‌های ریزکپسول‌های روغن سبوس برنج تهیه شده با خشک‌کن پاششی و خشک‌کن انجمادی را مورد مطالعه قرار دادند. ریزپوشانی روغن سبوس برنج با استفاده از صمغ عربی و کنسانتره پروتئینی آب پنیر به عنوان مواد دیواره به دو روش خشک کردن پاششی و انجمادی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور امولسیون آب در روغن حاوی 4 درصد روغن سبوس برنج در محلول آبی حاوی 20 و 25 درصد ترکیب کل مواد دیواره به کمک اولتراتوراکس تهیه شد. کمترین اندازه قطرات (0/36 میکرومتر) در امولسیون با ترکیب دیواره حاوی 100 درصد صمغ عربی و بیشترین اندازه قطرات (0/96 میکرومتر) برای امولسیون با ترکیب دیواره حاوی 100 درصد کنسانتره پروتئینی آب پنیر به دست آمد و در نسبت‌های متفاوت از این دو ماده تشکیل دهنده دیواره، اندازه قطرات مقادیری بین این دو عدد داشتند. اندازه قطرات و گرانروی امولسیون‌های تهیه شده حاکی از آن بود که پایداری امولسیون‌های تهیه شده تحت تأثیر غلظت و نوع مواد دیواره هستند. همچنین نوع روش خشک کردن امولسیون نه تنها بر اندازه میکروکپسول‌های تهیه شده، بلکه بر راندمان ریز پوشانی و میزان بازداری روغن درون کپسول نیز مؤثر بودند. نتایج نشان داد که بیشترین راندمان ریزپوشانی در غلظت 60 درصد صمغ عربی در ترکیب دیواره (مجموع صمغ و کنسانتره پروتئینی آب پنیر) حاصل شد که عبارت بود از 90 درصد به روش خشک‌کن پاششی و 68 درصد به روش خشک‌کن انجمادی. از میان دو روش خشک کردن، ریزکپسول‌های تهیه شده با خشک کردن پاششی ضمن حفظ ساختار منظم کروی، میزان بازداری بیشتری از روغن را در طول دوره نگهداری نشان دادند (4).

علوی طلب تولید (1391) میکروکپسول‌های امگا-3 با روش کوآسرواسیون را مطالعه نمود. سه اسید چرب امگا-3 شامل آلفا لینولنیک اسید، ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید در جلوگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی نقش مهمی داشته به طوری که افزودن میکروکپسول‌های امگا-3 به شیر و آب‌میوه به منظور غنی‌سازی، ضمن آنکه سبب افزایش مدت ماندگاری امگا-3 می‌شود، پایداری آن را نیز در برابر اکسیژن افزایش می‌دهد. بدین منظور در این مطالعه میکروکپسولاسیون امگا-3 روغن کپور نقره‌ای به روش توده‌ای شدن ترکیبی با ژلاتین و صمغ عربی انجام گرفت. نتایج نشان داد که شرایط بهینه به منظور تهیه میکروکپسول‌های امگا-3، دور همزن rpm 1000 و غلظت 0/1 مولار نمک می‌باشد (5).

فرضیه پژوهش حاضر بر این مبنا استوار است که با استفاده از درون‌پوشانی روغن هسته انار سرشار از ترکیبات سلامتی بخش با تکنیک رسوب با ضد حلال در درون پروتئین‌های زئین، یک نوشیدنی شفاف غنی شده از این ترکیبات فراسودمند پایدار و مؤثر، تهیه شده به نحوی که این ترکیبات به صورت هدفمند در روده رهاسازی شوند. به عبارت دیگر هدف این پژوهش، دستیابی به روشی برای درون‌پوشانیِ روغن هسته انار در درون نانوذرات پروتئین زئین ذرت، بررسی پایداری ترکیبات زیست فعال درون‌پوشانی شده در سامانه‌های غذایی مدل (نوشیدنی شفاف اسیدی) و گذر از شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و رهایش کنترل شده آنها در روده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

• مواد و روش‌ها

مواد: در این پژوهش از مواد، لوازم آزمایشگاهی و دستگاه‌های مختلف استفاده شد که شامل: پروتئین زئین (ساخت شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا)، اسید سیتریک (شرکت BBCA چین)، میکروتیوب (شرکت Chiamei چین)، هیدروکسید سدیم (شرکت BBCA چین)، اتانول (شرکت Acros Organics)، روغن هسته انار (شرکت مهروندا)، pHمتر دیجیتالی (مدل MP230 ساخت آمریکا) و سانتریفوژ (ساخت شرکت Coulter Brookhaven آمریکا).

مراحل تهیه نانوذرات و نانوکپسول: نانوکپسول‌های پروتئین زئین با روش رسوب با ضد حلال تولید شدند (6). ابتدا محلول اتانول 70 درصد حاوی 8 درصد اسید سیتریک تهیه شد. سپس با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم تهیه شده با اتانول، pH محلول بر روی 4/9 تنظیم گردید. محلول پروتئین زئین با غلظت 50% (وزنی/ وزنی) با حل کردن پودر پروتئین زئین در اتانول 70 درصد حاوی 8 درصد اسید سیتریک تهیه شد. به منظور انحلال کامل پودر پروتئین زئین، محلول تهیه شده به مدت 2 ساعت با سرعت 500 دور بر دقیقه در دمای اتاق گرمخانه‌گذاری شد. سپس محلول پروتئین زئین به مدت 48 ساعت در دمای محیط به صورت دربسته نگهداری شد تا زئین درهم‌تنیده (Cross-linked) شود. در مرحله بعد، محلول اسید سیتریک حاوی زئین درهم تنیده شده از غلظت 50% زئین به 1% با افزودن اتانول 70% رقیق شد. محلول اسید سیتریک حاوی زئین درهم‌تنیده شده با غلظت 1% به دو بخش تقسیم شد و برای تهیه نانوذرات درهم‌تنیده شده، به یک بخش مستقیماً ضد حلال (آب دیونیزه) افزوده شد و برای تهیه نانوکپسول، به قسمت دیگر، ابتدا روغن هسته انار به عنوان یک مدل از ترکیبات زیست فعال آبگریز با نسبت جرمی 20:1 به محلول پروتئین زئین افزوده شد و سپس ضد حلال (آب دیونیزه) اضافه گردید. سپس سوسپانسیون نانوذرات و نانوکپسول حاصله با سرعت g 18000 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. پس از اتمام مرحله سانتریفوژ، مایع شفاف روماند برای اندازه‌گیری راندمان درون‌پوشانی مورد استفاده قرار گرفت و رسوب (Pellets) حاصل در فریزر تحت دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس با استفاده از خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل و برای آزمون‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در تهیه نانوذرات و نانوکپسول از پروتئین زئین درهم‌تنیده نشده (Non-cross-linked)، تمام مراحل شبیه به روش تهیه نانوذرات و نانوکپسول از پروتئین زئین درهم‌تنیده شده بود با این تفاوت که حلال مورد استفاده صرفاً اتانول 70 درصد بود و از اسید سیتریک استفاده نمی‌شود.

تعیین اندازه ذرات: اندازه و توزیع ذرات و کپسول‌ها به‌وسیله دستگاه DLS (Zeta PALS, Brookhaven Instruments Co., NY model) اندازه‌گیری شد. بدین منظور پودر خشک نانوذرات و نانوکپسول‌ها در 10 میلی‌لیتر اتانول 70% با نسبت 200:1 (وزنی/حجمی) حل شد. اندازه ذرات در دمای 25 درجه سانتی‌گراد با زاویه پراکنش 90 درجه و در 657 نانومتر اندازه‌گیری شد. هر نمونه سه مرتبه تکرار گردید و هر تکرار به منظور تعیین بازده و میانگین اندازهٔ ذرات شش مرتبه اندازه‌گیری گردید.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): شکل، مرفولوژی، یکپارچگی در پوشش و توپوگرافی سطحی نانوذرات و کپسول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (KYKY-EM3200, KYKY Technology Development, Ltd., Beijing China) مشاهده شد. بدین منظور سطح ذرات توسط طلا روکش داده شد، سپس مورفولوژی مشاهده گردید.

بازده تولید ذره و راندمان درون‌پوشانی: وزن حبه‌های خشک ذرات و کپسول‌ها برای محاسبه بازده تولید ذره استفاده شد:

$$Y_P\ (\%) = \frac{W_{dp}}{W_t} \times 100 \qquad (1)$$

در این معادله، Yp بازده تولید ذرات (درصد)، W_{dp} وزن حبه‌های خشک ذرات (گرم) و W_t وزن کل روغن و زئین بکار رفته برای تهیه ذرات می‌باشند.

راندمان درون‌پوشانی به عنوان مقدار روغن درون‌پوشانی شده در کپسول‌ها تعریف می‌شود و به صورت زیر محاسبه شد:

$$Y_e(\%) = \frac{O_t - O_f}{O_t} \times 100 \qquad (2)$$

در این معادله، Y_e راندمان درون‌پوشانی (درصد)، O_t مقدار روغن کل (گرم) و O_f مقدار روغن آزاد می‌باشند.

مقدار روغن درون‌پوشانی شده در نانوذرات به‌وسیله‌ی محاسبه اختلاف بین مقدار کل روغن اولیه و مقدار روغن درون‌پوشانی نشده باقی‌مانده در مایع شفاف روماند اندازه‌گیری گردید. پس از سانتریفوژ کردن (18000xg) سوسپانسیون

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

ذرات، مایع شفاف روماند جمع‌آوری شده و به آون با دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 6 ساعت منتقل می‌شود تا اتانول به‌طور کامل تبخیر شود. مقدار روغن هسته انار آزاد با محاسبه اختلاف مقدار بین وزن اولیه و ثانویه ظرف حاوی مایع شفاف روماند اندازه‌گیری شد.

طیف‌سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه: در روش FTIR از تابش فروسرخ برای تعیین ویژگی‌های شیمیایی هر نمونه استفاده می‌شود. وقتی پرتو فرو سرخ به یک نمونه برخورد می‌کند هر یک از حالات پیوندهای شیمیایی (انبساط، انقباض و خمش) موجب جذب نور فرو سرخ در یک طول موج معین می‌شود. نمودار نهایی، مقادیر جذب (مقدار عبور) را به ازای طول موج نشان می‌دهد (7). از روی طیف FTIR می‌توان انواع پیوندهای شیمیایی، فیزیکی و برهمکنش‌های بین ترکیبات روغن هسته انار و پروتئین‌های زئین را پس از درون‌پوشانی پلی‌فنول‌ها در پروتئین زئین بررسی و شناسایی کرد. FTIR به وسیله روش دیسک برمید پتاسیم (KBr disk method) در محدودهٔ طول موج 500 تا 1/cm 4500 انجام شد (8). برای این آزمون حدود 2 میلی‌گرم نمونه نانوذرات در یک هاون از جنس عقیق به صورت یک پودر کاملاً نرم درآمده و سپس حدود 10 میلی‌گرم پودر برمید پتاسیم به آن افزوده شد. این مخلوط کاملاً همگن شده و به کمک یک قالب مخصوص و با فشار حدود 10 تن به شکل یک قرص بسیار نازک شفاف درآورده شد. این قرص در محفظه دستگاه (Perkin Elmer 2000 FT-IR, Perkin Elmer Co., Waltham, Massachusetts, USA) قرار داده شده و طیف فرو سرخ مربوط به آن نمونه تهیه و قرائت گردید.

رهایش روغن از کپسول‌ها در محیط آزمایشگاهی: رهایش روغن در محیط آزمایشگاهی در محیط شبیه‌سازی شده با معده در حضور آنزیم پپسین مطابق با روش Chen و همکاران (2005) انجام شد (9). یک گرم از نانوکپسول‌های زئین بارگیری شده با روغن در یک لوله آزمایشگاهی در 1/5 میلی‌لیتر اسید هیدروکلریدریک 0/1 نرمال حل شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه در سرعت تکانش 100 دور بر دقیقه انکوبه شد. سپس 0/2 میلی‌لیتر محلول پپسین با غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اسید هیدروکلریدریک 0/1 نرمال برای شروع هیدرولیز به آن افزوده شد. هضم به مدت 30 دقیقه انجام گردید و سپس نمونه هضم شده با سرعت 18000g سانتریفوژ گردید و مایع شفاف رویی به دست آمد. مقدار روغن رهایش یافته به عنوان درصدی از کل روغن درون‌پوشانی شده به دست آمده از راندمان درون‌پوشانی گزارش می‌گردد.

آنالیز آماری: جهت مقایسه میانگین تیمارها در آزمایشات از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و در صورت معنی‌داری از آزمون دانکن در سطح $p<0/05$ استفاده گردید. کلیه آزمایشات در چهار تیمار و سه تکرار انجام گرفت و توسط نرم‌افزار آماری MSTATC (نسخه 16) تجزیه و تحلیل صورت گرفت.

• یافته‌ها

اندازه نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین تهیه شده با و بدون تیمار با اسید سیتریک که در اتانول با pH خنثی پراکنده شده بودند، به کمک دستگاه تشخیص دهنده پراش نوری اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول 1 ارائه شده است.

جدول 1. قطر نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین

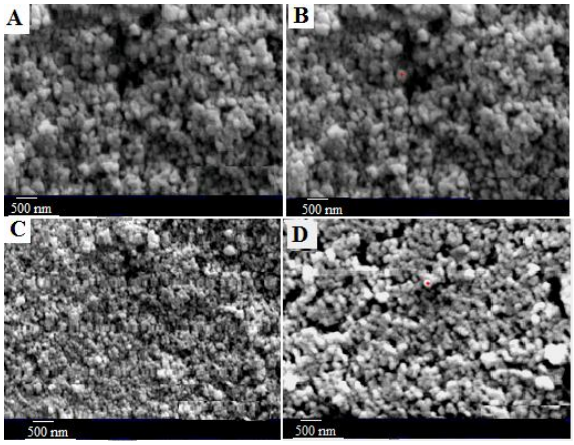
تیمار	چندانداز‌گی (Polydispersity)*	دامنه‌ی تغییرات اندازه‌ی ذرات (نانومتر)	قطر نانوذرات (نانومتر) *
نانوذرات زئین درهم‌تنیده نشده	0/402 ± 0/037 a**	294-365	350 ± 14/4 b
نانوکپسول زئین درهم‌تنیده نشده	0/359 ± 0/013 b	394-541	442/6 ± 25/7 a
نانوذرات زئین درهم‌تنیده شده	0/331 ± 0/017 c	223-256	246 ± 6/0 d
نانوکپسول زئین درهم‌تنیده شده	0/308 ± 0/008 d	233-312	298 ± 11/5 c

*مقادیر به صورت میانگین انحراف معیار گزارش شده است

**حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها در هر ستون می‌باشد ($p<0/05$)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

اندازه و خصوصیات ریخت‌شناسی نانوذرات و نانوکپسول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مورد تأیید قرار گرفت (شکل 1). همان‌طور که مشاهده می‌گردد نانوذرات و نانوکپسول‌های درهم‌تنیده شده با اسید سیتریک در مقایسه با نمونه‌های شاهد اندازه کوچک‌تری دارند. جدول 2 بازده تولید ذره و راندمان درون‌پوشانی برای نمونه‌های مختلف تهیه شده با زئین درهم تنیده شده و زئین درهم تنیده نشده را نشان می‌دهد. بازده تولید ذره برای انواع نانوذرات و نانوکپسول‌ها بیشتر از 75 درصد است. راندمان درون‌پوشانی برای کپسول‌های درهم تنیده نشده و درهم تنیده شده به ترتیب 87 و 95 درصد است.



شکل 1. نانوذرات زئین درهم‌تنیده نشده (A)، نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده نشده (B)، نانوذرات زئین درهم‌تنیده شده (C)، نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده شده (D)

جدول 2. تعیین بازده تولید ذره و راندمان درون‌پوشانی

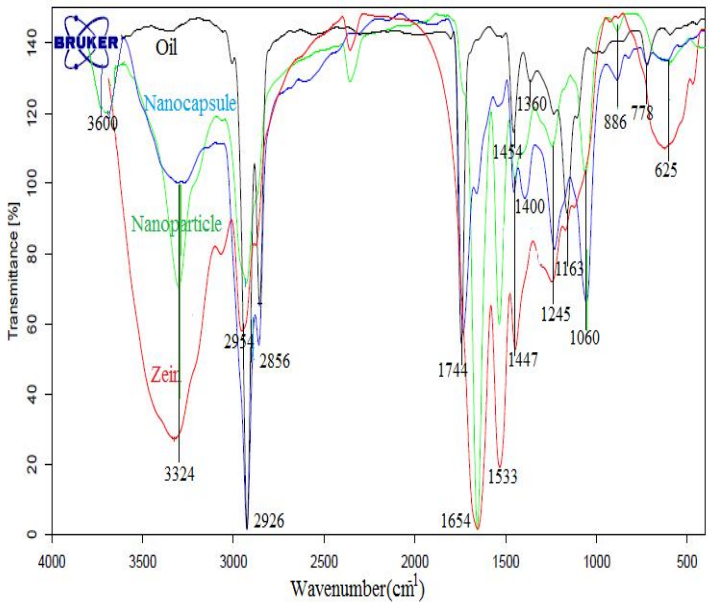
تیمار	راندمان درون‌پوشانی* (%)	بازده تولید ذره* (%)
نانوذرات زئین درهم‌تنیده نشده	-	77/2 ± 1/2 [d]
نانوکپسول زئین درهم‌تنیده نشده	87/2 ± 2/4 [b**]	81/4 ± 1/6 [c]
نانوذرات زئین درهم‌تنیده شده	-	85/4 ± 2/5 [b]
نانوکپسول زئین درهم‌تنیده شده	95/2 ± 1/6 [a]	92/4 ± 1/8 [a]

*مقادیر به صورت میانگین انحراف معیار گزارش شده است

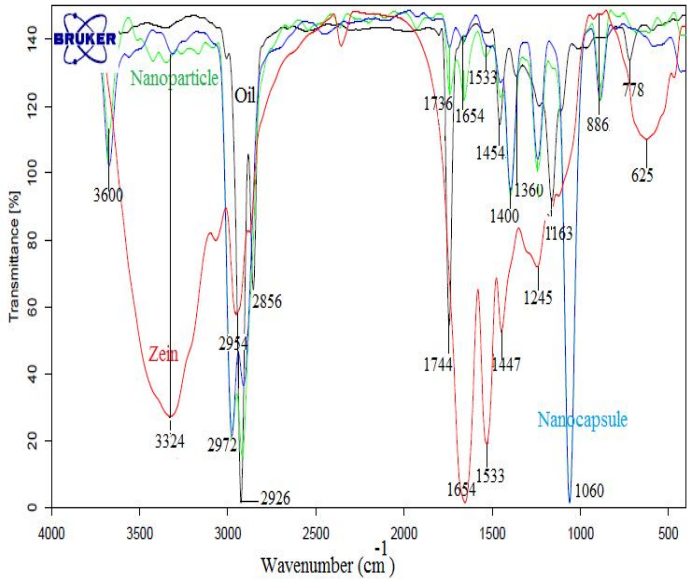
**حروف متفاوت نشان دهنده معنی‌دار بودن میانگین تیمارها در هر ستون می‌باشد ($p<0/05$)

شکل 2 (الف و ب) نمودار طیف‌سنجی فرو سرخ را به ترتیب برای نمونه‌های روغن هسته انار، پودر زئین، نانوذرات و نانوکپسول‌های پروتئینی درهم تنیده نشده و درهم تنیده شده نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌شود، ساختار کلی پیک‌ها برای نمونه‌های زئین بکر، نانوذرات و نانوکپسول‌های درهم تنیده نشده و نانوذرات و نانوکپسول‌های درهم تنیده شده به یکدیگر شباهت زیادی دارند. در نمودار روغن هسته انار در محدوده 1454 و 1744 1/cm، دو پیک قوی مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده ارتعاشات کششی مربوط به گروه C=C در حلقه‌های آروماتیک ترکیبات فنولیک آن است. پیک‌های مشاهده شده در 2926 و 2856 1/cm مربوط به ارتعاشات کششی گروه C–H گروه‌های متیلن موجود در حلقه‌های فنولیک هستند. پیک‌های مشاهده شده در 1163 و 1/cm 1360 به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی نامتقارن C–O و ارتعاشات کششی C–N هستند. پیک‌های مشاهده شده در 625 و 778 1/cm مربوط به خمش‌های خارج از صفحه‌ای پیوندهای C–H حلقه‌های فنولیک هستند (10). در نمودار طیف‌سنجی پودر زئین، ذرات و کپسول‌های بدون اتصالات عرضی، پیک‌هایی در 3324، 2954، 1654، 1447 و 1/cm 1245 دیده می‌شوند (شکل 2 الف) که به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی O–H، ارتعاشات کششی C–H ناشی از گروه‌های عاملی CH_3، آمیدهای نوع اول، آمیدهای نوع دوم، خمش‌های C–H و آمیدهای نوع سوم می‌باشند. نوار کششی قوی آمیدهای نوع اول مربوط به نوارهای کششی گروه کربونیل (C=O) است. یک جفت نوار کششی آمیدهای نوع دوم مربوط به ارتعاشات کششی نوار کششی C–N و C–N–H است. و نوار کششی آمیدهای نوع سوم مربوط به ارتعاشات کششی نوار کششی C–N و N–H است (11). آمید نوع اول پیکی در 1654 1/cm نشان می‌دهد که نشانگر ساختار مارپیچ آلفای ساختمان نوع دوم پروتئین‌هاست (12). دو پیک جدید در 1400 و 1060 1/cm در نمودار طیف‌سنجی نانوذرات و نانوکپسول‌ها مشاهده می‌شود که در نمودار طیف‌سنجی پودر زئین وجود ندارد. این دو پیک جدید به ترتیب، مربوط به ارتعاشات کششی C–N و ارتعاشات کششی نامتقارن C–O می‌باشند. در نمودار طیف‌سنجی کپسول‌های درهم‌تنیده نشده، پیک مشاهده شده در 2856 1/cm در مقایسه با پودر زئین بکر قوی‌تر شده است که نشانگر درون‌پوشانی شدن روغن هسته انار است. پیک‌های مربوط به خمش‌های خارج صفحه‌ای پیوندهای C–H در حلقه‌های بنزنی در 778 و 1/cm 625 با ارتعاشات جنبانه‌ای خارج از صفحه‌ای N–H در پروتئین زئین بکر تداخل دارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]



الف)



ب)

شکل 2. نمودار طیف‌سنجی فرو سرخ تبدیل فوریه، (الف) نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده نشده و (ب) نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده شده

• بحث

اندازه و بازده نانوذرات و نانوکپسول‌ها: قطر ذرات تمام نمونه‌ها در مقیاس نانومتری بودند. این مشاهده نشانگر آن است که تولید ذرات با روش رسوب با ضدحلال از مولکول‌های زئین درهم تنیده شده یا نشده با اسید سیتریک، تجمع‌های مولکول‌های پروتئین را به ذرات نانومتری تبدیل می‌کند. ذرات تولید شده از مولکول‌های زئین درهم تنیده نشده دارای قطر ذرات 350 نانومتر بودند در حالی که درون‌پوشانی روغن در درون ذرات رسوب کرده موجب افزایش اندازه ذرات تا 442 نانومتر گردید. Zou و همکاران (2012) نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. آنها با استفاده از روش تغییر یافته رسوب با ضدحلال، نانوذرات زئین بارگیری شده با پروسیانیدین قره‌قاط (Cranberry) را تولید کردند (13). متوسط اندازه کپسول‌های بارگیری شده با روغن که از زئین درهم تنیده نشده تولید شدند مطابق با نتایج Zhong و همکاران (2009) بود. آنها با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

استفاده از تکنیک رسوب با ضدحلال، نانوذرات زئین بارگیری شده با روغن ماهی را تولید نمودند (14). داده‌های گزارش شده در جدول 1 نشان داد که ایجاد اتصالات عرضی به روش شیمیایی در مولکول‌های زئین قبل از مرحله رسوب با ضد حلال، اندازه ذرات، نانوذرات و کپسول‌های زئین را کاهش داد که بیانگر تأثیر متقابل مولکول‌های زئین با آب و در نتیجه انقباض مولکول پروتئین و تبدیل آن به نانوذره است. Xu و همکاران (2008) نتایج مشابهی را گزارش کردند آنها مشاهده کردند که قطر فیبرهای زئین الکترواِسپون (Electroespun) شده‌ی درهم‌تنیده شده ناشی از تیمار با اسید سیتریک کوچک‌تر از نمونه‌های مشابه درهم‌تنیده نشده است (15). اندازه کوچک‌تر و نیز یکنواختی بیشتر ذرات و کپسول‌های تولید شده از زئین درهم‌تنیده شده در مقایسه با نمونه‌های به دست آمده از پروتئین درهم‌تنیده نشده (جدول 1) موجب افزایش کاربرد آنها در نوشیدنی‌های شفاف با کمترین اثر بر احساس دهانی و ظاهر نوشیدنی شد. همچنین انتظار می‌رود که ذرات کوچک‌تر برای مدت زمان طولانی‌تری در بدن منتشر گردند بدون آن‌که توسط سلول‌های فاگوسیتوز حذف شوند (16) و این زمان طولانی‌تر به جذب بهتر و افزایش کارایی کپسول‌های زئین درهم‌تنیده شده منجر می‌گردد. شایان ذکر است که ذرات زیستی بسیار کوچک (در مقیاس 10 نانومتر) قبل از لیز شدن (Lyzed) توسط آنزیم‌های هضم کننده به درون جریان خون نفوذ می‌کنند و مواد درون‌پوشانی شده را به بخش‌های ناخواسته و غیر هدف در بدن منتقل می‌کنند (17). نتایج مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نمونه‌ها کروی شکل و در حالت خشک به صورت توده‌ای در آمده بودند. تفاوت بارزی بین تصاویر میکروسکوپی ذرات زئین دارای اتصال عرضی و بدون اتصال عرضی مشاهده نشد. Reddy و Yang (2009) نشان دادند که ایجاد اتصال عرضی در فیلم‌های نشاسته، مرفولوژی سطح فیلم را تغییر نداد (18).

نتایج نشان داد که بازده تولید نانوذرات بالا بود (95/2% برای نانوکپسول‌های درهم تنیده شده در مقایسه با 87/2% برای نانوکپسول‌های درهم تنیده نشده) و این مشاهده نشانگر تولید جرم مناسبی از توده‌های پروتئینی با استفاده از روش رسوب با ضدحلال است. داده‌های جدول 2 نشان می‌دهد که درهم‌تنیده شدن مولکول‌های زئین به‌وسیله اسید سیتریک قبل از افزودن ضدحلال، به‌طور معناداری بازده تولید ذره را افزایش داده است. تشکیل توده‌های پروتئینی به دلیل اتصالات بهم پیوسته مولکول‌های زئین توسط عامل ایجاد کننده اتصالات عرضی (اسید سیتریک)، بازده تولید ذره را افزایش داد. درون‌پوشانی روغن، بازده تولید ذره را برای هر دو نانوکپسول (درهم‌تنیده شده و درهم‌تنیده نشده) افزایش داد (جدول 2). اگر روغن همزمان با ضدحلال به محلول زئین افزوده شود قادر است با مولکول‌های پروتئینی رسوب داده شده در برهمکنش‌های آبگریز پیوند برقرار نماید. این امر منجر به افزایش میزان ترسیب مولکول‌های زئین به شکل ذره می‌گردد. به‌طور قابل ملاحظه‌ای، 95 درصد از روغن در درون نانوذرات درهم‌تنیده شده، درون‌پوشانی می‌شود.

در نمودار طیف‌سنجی نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده شده (شکل 2 ب)، پیک جدیدی در محدوده‌ی 1736 1/cm ظاهر شده است که مربوط به گروه‌های کربوکسیل و کربونیل استر می‌باشد. حضور کربونیل استر، گروه کربونیل (C=O) متصل به هیدروژن و پیک کششی C–N در نمودار طیف‌سنجی نانوذرات و نانوکپسول‌های زئین درهم‌تنیده شده در مقایسه با نمونه‌های درهم‌تنیده نشده، ایجاد پیوند شیمیایی بین اسید سیتریک و پروتئین زئین را تأیید می‌کند. اسید سیتریک به عنوان عامل ایجاد اتصال عرضی و درهم‌تنیدن، به دلیل دِهیدراتاسیون دو گروه کربوکسیل به ترکیب واسطه‌ای انهیدرید حلقوی تبدیل می‌شود. سپس ترکیب واسطه با گروه آمین مولکول‌های پروتئین واکنش داده و یک گروه عاملی استر تشکیل می‌دهد (18) کاتالیست قلیایی، حمله‌های هسته دوست گروه آمین پروتئین زئین را به گروه کربونیل اسید سیتریک افزایش می‌دهد (19). در محدوده 1535- 1/cm 1659، شدت جذب نوارهای نانوذرات و نانوکپسول‌ها به طور معناداری نسبت به پروتئین زئین بکر افزایش نشان داد. این افزایش بر تقلیل ساختار مارپیچ آلفای پروتئین دلالت دارد این کاهش ناشی از دِآمینه شدن گلوتامین است که برای تشکیل مارپیچ‌های غیر موازی مولکول‌های زئین، بحرانی است (8). بر اساس نمودارهای طیف‌سنجی، مشاهده می‌شود که بین روغن و پروتئین درون پوشانی کننده، هیچ‌گونه پیوند کوالانسی تشکیل نشده است و روغن صرفاً به طور فیزیکی در درون پروتئین به دام افتاده و درون پوشانی شده است. ساختار و عملکرد روغن در طول فرآیند درون‌پوشانی دستخوش

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

هیچ‌گونه تغییری نبوده و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن حفظ گردیده است. نتایج به دست آمده با مشاهدات پیشین (20) که نشانگر ایجاد درهمکنش‌های هیدروفوبیک و پیوندهای هیدروژنی بین روغن و پروتئین زئین است کاملاً مطابقت دارد.

رهایش روغن از کپسول‌ها در شرایط برون تنی: میزان رهایش روغن به درون محیط شبیه سازی شده با معده در حضور آنزیم پپسین بعد از هضم به مدت 40 ساعت برای نانوکپسول‌های زئینی درهم‌تنیده شده و نشده، اندازه‌گیری شد. مشخص گردید که میزان 5 ± 46 درصد از روغن درون‌پوشانی شده در درون نانوکپسول‌های زئینی بدون اتصالات عرضی و درهم‌تنیده نشده به‌وسیله هضم رهایش یافت. در حالی که 4 ± 40 درصد از روغن درون‌پوشانی شده در درون نانوکپسول‌های زئینی درهم‌تنیده شده در اثر هضم رهایش یافت. بیشتر بودن میزان رهایش روغن در نانوکپسول‌های درهم‌تنیده نشده، نشان می‌دهد که ذرات زئین در مقابل پروتئولیز آنزیمی در شرایط اسیدی بسیار ناپایدار هستند. بهم پیوسته کردن مولکول‌های زئین قبل از افزودن ضدحلال و تولید ذرات، ساختمان ذرات را تا حدی در برابر پروتئولیز اسیدی پایدارکرد. Reddy و Yang (2009) مشاهده نمودند که ایجاد اتصالات عرضی در ساختار فیبرهای زئینی علاوه بر کاهش میزان تجزیه و هضم، موجب بهبود سازگاری زیستی می‌گردد (18).

طبق یافته‌های این بررسی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که درون‌پوشانی روغن هستهٔ انار از راندمان بالایی برخوردار است. با این تکنیک می‌توان به شکل مؤثری میزان اکسیداسیون روغن هستهٔ انار (با توجه به زیاد بودن اسیدهای چرب نا اشباع) را در برابر عوامل پراکسیدان و شرایط نامساعد کاهش داده و از این روش جهت تولید محصولات فراسودمند استفاده نمود. با توجه به بکارگیری زئین ذرت به عنوان مادهٔ حامل (ترکیبات دیوارهٔ کپسول)، این ترکیب دارای ترکیبات ضد اکسایشی فراوان بوده که به صورت مضاعف در افزایش پایداری روغن هستهٔ انار کمک می‌نماید. همچنین لازم به ذکر است که زئین ذرت به صورت ارزان و فراوان در دسترس بوده و محدودیتی در انجام این پژوهش به چشم نمی‌خورد.

References

1. Hernandez F, Melgarejo P, Olias JM, Artes, F. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars. Food Agri. Org. United Nations 1989; 42: 205-209.
2. Faria A, Calhau C. Pomegranate in Human Health: An Overview. In: Ronald Ross W, Victor RP, editors. Bioactive Foods in Promoting Health. San Diego: Academic Press 2010; 551-630.
3. Shukla R, Cheryan, M. Zein: the industrial protein from corn. Ind. Crops Prod. 2001; 13: 171-192.
4. Marzieh Razavizadeh BB, Khan Mohammadi F, Azizi SN. Comparative study on properties of rice bran oil microcapsules prepared by spray drying and freeze drying. J Res. Innov. Food Sci. Technol. 2014; 3: 97-114 [in Persian].
5. Alavi Talab H. Production of omega-3 micro-capsules by coacervation method. Medical Sci. J. Islamic Azad University,Tehran Medical Branch 2012; 22: 205-210 [in Persian].
6. Jiang Q, Reddy N, Yang Y. Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds. Acta Biomaterialia 2010; 6: 4042-4051.
7. Desai KGH, Park HJ. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. Dry Technol. 2005; 23: 1361-1394.
8. Zhang B, Luo Y, Wang Q. Effect of acid and base treatments on structural, rheological, and antioxidant properties of α-zein. Food Chem. 2011; 124: 210-220.
9. Chen L, Remondetto GE, Subirade M. Food protein based materials as nutraceutical delivery systems. Trends Food Sci.and Technol. 2005; 17: 272-283.
10. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley and Sons Inc., 7thed 2005.
11. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Cara R, Weill R, Boccio J. Fortification strategies to combat zinc and iron deficiency. Nutr.Rev. 2002; 60 (2): 52-58.
12. Krause K, Muller RH. Production and characterization of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization. Int. J. Pharmac.2001; 214: 21-24.
13. Zou T, Li Z, Percival SS, Bonard S, Gu L. Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. Food Hydro. 2012; 27: 293-300.
14. Zhong Q, Tian H, Zivanovic S. Encapsulation fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. J. Food Proc. Preserv. 2009; 33: 255-270.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

15. Xu W, Karst D, Yang W, Yang Y. Novel zein-based electrospun fibers with the water stability and strength necessary for various applications. Polymer Int. 2008; 57: 1110-1117.

16. Pinto RC, Neufeld R, Ribeiro A, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. Nanotechnol., Biology, and Med. 2006; 2: 53-65.

17. Chaudhry Q, Watkins R, Castle L. Nanotechnologies in the food arena: new opportunities, new questions, new concerns. In Q. Chaudhry, L. Castle, and R. Watkins (Eds.), Nanotechnologies in food (pp. 1-17). Cambridge, UK: RSC Publishing 2010.

18. Reddy N, Yang Y. Citric acid cross-linking of starch films. Food Chem. 2009; 118: 702-711.

19. Yang CQ, Wang X. Formation of cyclic anhydride intermediates and esterification of cotton cellulose by multifunctional carboxylic acids: an infrared spectroscopy study. Textile Res. J. 1996; 66: 595-603.

20. Wu Y, Luo Y, Wang Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. LWT-Food Sci. Technol. 2012; 48: 283-290.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]

Nano-encapsulation of Pomegranate Seed Oil by Liquid-liquid Dispersion Method and Oil Releasing in Gastric Simulated Conditions

Tavakolipour H[*2], *Mokhtarian M*[1]

2- * Corresponding author: Department of Food Science and Technology, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran. Email: h.tavakolipour@gmail.com

1- Young Researchers and Elite Club, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Received 9 Jun, 2015 **Accepted 30 Sept, 2015**

Background and Objectives: Pomegranate seed oil contains significant amounts of estrols such as β-sitosterol, stigmasterol, campesterol, *and also*, α, β and γ tocopherols. The object of this article is encapsulation of pomegranate seed oil in zein nanoparticles and investigation of the stability of these encapsulated functional compounds in food systems model (such as acidic beverages) and passing under gastric simulating conditions and release in the intestinal tract.

Materials and Methods: Zein was chemically cross-linked with citric acid in the presence of sodium hydroxide as catalyst. Water was then used to desolvate the zein and generate core-free or pomegranate seed oil-loaded particles.

Results: The mean sizes of the particles obtained from non-cross-linked and cross-linked zeins were 350 and 246 nm, respectively. Cross-linking of the particles resulted to increase in the oil encapsulation efficiency from 87% to 95%. Scanning electron microscopy revealed a spherical morphology for particles. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy confirmed the occurrence of chemical linkages between citric acid and zein. Also it was found that oil entrapment inside the zein particles was merely physical.

Conclusion: The results showed that citric acid in the presence of NaOH as alkaline catalyst can be used successfully for production of cross-linked zein.

Keywords: Zein nanoparticles, Citric acid, Cross-linking, Desolvation, Pomegranate seed oil

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-25]