



## غنی سازی نوشیدنی تخمیری بر پایه گندم سیاه و عدس با نانولیپوزوم های ویتامین E و C میر حسین موسوی<sup>۱</sup>، مهدی قره خانی<sup>۲\*</sup>، کاظم علیرضالو<sup>۳</sup>، لیلاروفه گری نژاد<sup>۴</sup>، صدیف آزاد مرد دمیرچی<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	لیپوزوم های بر پایه لیستین به عنوان حامل های ویتامین E و C، جهت غنی سازی نوشیدنی تخمیری بر پایه عدس / گندم سیاه مطالعه شد. لیپوزومها با روش هیدراسیون تهیه شدند. اندازه و شکل ذرات با تفرق نور و میکروسکوپ الکترونی روبشی آنالیز شد. درصد کارایی انکپسولاسیون ویتامین E و C با روش HPLC تعیین شد. کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب ۸۸/۵ و ۵۰ درصد بود. متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین C کوچکتر از متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین E بود. نتایج نشان داد لیپوزوم های تولید شده، نانولیپوزوم های پایدار با اندازه کوچک، ضریب پخش پذیری پایین (۰/۳) و تک مد و بار سطحی منفی بالا هستند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی وجود ذرات کروی با اندازه نانومتری را در نانولیپوزومها نشان داد. نانولیپوزوم های ویتامین E در مقایسه با نانولیپوزوم های ویتامین C کدورت بالاتری ایجاد کردند. افزودن نانولیپوزوم های ویتامین E و C به نوشیدنی تخمیری نه تنها هیچ اثر منفی بر ترکیب شیمیایی و پذیرش حسی نوشیدنی نداشت بلکه سبب افزایش محتوای ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی اکسیدانی آن شد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۸	
کلمات کلیدی: نوشیدنی تخمیری، نانولیپوزوم، ویتامین E، ویتامین C.	
DOI: 10.22034/FSCT.19.128.193 DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.21.6	
* مسئول مکاتبات: m.gharekhani@iaut.ac.ir	

## ۱- مقدمه

بیشتر مواد غذایی تخمیری در جهان بر پایه لبنیات بوده و به تولید محصولات تخمیری بر پایه غلات توجه کمتری شده است، علاوه بر این به دلیل حساسیت برخی افراد به محصولات لبنی، عدم تحمل لاکتوز، حساسیت به شیر و میزان کلسترول بالای محصولات لبنی و همچنین افزایش رژیم‌های گیاه‌خواری بین مصرف‌کننده‌ها، تقاضای مصرف فرآورده‌های پروبیوتیکی گیاهی روز به روز افزایش می‌یابد [۱]. از طرفی، نوشیدنی‌های گیاهی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک در حال حاضر به‌عنوان محصولات غذایی سالم و غنی از نظر مواد مغذی مانند مواد معدنی، فیبر رژیمی، آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌ها محسوب می‌شوند [۲ و ۳]. سلپاک یک بیماری گوارشی وراثتی است که در اثر حساسیت به پروتئینی به نام گلوتن (پروتئینی که در گندم، جو و چاودار وجود دارد) ایجاد می‌شود. در حال حاضر تنها درمان بیماری سلپاک پیروی از رژیم فاقد گلوتن در تمام طول عمر است. افراد مبتلا به این بیماری باید از مصرف غذاهای حاوی گندم، جو و جو دوسر پرهیز کنند. این افراد در رژیم فاقد گلوتن می‌توانند بسیاری از غذاها مانند گوشت، مرغ، ماهی، سبزیجات و میوه‌های تازه، برنج، حبوبات و سیب زمینی را مصرف کنند. کیفیت تغذیه‌ای دانه‌ها گاهی اوقات نسبت به شیر کمتر است که این امر به دلیل محتوای پروتئینی کمتر، کمبود اسید آمینه‌های خاص مثل لیزین، قابلیت پایین هضم نشاسته، ماهیت سخت دانه‌ها و وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای مثل اسید فیتیک، تانن و پلی‌فنل‌ها است. بنابراین با تخمیر می‌توان سطح کربوهیدرات‌ها، پلی‌ساکاریدها و اولیگوساکاریدهای غیر قابل هضم را کاهش داده و کیفیت پروتئین و سطح لیزین را بهبود بخشید. همچنین برخی اسیدهای آمینه سنتز شده و قابلیت دسترسی به ویتامین‌های گروه B نیز افزایش می‌یابد [۴]. بسیاری از مواد مغذی موجود در دانه کامل غلات تحت تاثیر فرآیند جوانه‌زنی قرار می‌گیرند و جوانه‌ها بستر مناسبی جهت رشد پروبیوتیک‌ها می‌باشند، بنابراین تخمیر سبب بهبود خواص محافظتی، غذایی و سلامت بخشی محصولات خواهد شد [۵].

گندم سیاه (باکویت) که مبداء آن آسیای میانه است حاوی مقدار زیادی فیبر، پروتئین و مقدار قابل توجهی آهن و منیزیم می‌باشد. علاوه بر این، تمام هشت آمینو اسید ضروری برای بدن انسان در باکویت یافت می‌شود. میزان پروتئین گندم سیاه

۱۲ تا ۱۸/۹ درصد گزارش شده است و غلظت اسیدهای آمینه ضروری به ویژه سیستئین و متیونین موجود در آن در مقایسه با برخی از غلات رایج مانند برنج و ذرت بیشتر است. بیشترین میزان پروتئین در گندم سیاه از نوع گلوبولین و آلبومین می‌باشد. همچنین این دانه منبع خوبی از فیبرهای رژیمی است. این شبه غلات منبع خوبی از ریز مغذی‌هایی مانند کلسیم، منیزیم و آهن و نیز ویتامین E و ریبولوین می‌باشد که با توجه به موارد فوق‌الذکر، محصولات غنی از پروتئین به‌وسیله این شبه غلات می‌تواند تهیه شود [۶ و ۷]. دانه عدس (*Lens culinaris*) به خانواده‌ی حبوبات تعلق دارد که منبع پروتئینی ارزان قیمتی محسوب می‌شود و عدس به دلیل پروتئین فراوان، جایگزین مناسبی برای گوشت است. عدس جوانه‌زده حاوی مقدار زیادی اسیدهای آمینه متیونین و سیستئین است که برای تشکیل ماهیچه و قوای جسمانی بسیار مهم هستند. عدس حاوی آنتی‌اکسیدان‌هایی است که بیشتر متعلق به خانواده‌ی فلاونوئیدها می‌باشند. این دانه همچنین سرشار از فیبر می‌باشد و منبع فوق‌العاده‌ی فسفر، منگنز، مس، پتاسیم، فولات و ویتامین‌های B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، B<sub>3</sub> و B<sub>6</sub> محسوب می‌شود [۸ و ۹]. شبه غلات منابع قابل توجه ویتامین‌ها هستند و جهت استفاده از پتانسیل کامل آنها باید اقدامات لازم برای حفظ ویتامین‌ها در طی فرایند و یا افزایش محتوای آنها به وسیله جوانه‌زنی یا تخمیر انجام شود. در تحقیق انجام شده توسط حاتمی و همکاران، اثرات عصاره سبوس برنج (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) بر خواص میکروبی، شیمیایی و حسی نوشیدنی پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت و ویژگی‌های pH، اسیدیته، کل ماده جامد محلول، زنده‌مانی سلول و ویژگی‌های حسی نمونه‌ها در روزهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ نگهداری بررسی شد. تعداد باکتری در طول نگهداری در یخچال کاهش یافت. در طول نگهداری pH و کل ماده جامد محلول تیمارها کاهش یافت ولی سطح اسیدیته به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که نمونه حاوی ۱۰ درصد عصاره سبوس برنج، در مقایسه با سایر نمونه‌ها مقبول‌تر بود. یافته‌های این محققان نشان داد عصاره سبوس برنج و عسل برای تولید نوشیدنی حاوی لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان یک نوشیدنی ارزشمند می‌تواند در نظر گرفته شود [۱۰]. پیشرفت‌های اخیر در نانو تکنولوژی می‌تواند با انکپسوله کردن ویتامین‌ها در اندازه‌های نانو ذرات و محافظت آنها از تاثیر تخریبی عوامل محیطی،

بسیاری از چالش‌ها و نقاط ضعف مطرح شده در خصوص آنها را برطرف نماید [۱۱].

نتایج مطالعه محققان در مورد لیپوزوم‌های بر پایه فسفاتیدیل کولین سویا به عنوان حامل ویتامین E و C برای افزودن به آب پرتقال که بعداً پاستوریزه می‌شود، نشان داد، لیپوزوم‌ها قبل و بعد از پاستوریزاسیون اثر حفاظتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌ها داشتند. علاوه بر این، کارایی انکپسولاسیون که با ساتریفوژ اندازه‌گیری شد، کپسولاسیون بالایی نشان داد. نتایج نشان‌دهنده وجود رابطه بین پایداری اکسیداتیو و توده‌ای شدن ذرات، همراه با تغییر اندازه و مورفولوژی آنها بود: ترکیب فرمولاسیون لیپوزومی و ویتامین‌ها با آب پرتقال ویژگی‌های ارگانولپتیکی آن را تغییر نداد و نوشیدنی‌ها پس از پاستوریزاسیون و نگهداری در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۷ روز، پایداری میکروبیولوژیکی خوبی نشان دادند [۱۲]. بر این اساس، هدف از این تحقیق بررسی ویژگی‌های نوشیدنی تخمیری غنی شده با نانولیپوزوم حاوی ویتامین E و C می‌باشد. در تحقیق اولیه انجام شده توسط موسوی و همکاران [۱۳] بهینه‌سازی فرمولاسیون نوشیدنی تخمیری غیر لبنی فاقد گلوتن تهیه شده با استفاده از دانه‌های باکویت و عدس به صورت تکی و ترکیبی انجام شده بود که در تحقیق حاضر فرمولاسیون بهینه نوشیدنی با نانولیپوزوم ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین C غنی‌سازی شد، ویژگی‌های فیزیکی نانو لیپوزومها (میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا)، راندمان ریزپوشانی، ریزساختار و مورفولوژی نانوحاملها نیز بررسی شد و سپس تاثیر نانولیپوزوم ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین C بر ویژگی‌های شیمیایی فرمولاسیون بهینه نوشیدنی تخمیری (خاکستر، ماده خشک، اسیدیته، pH، شمارش باکتری‌های پروبیوتیکی و میزان فنل کل) همچنین ویژگی نوری کدورت نوشیدنی غنی شده با نانولیپوزوم ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین C تعیین شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

ماده اولیه مورد استفاده در این تحقیق نوشیدنی تخمیری تهیه شده با دانه‌های گندم سیاه، عدس و باکتری‌های اسید لاکتیک (از نوع لاکتوباسیلوس پلاتاروم با کد PTCC (۱۷۴۵) و

بیفیدوباکتریوم بیفیدوم با کد PTCC (۱۶۴۴) می‌باشد که در تحقیق اولیه انجام شده توسط موسوی و همکاران [۱۳]، فرمولاسیون آن بر اساس طرح D اپتیمال بهینه‌سازی شده بود و در تحقیق حاضر فرمولاسیون بهینه این نوشیدنی تخمیری با استفاده از نانولیپوزوم ویتامین C و ویتامین E غنی‌سازی خواهد شد. فسفاتیدیل کولین (با درجه خلوص ۹۹٪ شرکت مرک، آلمان) و کلسترول (با درجه خلوص ۹۵٪ شرکت مرک، آلمان) و اتانول ۹۶٪ مرک برای تهیه پوشش نانولیپوزومی ویتامین‌ها استفاده شد. ویتامین E (توکوفرول استات) مرک با شماره سری ۱۲۰۴۰۱۱۸ UT و ویتامین C (L+ اسکوربیک اسید) مرک برای تهیه نانولیپوزوم استفاده شد سایر مواد مورد استفاده در این تحقیق نیز از نوع آزمایشگاهی می‌باشد.

### ۲-۲- روش‌ها

#### ۲-۲-۱- بارگیری ترکیبات زیست فعال در نانولیپوزوم

پس از انتخاب فرمولاسیون نوشیدنی بهینه (۵۲ میلی‌لیتر عصاره آرد گندم سیاه جوانه زده در ۱۰۰ میلی‌لیتر، ۴۸ میلی‌لیتر عصاره آرد عدس جوانه زده در ۱۰۰ میلی‌لیتر و باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم)، ویتامین E و ویتامین C به منظور ترکیب در فاز آبی نوشیدنی در یک سری از تیمارها به صورت آزاد (بدون انکپسولاسیون) و در سری دوم به صورت انکپسوله به روش نانولیپوزوم تهیه و به این نمونه نوشیدنی افزوده شد.

#### ۲-۲-۲- تخمین مقدار ویتامین E و ویتامین C مورد

##### نیاز در تهیه نانولیپوزوم

با توجه به محلول در آب بودن ویتامین C و دفع مازاد آن از بدن و نامحلول بودن ویتامین E در آب و بر اساس میزان دریافت روزانه هر فرد سالم، یک سطح میانگین بین حداقل و حداکثر میزان دریافت روزانه برای هر یک از این ویتامین‌ها در نظر گرفته شد. بدین ترتیب که با فرض حداکثر دریافت ویتامین E روزانه ۲۲ واحد (معادل ۱۵ میلی‌گرم) و حداقل دریافت ویتامین E روزانه صفر واحد (معادل ۰ میلی‌گرم)، میانگین این دو سطح محاسبه شد یعنی مقدار ۱۱ واحد ویتامین E معادل ۷/۵ میلی‌گرم می‌باشد. برای تهیه لیپوزوم ۷۵ میلی‌گرم ویتامین E در نظر گرفته شد بطوریکه در هر میلی‌لیتر نانولیپوزوم، ۷/۵ میلی‌گرم ویتامین E وجود داشته باشد. میزان دریافت روزانه ویتامین C نیز در محدوده (۶۵-۹۰ میلی‌گرم) می‌باشد که میانگین این دو سطح یعنی ۷۵ میلی‌گرم ویتامین C می‌باشد و برای تهیه لیپوزوم ۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین در نظر

گرفته شد و در مرحله تهیه لیپوزوم ۷۵ میلی گرم ویتامین C در هر میلی لیتر لیپوزوم استفاده شد.

### ۲-۳-۳- تهیه نانولیپوزوم

لیپوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک و بر اساس روش تشریح شده توسط سرابندی و همکاران [۱۴] با اندکی تغییر تولید گردید. فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال به ترتیب، ۰/۰۹ گرم لیستین سویا و ۰/۰۱ گرم کلسترول و یک قطره توئین ۸۰ در ۱۰ میلی لیتر اتانول مطلق بود. فرآیند تبخیر و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته گرد با استفاده از اواپراتور چرخان با دور ۶۰ rpm در دمای ۶۰°C انجام گرفت. برای اطمینان از حذف کامل حلال، بالن مدور به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در دسیکاتور و در دمای محیط نگهداری شد. سپس فیلم لپیدی خشک شده با استفاده از بافر فسفات نمکی (۷/۴ PBS; pH) حاوی غلظت معین ویتامین E و C، به مدت ۱ دقیقه با استفاده از ورتکس مجدداً هیدراته گردید. محلول حاصل با استفاده از روتاری در دمای ۶۰°C به مدت ۲ دقیقه هم زده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای محیط هم زده شد و خنک شد. این فرآیند هم زدن در ۳ مرتبه تکرار گردید. نهایتاً محلول حاصل ۱۰ مرحله و در هر مرحله به مدت ۱ دقیقه به صورت متناوب بوسیله پروب فراصوت (توان ۷۰٪ و سیکل ۰/۵) هموژن گردید و برای جلوگیری از افزایش دما، فرآیند فراصوت در شرایط نگهداری نانولیپوزوم در آب سرد انجام گرفت. نانولیپوزوم تولید شده تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال نگهداری شد.

### ۲-۳-۴- تعیین اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آنها در دستگاه سنجش اندازه ذرات مدل SALD 2101، (WingSald) ساخت کشور ژاپن اندازه گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی توسط رابطه (۱) محاسبه شد [۱۵].

ni: تعداد ذرات

di: قطر میانگین ذرات

$$\frac{\sum nidi^4}{\sum nidi^3} = [4.3]D \quad \text{رابطه (۱):}$$

### ۲-۳-۵- تعیین پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین از دستگاه پتانسیل زتا مدل Nano-ZS، (Malvern) ساخت

کشور انگلستان استفاده شد. برای این منظور هر یک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شده و سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص دستگاه قرار خواهد گرفت. اندازه گیری پتانسیل زتا دیسپرسیون لیپوزومی در  $pH = 7/4$  و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۱۶].

### ۲-۳-۶- کارایی انکپسولاسیون

برای تعیین کارایی درون پوشانی ویتامین‌های E و C، ابتدا محلول لیپوزومی با سرعت ۳۰۰ rpm سانتریفوژ شد. این کار باعث می‌شود که ویتامین E آزاد با توجه به ماهیت لیپوفیل خود به بالای محلول بیاید. بعد از قسمت شفاف مابقی که حاوی ویتامین کپسوله شده می‌باشد، ۲ میلی لیتر برداشته شد و یک میلی لیتر کلروفرم جهت تخریب کپسول لیپوزومی به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر لوله آزمایش به هم زده شد. سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. لایه بالایی (حاوی لیپوزوم تخریب شده) از محلول کلروفرمی حاوی ویتامین جدا شد. کلروفرم با استفاده از گاز ازت تبخیر شد، بعد یک میلی لیتر فاز متحرک به آن اضافه شد و با استفاده از HPLC سطح زیر منحنی ویتامین کپسوله شده به دست آمد. جهت تعیین مقدار ویتامین درون پوشانی شده در نانولیپوزوم‌ها از دستگاه HPLC مدل Knauer ساخت آلمان استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ و ۲۵۰ و ۳۰۰ میکرو لیتر در هر میلی لیتر از ویتامین C و غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر در هر میلی لیتر از ویتامین E تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر منحنی آنها محاسبه و منحنی استاندارد آنها با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد. سپس مساحت سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله حاصل از منحنی استاندارد جاگذاری شد و غلظت ویتامین کپسوله شده به دست آمد. در نهایت درصد ویتامین درون پوشانی شده، از روی معادله کارایی درون پوشانی (رابطه ۲) محاسبه شد [۱۷].

رابطه (۲):

$$\text{کارایی درون پوشانی} = \frac{\text{مقدار ویتامین کپسوله شده}}{\text{مقدار کل ویتامین اضافه شده}} \times 100$$

شرایط دستگاه HPLC-PDA برای اندازه گیری ویتامین E عبارت بود از: فاز متحرک متانول ۱۰۰٪، حاوی ۰/۰۵٪ اسیدفسفریک ۸۵٪ جریان فاز متحرک ۱ میلی لیتر در دقیقه

**۲-۲-۸-۴- اندازه‌گیری خاکستر**

اندازه‌گیری خاکستر نمونه‌های نوشیدنی تخمیری بر اساس استاندارد ملی ایران، شماره ۲۶۸۵ انجام شد [۲۱].

**۲-۲-۸-۵- اندازه‌گیری فنل کل**

تعیین کمی فنل کل با استفاده از روش طیف سنجی بر اساس واکنش با معرف فولین-سیوکالتیو انجام خواهد شد. برای این منظور ۰/۲ میلی‌لیتر نمونه نوشیدنی با ۰/۰۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۰ درصد سدیم کربنات و ۴/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط می‌شود. تمام نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفته و سپس میزان جذب رنگ نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و میزان کل ترکیبات فنولی با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک به دست آمد. برای رسم نمودار اسید گالیک از غلظت‌های مختلف این ماده استفاده شده و در نهایت نتایج به صورت میلی‌گرم اسید گالیک در میلی‌لیتر نمونه گزارش گردید [۲۲].

**۲-۲-۸-۶- تعیین کدورت نمونه**

کدورت نانولیپوزوم‌های حاوی ماده زیست فعال توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری خواهد شد. ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد [۲۳].

**۲-۲-۸-۷- ارزیابی حسی نوشیدنی**

پس از تهیه نوشیدنی‌های تخمیری، ویژگی‌های حسی آنها از قبیل مزه، بو، رنگ، احساس دهانی و مقبولیت کلی با آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای به کمک ۲۰ ارزیاب حسی ارزیابی شد و امتیازات یک تا پنج (۵= خیلی خوشایند، ۴= خوشایند، ۳= نه خوب نه بد، ۲= ناخوشایند، ۱= خیلی ناخوشایند) به نمونه‌ها اختصاص داده شد. برای ارزیابی حسی فرم‌های ویژه در اختیار ارزیاب‌ها قرار داده شد [۲۴].

**۲-۲-۹- آنالیز آماری**

کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام پذیرفتند و میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس با سطح اطمینان ۹۵ درصد (P-value  $\leq 0.05$ ) با نرم‌افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تهیه نمونه‌های غنی شده با ویتامین‌ها به صورت آزاد و انکپسوله، کلیه ویژگی‌ها و صفات مرتبط با فرآیند کپسوله

زمان بازداری ۱۷/۵ دقیقه طول موج ۲۱۰ نانومتر و شرایط ستون C18 و طول ۲۵ سانتی‌متر بود. شرایط دستگاه HPLC-PDA برای اندازه‌گیری ویتامین C شامل فاز متحرک متانول- بافر اسید فسفریک (۲۰-۸۰) با pH ۲/۷، جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه زمان بازداری ۲/۵ دقیقه طول موج ۲۴۳ نانومتر و شرایط ستون C18 و طول ۲۵ سانتی‌متر بود.

**۲-۲-۷- بررسی ساختار مورفولوژی نانولیپوزوم‌های****ویتامین E و ویتامین C**

برای مشاهده ریزساختار نانولیپوزوم‌های ویتامین E و ویتامین C از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل MIRA3 FEG-SEM، ساخت کمپانی Tescan، کشور چک استفاده شد. مقداری از نانولیپوزوم‌های خشک شده توسط چسب مخصوص بر روی پین‌های آلومینیومی چسبانده شد. موادی که جزو دسته فلزات نیستند بوسیله یک لایه نازک رسانا (طلا و پالادیوم) پوشانده می‌شوند. این کار توسط ابزاری به نام پوشش‌دهنده یا با استفاده از میدان الکتریکی و گاز آرگون انجام می‌شود. در نهایت از سطح خارجی نمونه‌های آماده شده در ولتاژ ۱۵ کیلوولت و با بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر تصویربرداری شد [۱۸].

**۲-۲-۸- روش‌های تعیین ویژگی‌های نوشیدنی****۲-۲-۸-۱- اندازه‌گیری pH و اسیدیته**

پس از تولید نوشیدنی، تغییرات pH توسط دستگاه pH متر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک از روش تیتراسیون استفاده شد و طبق رابطه ۳ مقدار اسیدیته محاسبه گردید که در آن N نرمالیه و V حجم سود مصرفی در تیتراسیون است [۱].

رابطه (۳):

$$V \times 100 \times 0.009 \times N = \text{اسیدیته} \%$$

**۲-۲-۸-۲- اندازه‌گیری مواد جامد محلول**

میزان مواد جامد محلول (بریکس) نوشیدنی‌های تهیه شده با استفاده از روش رفراکتومتری در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید [۱۹].

**۲-۲-۸-۳- شمارش زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک**

میزان زنده‌مانی باکتری‌ها پس از افزودن نانولیپوزوم‌های ویتامین E و C به روش شمارش کلونی‌های رشد یافته بر روی BSM آگار پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد [۲۰].

نتایج نشان می‌دهد متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین C کوچکتر از متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین E است. نتایج نشان می‌دهد لیپوزوم های تولید شده، نانولیپوزوم های پایدار با اندازه کوچک، ضریب پخش پذیری پایین (۰/۳) و تک مد و بار سطحی منفی بالا هستند. بر اساس نتایج گزارش شده توسط محققان هر چقدر اندازه ذرات (در کسر حجمی ثابت)، کوچکتر باشد، ویسکوزیته سیستم بالاتر می‌شود: توزیع غیریکنواخت و گسترده ذره (span بالاتر) منجر به کیپ شدن بیشتر ذرات و در نتیجه ویسکوزیته پایین تر نوشیدنی می‌گردد [۲۵].

### ۲-۳- پتانسیل زتا و تحرک الکتروفوریک نانولیپوزوم های ویتامین E و C

بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی محلول های کلئیدی، پتانسیل زتا است [۲۵]. نتایج حاصل از اندازه گیری پتانسیل زتای نانولیپوزوم خالی، نانولیپوزوم های حامل ویتامین E و نانولیپوزوم های حامل ویتامین C در جدول (۱) نشان داده شده است. نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در مقدار پتانسیل زتای لیپوزوم با انکپسولسیون ویتامین درون لیپوزوم است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم خالی ۲۲- میلی ولت است. در حالیکه پتانسیل زتای نانولیپوزوم حامل ویتامین C، ۲۸- میلی ولت و پتانسیل زتای لیپوزوم های حاوی ویتامین E، ۴۶/۲- میلی ولت است. پاداموار و پوکهارکار گزارش نمودند که با افزودن ویتامین E به لیپوزوم های لیستین- کلسترول، میزان پتانسیل زتای بالاتری حاصل شد [۲۶]. در این زمینه نتایج گزارش شده توسط محققان بیانگر آن است که مقادیر بالای پتانسیل زتا (مثبت یا منفی) با افزایش پاسخ های دافعه و کاهش چسبندگی ذرات لیپوزومی، پایداری پراکندگی لیپوزومی را افزایش می‌دهد [۲۷]. فتوروس و آنتیمیساریس نشان دادند که انکپسولسیون داروهای استروئیدی هیدروفوبیک توانست بطور قابل توجهی بر کشش سطحی لیپوزوم های فسفاتیدیل کولین سویا اثر بگذارد که به دلیل تغییر جهت گروه های سر فسفاتیدیل کولین در قسمت بیرونی لیپوزوم ها است [۲۸]. در

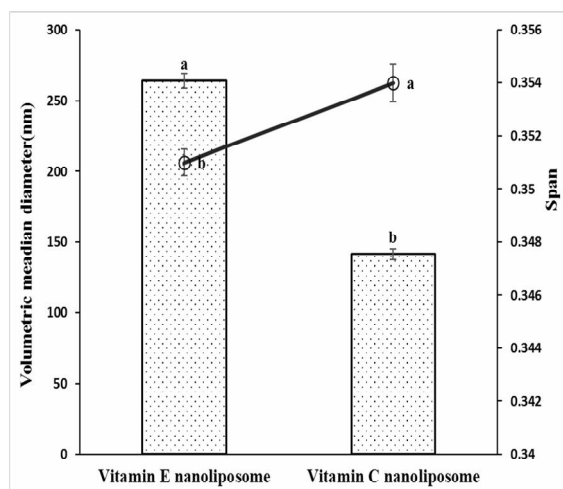
کردن اندازه گیری و با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) آنالیز گردید. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد بررسی شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2010 استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- اندازه و توزیع ذرات نانولیپوزوم ویتامین

#### E و C

توزیع اندازه ذرات اهمیت ویژه ای در تعیین خصوصیات سیستم های کپسوله شده دارد. متوسط قطر حجمی و شاخص پراکنش ذرات (اسپن) در شکل ۱ نشان داده شده است.



**Fig 1** particle size (column chart) and distribution (line chart) of vitamin E nanoliposomes and vitamin C nanoliposomes (Different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ))

متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب ۲۶۴ نانومتر و ۱۴۱/۲ نانومتر بود و نشان می‌دهد که بین اندازه ذرات نمونه ها، در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). هر چقدر توزیع اندازه ذرات تک پخش و باریک تر باشد سیستم کلئیدی همگن تر خواهد بود. شاخص پراکنش ذرات (اسپن) نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب ۰/۳۵۱ و ۰/۳۵۴ بود که نمایانگر غیر یکنواخت بودن توزیع اندازه ذره ای بود و غیریکنواختی توزیع اندازه ذره ای نانولیپوزوم های ویتامین C کمی بیشتر از نانولیپوزوم های ویتامین E است.

الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزومها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. وقتی بار کلی روی ذرات افزایش می‌یابد، ذرات همدیگر را دفع کرده و بر توده‌ای شدن غلبه می‌کنند [۲۲].

این تحقیق پتانسیل زتای منفی بالاتر در نانولیپوزومهای ویتامین E و C ممکن است به دلیل حضور فسفاتیدیل کولین و موقعیت قرارگیری اسیدچرب آن و یونیزاسیون گروه‌های فسفات و کربوکسیل باشد. پتانسیل زتای منفی در نانولیپوزومهای ویتامین E و C بیانگر نقش نیروی دافعه

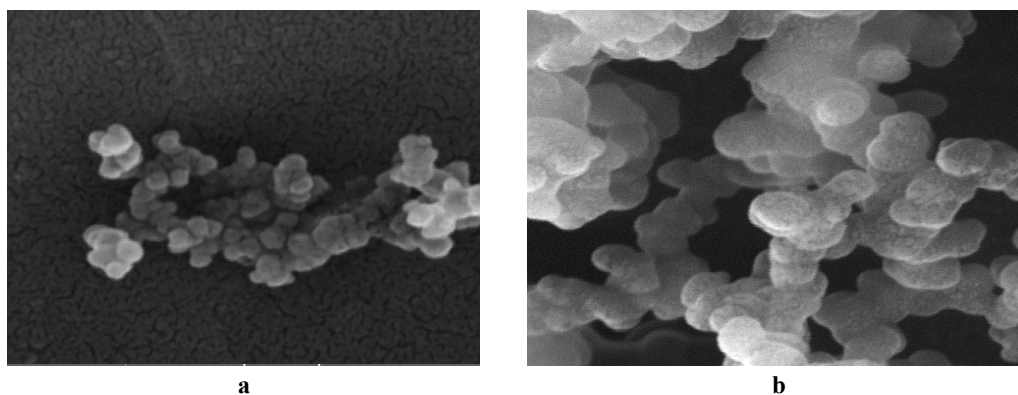
**Table 1** Zeta potential of empty nanoliposome, vitamin E nanoliposome and vitamin C nanoliposome

Zeta potential (mv)		
empty nanoliposome	vitamin C nanoliposome	vitamin E nanoliposome
-22±1 <sup>c</sup>	-28±1 <sup>b</sup>	-46.2±2 <sup>a</sup>

الکترونی، نانوذرات کروی شکل (متوسط اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر) با مناطق کریستالی نامنظم سوزنی شکل مشاهده کردند که بیانگر تشکیل کریستالهای نامنظم آلفا نسبت به کریستالهای منظم بتا بود. با تشکیل این فرم از کریستالها مقدار بیشتری از ترکیب فعال در ساختار ماتریکس لیپیدی باقی می‌ماند [۳۰]. در این تحقیق مشاهدات میکروسکوپ الکترونی SEM وجود نانوذرات لیپیدی و عدم وجود سایر گونه‌های کلئیدی از جمله میسل و وزیکول در سیستم را تایید کرد.

### ۳-۳- مورفولوژی نانوذرات

تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی، وجود ذرات کروی با اندازه نانومتری را در نانولیپوزومها نشان داد که تقریباً تأییدی بر نتایج بدست آمده از دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات بود (شکل ۲). ذرات غیر کروی باعث پهن شدن توزیع اندازه ذرات و توزیع غیریکنواخت آنها (span بالاتر) می‌شود. علاوه بر این امکان بزرگ شدن اندازه ذرات در این حالت وجود دارد [۲۹]. محققان در تصاویر حاصله از حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی بتاکاروتن با استفاده از میکروسکوپ

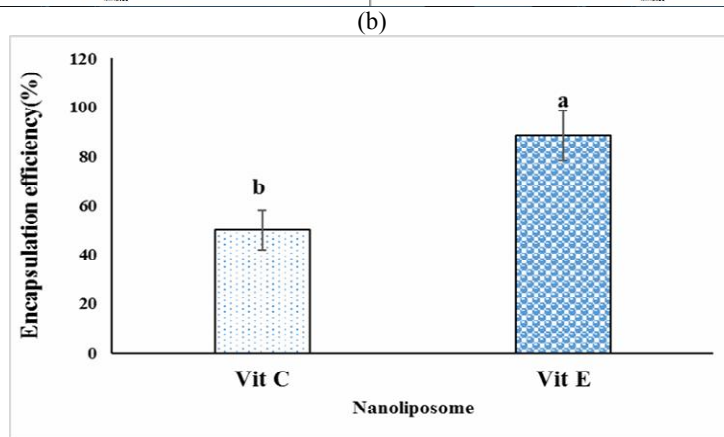
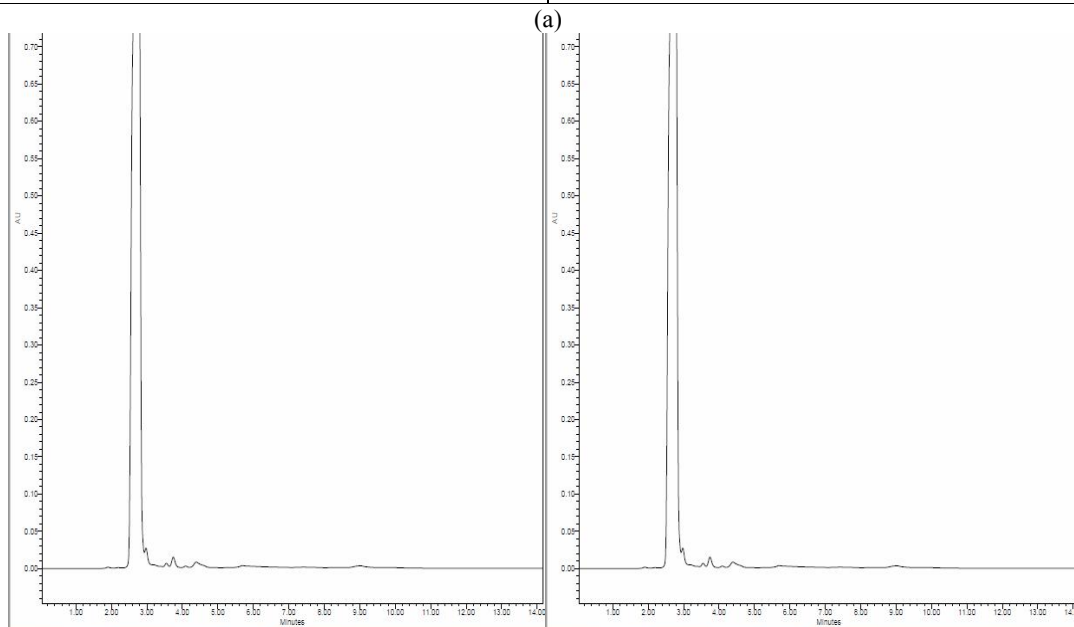
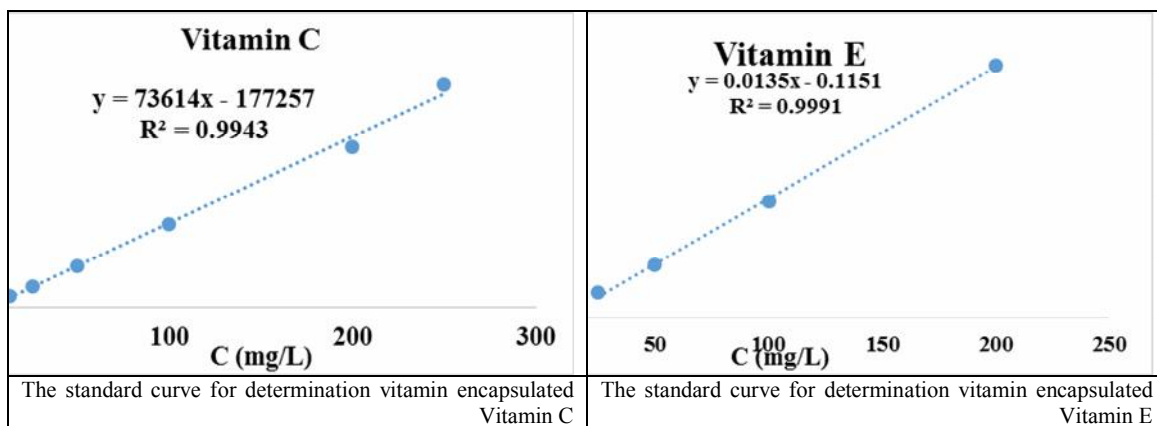


**Fig 2** Structure of vitamin C nanoliposome (a) and vitamin E nanoliposome (b)

شده از روی آن محاسبه شده را نشان می‌دهد. شکل (b) ۳ پیک حاصل از ویتامین C و ویتامین E کپسوله را که از دستگاه HPLC به دست آمده است را نشان می‌دهد. شکل (c) ۳ کارایی کپسولاسیون لیپوزوم ویتامین C و ویتامین E را نشان می‌دهد.

### ۳-۴- کارایی درون پوشانی

در این پژوهش جهت محاسبه مقدار ویتامین E و C کپسوله شده در نانولیپوزومها از دستگاه HPLC استفاده شد. شکل (a) ۳ منحنی استاندارد که غلظت ویتامین C , E بارگذاری

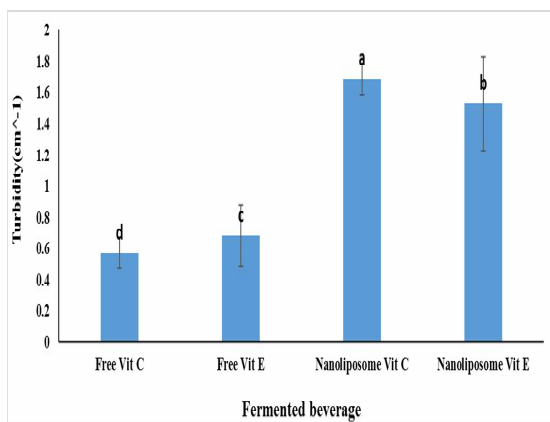


**Fig 3** Encapsulation efficiency of vitamin E nanoliposome and vitamin C nanoliposome

لیپوزوم بر کارایی درون پوشانی بود. از آنجا که ویتامین E ویتامین محلول در چربی است و در بین دولایه لیپیدی قرار می‌گیرد و محل فرارگیری متفاوتی نسبت به ویتامین C دارد، لذا کارایی درون پوشانی بالای ویتامین E نسبت به ویتامین C

کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب ۸۸/۵ و ۵۰ درصد بوده است. مطابق نتایج تفاوت معنی داری بین نمونه های حاوی نانولیپوزوم ویتامین E و C در سطح ۰/۰۵ مشاهده شد و این امر مربوط به اثر مواد مورد استفاده در تهیه





**Fig 4** Turbidity of Fermented beverage enriched with free vitamin E, free vitamin C, vitamin C nanoliposome, vitamin E nanoliposome

### ۳-۶- نتایج تعیین ترکیب شیمیایی نوشیدنی

ترکیب شیمیایی نوشیدنی شاهد و نوشیدنی‌های غنی شده با نانولیپوزوم ویتامین E، نانولیپوزوم ویتامین C، ویتامین E آزاد، ویتامین C آزاد تعیین شد.

**Table 2** Chemical composition of beverage samples

Fermented beverage	Acidity (%acid lactic)	pH	Total soluble solid(%)	Ash (%)	Total phenol (mg GAE/ml)	Probiotic counts(log CFU/ml)	Acceptance
Control	0.35±0.03 <sup>a</sup>	5.2±0.01 <sup>a</sup>	7.43±0.1 <sup>c</sup>	0.34±0.02 <sup>a</sup>	30.0±0.2 <sup>c</sup>	9.1±0.1 <sup>a</sup>	3.78±0.3 <sup>a</sup>
Vitamin E Nano liposome	0.33±0.04 <sup>a</sup>	5.27±0.1 <sup>a</sup>	7.93±0.06 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>ab</sup>	42.20±0.5 <sup>a</sup>	9.6±0.5 <sup>a</sup>	3.6±0.4 <sup>a</sup>
Vitamin C Nano liposome	0.34±0.02 <sup>a</sup>	5.23±0.2 <sup>a</sup>	7.80±0.03 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>ab</sup>	41.63±1 <sup>a</sup>	9.2±0.2 <sup>a</sup>	4±0.2 <sup>a</sup>
Free Vitamin E	0.32±0.01 <sup>a</sup>	5.29±0.3 <sup>a</sup>	7.51±0.04 <sup>c</sup>	0.31±0.01 <sup>ab</sup>	36.17±0.4 <sup>b</sup>	9.5±0.2 <sup>a</sup>	3±0.3 <sup>b</sup>
Free Vitamin C	0.36±0.01 <sup>a</sup>	5.11±0.2 <sup>a</sup>	7.53±0.02 <sup>c</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	37.12±0.6 <sup>b</sup>	9.3±0.5 <sup>a</sup>	3.5±0.1 <sup>ab</sup>

Table data represent the average of three test ± standard deviations. The different letters in the columns indicate a significant difference between the data with a 95% probability.

نوشیدنی، مربوط باشد. بیشترین میزان مواد جامد محلول کل در نوشیدنی‌ها مربوط به نوشیدنی حامل ویتامین‌های کپسوله است در حالیکه کمترین میزان ماده جامد کل مربوط به نوشیدنی‌های حاوی ویتامین‌های آزاد و کنترل می‌باشد. با توجه به اینکه در لیپوزوم‌ها، گرایش ماده فعال درون پوشانی شده (ویتامین‌ها) به ترکیبات غیر هدف کمتر بوده و ماده فعال از بازدارنده‌ها و شرایط نامطلوب حفاظت می‌شود لذا این حقیقت نیز می‌تواند از دلایل بالابودن مواد جامد کل نوشیدنی‌های حاوی ویتامین‌های درون پوشانی شده در لیپوزوم‌ها در مقایسه با نوشیدنی‌های حاوی ویتامین آزاد باشد. کارایی کپسولاسیون شاخص مهم عملکرد نانوحامل‌ها در حفاظت از ترکیبات تغذیه‌ای و دارویی است (۱۴). با توجه به اینکه در این تحقیق

قابل پیش‌بینی است.

### ۳-۵- نتایج تعیین کدورت نوشیدنی

نتایج مربوط به ویژگی‌های نوری فرمولاسیون نوشیدنی بهینه حاوی نانولیپوزوم ویتامین E و یا C و اثر نانولیپوزوم ویتامین‌ها در ایجاد کدورت محلول‌های آبی، با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج ۶۰۰nm، نمونه رقیق شده در شکل (۴) نشان داده شده است.

همانگونه که نتایج اندیس پراکنش لیپوزوم‌های ویتامین C نشان داده بود این نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با نانولیپوزوم‌های ویتامین E دارای یکنواختی توزیع اندازه ذره‌ای کمتری بودند در نتیجه کدورت بالاتری نیز تولید خواهند کرد که نتایج حاصل از اندازه‌گیری کدورت محلول‌های حاوی لیپوزوم‌های ویتامین C نیز این امر را تایید می‌کند.

طبق نتایج بدست آمده، بالاترین درصد ماده جامد محلول کل مربوط به نوشیدنی حاوی ویتامین E کپسوله (۷/۹۳٪) بود و به ترتیب بعد از آن نوشیدنی حاوی ویتامین C کپسوله (۷/۸۰٪) دارای ماده جامد محلول کل بالاتری بود. نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی ویتامین E آزاد و ویتامین C آزاد در مقایسه با نمونه‌های حاوی لیپوزوم ویتامین E و C، دارای ماده جامد کل پایین‌تری بودند هر چند از نظر ماده جامد محلول کل بین نمونه کنترل و نمونه‌های حاوی ویتامین E آزاد و ویتامین C آزاد تفاوت معناداری مشاهده نشد. تفاوت بین میزان ماده خشک نوشیدنی کنترل و نوشیدنی‌های تولید شده با نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین انکپسوله می‌تواند به ماده جامد کل بکاررفته در ساختار لیپوزوم بکار رفته در فرمولاسیون

تهیه شده با نانولیپوزوم ویتامین‌ها و نمونه کنترل بالاتر از امتیاز پذیرش کلی نوشیدنی‌های حاوی ویتامین‌های آزاد بود. در این تحقیق از نظر ارزیابان حسی نوشیدنی‌های حاوی نانولیپوزوم ویتامین E و C نسبت به نوشیدنی‌های حاوی فرم آزاد این ویتامین‌ها مقبولیت بالاتری برخوردار بودند.

#### ۴- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق لیپوزوم‌های ویتامین E و ویتامین C به روش هیدراسیون لایه نازک تهیه و به نوشیدنی تخمیری بر پایه عدس/گندم سیاه افزوده شدند. کارایی انکپسولاسیون با روش HPLC تعیین شد. اندازه ذرات، پتانسیل زتا و مورفولوژی لیپوزوم‌های حاصل، بررسی شد. همچنین تاثیر نانولیپوزوم‌ها بر ترکیب شیمیایی، ویژگی‌های حسی و کدورت نوشیدنی تعیین شد. نتایج نشان داد لیپوزوم‌های حاوی ویتامین E دارای پتانسیل زتای  $-۶۷۲$  میلی ولت هستند که بیانگر نقش نیروی دافعه الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزوم‌ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم حامل ویتامین C،  $-28$  میلی ولت است. تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی عبوری، وجود ذرات کروی با اندازه نانومتری را در نانولیپوزوم‌ها نشان داد که تقریباً تأییدی بر نتایج بدست آمده از دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات بود. کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب  $۸۸/۵$  و  $۵۰$  درصد بوده است. متوسط قطر حجمی نانولیپوزوم ویتامین E و C به ترتیب  $۲۶۴$  نانومتر و  $۱۴۱/۲$  نانومتر بود. افزودن نانولیپوزوم‌های ویتامین به نوشیدنی تخمیری نه تنها هیچ اثر منفی بر ترکیب شیمیایی و پذیرش حسی نوشیدنی نداشت بلکه سبب افزایش محتوای فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن شد.

#### ۵- منابع

- [1] Izadi Kondazi, A., Zarringhalami, S., Ganjloo, A. 2017. Production of rice based functional fermented beverage contain honey natural sweetener. JFST No. 62, Vol. 14, 201-214.
- [2] Herrera-Ponce, A., Nevárez-Morillón, G., Ortega-Rivas, E., Pérez-Vega, S., & Salmerón, I. (2014). Fermentation adaptability of three probiotic L actobacillus

کارایی کپسولاسیون ویتامین E بالاتر از ویتامین C بود لذا بالاتر بودن میزان ماده جامد کل در نوشیدنی حاوی ویتامین E کپسوله در مقایسه با نوشیدنی حاوی ویتامین C کپسوله نیز قابل توجه می‌باشد. نتایج اندازه‌گیری اسیدیته و pH در نوشیدنی‌های تخمیری نشان داد که میزان اسیدیته و pH در نوشیدنی‌های تولید شده با نانولیپوزوم‌های ویتامین C و E و نوشیدنی‌های حاوی ویتامین‌های آزاد در مقایسه با نوشیدنی کنترل، از نظر آماری تفاوت معناداری نداشتند. بیشترین میزان خاکستر در نوشیدنی کنترل و کمترین میزان خاکستر در نوشیدنی حاوی ویتامین C آزاد مشاهده شد میزان خاکستر در این دو نمونه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با هم داشت ( $P < 0/05$ ). میزان خاکستر در نوشیدنی حاوی ویتامین E آزاد و نوشیدنی حاوی نانولیپوزوم ویتامین E و نوشیدنی حاوی نانولیپوزوم ویتامین C کمتر از نمونه کنترل و بیشتر از نمونه حاوی ویتامین C آزاد بود. نتایج اندازه‌گیری میزان فنل کل در نوشیدنی‌های تخمیری نشان داد میزان فنل کل در نوشیدنی تولید شده با نانولیپوزوم ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین C در مقایسه با سایر نوشیدنی‌های تخمیری بالاتر بود. بالاترین مقدار فنل در نوشیدنی تولید شده با نانولیپوزوم ویتامین E مشاهده شد. این نتیجه مربوط به این امر است که ویتامین E دارای ماهیت فنلی است. با توجه به اینکه لیپوزوم حاوی ویتامین C نیز نقش حفاظت ترکیبات فنلی را در نوشیدنی تخمیری دارد بدین ترتیب میزان فنل کل بالاتر مشاهده شده در نوشیدنی حاوی لیپوزوم ویتامین C نسبت به نمونه کنترل توجه می‌شود. کمترین میزان فنل در بین پنج نمونه نوشیدنی تخمیری تهیه شده، متعلق به نمونه کنترل بود. میزان فنل کل در نوشیدنی‌های حاوی ویتامین آزاد با هم تفاوت معنی‌داری نداشت و مقدار آن بیشتر از نوشیدنی کنترل و کمتر از نوشیدنی‌های حاوی نانولیپوزوم ویتامین E و نانولیپوزوم ویتامین C بود. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق بیشترین میزان محتوای ترکیبات فنلی مربوط به نوشیدنی تولید شده با نانولیپوزوم ویتامین E و C بود. این نتیجه احتمالاً مربوط به اثر محافظتی لیپوزوم‌ها از ویتامین‌ها می‌باشد. زنده‌مانی سلول‌های پروبیوتیک در نوشیدنی‌های تولید شده با ویتامین C و E آزاد همچنین نوشیدنی‌های حاوی نانولیپوزوم ویتامین C و E، در مقایسه با نوشیدنی کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. امتیاز پذیرش کلی نوشیدنی‌های

- to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food research international*, 44(9), 3039-3046.
- [13] Mousavi, M.-H., Gharekhani, M., Alirezalu, K., Roufegarinejad, L., & Azadmard-Damirchi, S. 2022. Production and characterization of nondairy gluten-free fermented beverage based on buckwheat and lentil. *Food Science & Nutrition*, 00, 1– 14. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3095>.
- [14] Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mohammadi, M., Akbarbaglu, Z., Pezeshki, A., & Heshmati, M. K. 2019. Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. *Food Hydrocolloids*, 96, 442-450.
- [15] Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., & 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.
- [16] Fatouros, D. G., & Antimisariis, S. G. 2002. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of colloid and interface science*, 251(2), 271-277.
- [17] Mohammadi M, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Rezayi Mokarram R, Mohammadifar MA. 2014. Physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8,4,175-188. [In Persian].
- [18] Mishra, S. 2014. Use of Nanotechnology and nanoscience in food packaging. *Int J Adv Sci Tech Res*, 4(1), 395-404.
- [19] Zakipour Rahimabadi N, Sohrabvandi S , Roozbeh Nasiraie L.2018. Production of Synbiotic Malt Beverage Using Inulin and Different Probiotic Strains of Lactobacillus Bacteria. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 13, 3, 39-46
- [20] Yépez, A., Russo, P., Spano, G., Khomenko, I., Biasioli, F., Capozzi, V., & Aznar, R. 2019. In situ riboflavin fortification of different kefir-like cereal-based beverages using selected Andean LAB strains. *Food microbiology*, 77, 61-68.
- strains to oat, germinated oat and malted oat substrates. *Letters in applied microbiology*, 59(4), 449-456.
- [3] Salmerón, I. (2017). Fermented cereal beverages: From probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. *Letters in applied microbiology*, 65(2), 114-124.
- [4] Imase, K., Tanaka, A., Tokunaga, K., Sugano, H., Ishida, H., & Takahashi, S. (2007). Lactobacillus reuteri tablets suppress Helicobacter pylori infection--a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 81(4), 387-393.
- [5] Hübner, F., & Arendt, E. K. (2013). Germination of cereal grains as a way to improve the nutritional value: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(8), 853-861.
- [6] Alonso-Miravalles, L., & O'Mahony, J. A. (2018). Composition, protein profile and rheological properties of pseudocereal-based protein-rich ingredients. *Foods*, 7(5), 73.
- [7] Starowicz, M., Koutsidis, G., & Zieliński, H. (2018). Sensory analysis and aroma compounds of buckwheat containing products—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(11), 1767-1779.
- [8] Amin, M. N., Hossain, M. A., & Roy, K. C. (2004). Effects of moisture content on some physical properties of lentil seeds. *Journal of Food Engineering*, 65(1), 83-87.
- [9] El-Adawy, T. A., Rahma, E. H., El-Bedawey, A. A., & El-Beltagy, A. E. (2003). Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 1-13.
- [10] Hatami, S., Tajabadi, N., Massoud, R., & Sharifan, A. (2021). Chemical and sensorial properties of probiotic beverage based on rice bran extract and honey. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-6.
- [11] Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P. P., & Dubey, N. K. 2018. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food control*, 89, 1-11.
- [12] Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V., & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative

- [26] Padamwar, M. N., & Pokharkar, V. B. (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *International journal of pharmaceutics*, 320(1-2), 37-44.
- [27] Das, S. and Chaudhury, A. 2011. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.*, 12(1):62-76.
- [28] Fatouros, D. G., & Antimisiaris, S. G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of colloid and interface science*, 251(2), 271-277.
- [29] Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. and Singh, H. 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *J. Sci. Food Agri.*, 86: 2038-2045.
- [30] Lacatusu, I., Badea, N., Ovidiu, O., Bojin, D. and Meghea, A. 2012. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *J. Nanopart. Res.*, 14:902-918.
- [21] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2007). *Fruit juices – Test methods*. 1st edition. ISIRI No. 2685. [In Persian].
- [22] Al-Saeedi, A. H., & Hossain, M. A. 2015. Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(4), 316-321.
- [23] Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit, P. 2009. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical development and technology*, 14(6), 665-671.
- [24] Hassan, A. A., Aly, M. M., & El-Hadidie, S. T. (2012). Production of cereal-based probiotic beverages. *World Applied Sciences Journal*, 19(10), 1367-1380.
- [25] Ghanbarzadeh, B., 2013. *Chemistry and physics of colloidal systems and food biopolymer solutions*. Sharif University of Technology Scientific Publishing Institute. Pages 20-40.



## Enrichment of buckwheat and lentil based fermented beverages with vitamin E and vitamin C Nano liposomes

Mousavi, M. <sup>1</sup>, Gharekhani, M. <sup>2\*</sup>, Alirezalou, K. <sup>3</sup>, Rofehgarinejad, L. <sup>2</sup>, Azadmard-Damirchi, S. <sup>4</sup>

1. PhD Student, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
4. Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

### ABSTRACT

Lecithin -based liposomes were studied as carriers of vitamins E and C to enrich lentil/buckwheat-based fermented beverages. Liposomes prepared by hydration method. Particle size and shape were analyzed by light scattering and scanning electron microscopy. The percentage of encapsulation efficiency of vitamins E and C was determined by HPLC method. The encapsulation efficiency of vitamin E and C nanoliposome's was 88.5% and 50%, respectively. The average volume diameter of vitamin C nanoliposomes was smaller than the average volume diameter of vitamin E nanoliposomes. The results showed that the produced liposomes are stable nanoliposomes with small size, low Polydispersity index and single-mode with high negative surface charge. Electron Microscopy Images showed nanometer-sized spherical nanoliposomes. Vitamin E nanoliposomes had higher turbidity compared to vitamin C nanoliposomes. Adding vitamin E and C nanoliposomes to the fermented beverage not only had no negative effect on the chemical composition and sensory acceptance of the drink, but also increased the total phenolic contents and antioxidant properties.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2022/ 06/ 06  
Accepted 2022/ 07/ 30

#### Keywords:

Fermented beverage,  
Nanoliposome,  
Vitamin E,  
Vitamin C.

DOI: 10.22034/FSCT.19.128.193  
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.128.21.6

\*Corresponding Author E-Mail:  
M.Gharekhani@iaut.ac.ir