



نانولیپوزوم ترکیبات آنتوسیانینی انجیر سیاه و کاربرد آن در نوشیدنی کامبوجا

عاطفه جامی^۱، بهرام فتحی آچاچلوئی^{۲*}، رضوان شاددل^۳

۱- عاطفه جامی، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی - دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی - دانشگاه محقق اردبیلی

۲- بهرام فتحی آچاچلوئی، استاد علوم و صنایع غذایی - دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی - دانشگاه محقق اردبیلی

۳- رضوان شاددل، دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی - دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی - دانشگاه محقق اردبیلی

چکیده

اطلاعات مقاله

آنتوسیانین‌ها از ترکیبات فعال زیستی هستند که رنگدانه اصلی بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات را شامل می‌شود. از آنجا که آنتوسیانین‌ها پایداری حرارتی پایینی در طی فرآوری مواد غذایی دارند، لذا استفاده از این ترکیبات به عنوان رنگدانه‌های طبیعی در غذاها با چالش‌هایی همراه است. بنابراین، ریزپوشانی ترکیبات آنتوسیانینی با لیپوزوم‌ها دارای اهمیت است. ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال با لیپوزوم‌ها، روشی موثر و کارآمد در افزایش پایداری ترکیبات پلی فنولی است. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های لیپیدهای قطبی هستند که در حلال‌های قطبی نظیر آب، ساختارهای دولاپه تشکیل می‌دهند. در این پژوهش، نانولیپوزوم‌ها در نسبت‌های ۱-۹، ۱-۸، ۲-۳ و ۶-۴ درصد وزنی-وزنی لسیترین-کلسترول، با استفاده از روش تزریق حلال، تهیه شدند. سپس آزمون‌های تعیین اندازه و پتانسیل زتا برای تعیین ویژگی‌های ذرات تولید شده صورت گرفت. میانگین اندازه ذرات (میانگین قطر هیدرودینامیکی) و توزیع اندازه ذرات برای نسبت‌های مختلف لسیترین-کلسترول، به ترتیب در محدوده ۷۴۰-۱۳۲ نانومتر و ۰.۴۷-۰.۴۱ قرار گرفتند. مقادیر پتانسیل زتا نیز در محدوده ۲۶- تا ۴۲- میلی ولت بدست آمد. پایداری نمونه لیپوزومی نسبت ۱-۹ لسیترین-کلسترول، از طریق محاسبه ی مقدار آزادسازی آنتوسیانین محصور شده در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های دارای نسبت ۱-۹ لسیترین-کلسترول در فرمولاسیون نوشیدنی کامبوجا استفاده شدند. نوشیدنی‌های تهیه شده از نظر ویژگی‌های حسی مورد ارزیابی قرار گرفتند که از نظر بو، احساس دهانی و پذیرش کلی تفاوت معنی‌داری در بین نمونه‌ها مشاهده نشد. نتایج بدست آمده در این پژوهش، نشان داد که نانولیپوزوم‌ها سیستم کارآمدی در درون پوشانی آنتوسیانین‌ها هستند.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲

کلمات کلیدی:

نانولیپوزوم،
عصاره انجیر سیاه،
آنتوسیانین‌ها،
نوشیدنی کامبوجا

DOI: 10.22034/FSCT.21.148.45.

مسئول مکاتبات: *

bahram1356@yahoo.com or
b_fathi@uma.ac.ir

۱- مقدمه

ترکیبات رنگی یکی از مهم‌ترین افزودنی‌های غذایی هستند که نقش تعیین‌کننده‌ای در پذیرش مواد غذایی از سوی مصرف‌کننده دارند و کیفیت، تازگی و ایمنی غذا را نشان می‌دهند. رنگ‌ها همچنین ارزش حسی و زیبایی ظاهری را نشان می‌دهند. بطوری که افزودن رنگ به غذا ظاهری جذاب و اشتها آور به آن می‌دهد [۱]. رنگ‌های مورد استفاده در صنعت مواد غذایی شامل رنگ‌های طبیعی و رنگ‌های سنتزی (مصنوعی) هستند. نگرانی‌های ناشی از مصرف رنگ‌های سنتزی اعم از کینولین زرد، کارموزین و تارترازین، به لحاظ مسایل بهداشتی و ایمنی و نیز محدودیت در حد مجاز مصرف، مصرف‌کنندگان مواد غذایی را به استفاده از رنگ‌های طبیعی مانند کاروتنوئیدها، کلروفیل، آنتوسیانین‌ها و بتالین در مواد غذایی ترغیب کرده است [۲]. بنابراین، استفاده از مواد مولد رنگ طبیعی مانند رنگ‌دانه‌های طبیعی موجود در گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شده است [۳]. آنتوسیانین‌ها یکی از رنگ‌های طبیعی هستند که به علت خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خود شناخته شده و در صنایع مختلف غذایی، دارویی و آرایشی به عنوان رنگ‌های طبیعی و یا برای عملکردهای بیولوژیکی خود استفاده می‌شوند. علاوه بر این‌ها، از کاربردهای آنتوسیانین‌ها می‌توان به استفاده از آن به عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی، حذف‌کننده‌ی طعم و همچنین محافظت از مواد غذایی در برابر تنش‌های محیطی در حین ذخیره‌سازی و حمل و نقل اشاره کرد [۴]. آنتوسیانین‌ها به علت داشتن رنگ‌های جذاب و همچنین داشتن حلالیت زیاد در آب به عنوان یکی از گزینه‌های ایده‌آل برای جایگزینی با رنگ‌های مصنوعی می‌باشند [۶،۵]. آنتوسیانین‌ها که به ترکیبات فنلی تعلق دارند، مولکول‌هایی هستند که مستقیماً با رنگ قرمز، آبی و بنفش مرتبط هستند [۸،۷]. از منابع اصلی آنتوسیانین‌ها می‌توان به میوه‌ها، انواع توت‌ها و برخی سبزیجات و همچنین گل‌ها اشاره کرد. انجیر سیاه حاوی مقادیر فراوانی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشد که مهم‌ترین

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند [۹]. آنتوسیانین‌های موجود در انجیر سیاه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند [۱۰]. این ترکیبات به دلیل داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌های عصبی، قلبی-عروقی، سرطان و التهاب دارند [۱۱،۱۲،۱۳،۱۴]. علیرغم مزایای مهم، آنتوسیانین‌ها به دلیل حساس بودن به اکسیداسیون، اپیمریزاسیون و پلیمریزاسیون، فاقد پایداری طولانی مدت هستند [۱۵،۷]. پیوندهای اشباع نشده در ساختار مولکولی آنتوسیانین‌ها، آن‌ها را به نور، گرما، تغییرات pH و فعالیت‌های آنزیمی، یون‌های فلزی و اکسیژن حساس می‌کند [۱۵،۷]. در طول فرآیند و ذخیره مواد غذایی، ثبات مولکول‌های آنتوسیانین ممکن است به راحتی تحت تأثیر این عوامل قرارگیرد [۱۶]. در نتیجه برای افزایش پایداری این ترکیبات لازم است که با پوشش دادن آن‌ها در داخل مواد دیواره مختلف ریزپوشانی شوند [۱۷،۸].

فرآیند ریزپوشانی یکی از مفیدترین فناوری‌هایی است که به وسیله آن مواد حساس درون یک پوشش یا دیواره بسته‌بندی می‌شوند [۱۵]. در این روش، ماده درونی در برابر شرایط محیطی نامطلوب مانند تأثیرات نور، رطوبت و اکسیژن حفظ می‌شود و مواد دیواره مانعی بین مواد درونی و محیط بیرونی ایجاد می‌کنند. از آنجایی که آنتوسیانین‌ها بسیار حساس و ناپایدار هستند، این روش با بهبود پایداری و زیست‌فراهمی ترکیبات آنتوسیانینی، آن‌ها را حفظ می‌کند [۱۸]. فرآیند ریزپوشانی به روش‌های مختلفی از جمله خشک‌کردن پاششی، خشک کردن انجمادی، پوشش‌دهی بسترسیال، اکستروژن و ... انجام می‌شود [۱۹]. در بین روش‌های مختلف ریزپوشانی، انکپسوله‌سازی در داخل نانولیپوزوم‌ها به عنوان یکی از روش‌های مناسب برای ریزپوشانی مواد زیست‌فعال از جمله ترکیبات آنتوسیانینی است که امروزه مورد استفاده قرار گرفته است [۲۰]. چشم‌انداز اصلی کاربردهای نانوتکنولوژی برای علوم غذایی بهبود خواص حسی، ایمنی و تقویت است. چنین هدفی را می‌توان با انکپسوله اجزای غذایی یا افزودنی‌ها، کنترل و رهاسازی مواد هسته و افزایش فراهمی زیستی اجزای غذایی تامین

۲- مواد و روش‌ها

لسیتین با نام تجاری ال-آلفا-لسیتین با درجه خلوص ۹۹ درصد از شرکت مرک آلمان، کلسترول و توین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، اتانول ۹۶٪ از شرکت طب هامون و نوشیدنی کامبوجا و انجیر وارسته *Ficus carica* از بازار تهیه شدند.

۲-۱- استخراج عصاره انجیر سیاه به کمک اولتراسوند

ابتدا میوه‌های تازه‌ی انجیر سیاه از بازار محلی تهیه شدند. انجیرها بعد از تمیز کردن، پوست‌گیری شده و به صورت ورقه‌های مسطح برش داده شدند و سپس در آون با دمای ۵۰°C به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب به دقت خرد و پودر شده و برای یکنواخت سازی از الک عبور داده شدند. پودر به دست آمده به منظور جلوگیری از نفوذ رطوبت در بسته‌های پلی اتیلنی و در دمای فریزر (۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند [۲۷]. ۱۰ گرم از پودر انجیر سیاه به نسبت ۱ به ۱۰ با حلال اتانول-آب (به نسبت ۷ به ۳) مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت امواج اولتراسوند با فرکانس ۳۷ کیلوهرتز در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند. محلول رویی توسط کاغذ صافی جدا شد و در ادامه عصاره حاوی حلال در سطح پلیت‌های شیشه‌ای پخش و به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از تبخیر حلال، عصاره‌ها تا رسیدن به وزن ثابت در دسیکاتور قرار گرفتند. عصاره‌های به دست آمده تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۲۸].

۲-۲- تعیین بازده استخراج

میزان بازده استخراج از تقسیم وزن عصاره خشک شده بر ماده اولیه بدست می‌آید [۴۷].

$$100 \times \frac{\text{وزن عصاره خشک شده (گرم)}}{\text{وزن کل انجیر (گرم)}} = (\%) \text{ بازده استخراج}$$

۲-۳- تعیین غلظت آنتوسیانین

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین با استفاده از روش تغییر pH انجام شد. در این روش جذب نمونه‌های تهیه شده

نمود. برخی از روش‌های آنکپسوله‌سازی که در بخش مواد غذایی به کار می‌روند بر اساس ماتریس‌های بیوپلیمری متشکل از کربوهیدراتها، پروتئین‌ها و لیپیدها هستند. افزودنی‌های واکنش‌پذیر، حساس یا فرار به عنوان مثال آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی، عوامل ضد میکروبی و اسیدهای چرب (امگا۳) و غیره را می‌توان در نانولیپوزوم‌ها آنکپسوله کرد [۲۱]. نانولیپوزوم‌ها ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی هستند که به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه‌ای تجمع پیدا می‌کنند. نانولیپوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات آبدوست را در هسته و ترکیبات آبگریز را در لایه لیپیدی به دام بیندازند و به دلیل سازگاری، زیست تخریب‌پذیری، توزیع یکنواخت مواد زیست فعال مانند آنتوسیانین‌ها نسبت به فرم آزاد آن، کاربردهای گسترده‌ای دارند [۲۲، ۲۳]. با توجه به اینکه در فرآیند آنکپسوله‌سازی، مواد دیواره یک عنصر کلیدی و مهم می‌باشد و باید دارای ویژگی‌هایی از جمله خوراکی بودن، قابلیت تجزیه بیولوژیکی و توانایی ایجاد سد بین فاز درونی و محیط اطراف آن باشد [۲۴]. بنابراین، انتخاب فسفولیپیدها به عنوان ترکیب دیواره نانولیپوزوم‌ها انتخابی مناسب و از نظر تغذیه و سلامتی بسیار مهم است. فسفولیپیدها مهم‌ترین ترکیب دیواره نانولیپوزوم‌ها می‌باشند که به صورت مولکول‌های آمفی‌فیلک هستند و از یک سر قطبی آبدوست به همراه دم آبگریز تشکیل شده‌اند [۲۵] که می‌توانند هر دو طیف ترکیبات آبدوست (در هسته داخلی) و آبگریز (در بین دو لایه لیپیدی) را حمل و به تدریج در مواد غذایی آزاد سازند. ریزپوشانی ترکیبات آنتوسیانینی در نانولیپوزوم‌ها می‌تواند با افزایش جذب و ماندگاری آن‌ها در سیستم هاضمه، به توسعه غذاهای فراسودمند کمک کند [۲۶]. هدف اصلی در این پژوهش ریزپوشانی ترکیبات آنتوسیانینی انجیر سیاه در درون نانولیپوزوم‌ها به منظور جلوگیری از تاثیر شرایط نامطلوب محیطی و حفظ آن‌ها در برابر این شرایط می‌باشد. هدف دیگر در پژوهش حاضر، استفاده از نانولیپوزوم‌های تولید شده در نوشیدنی کامبوجا به منظور بهبود خصوصیات ظاهری و ارتقای ارزش تغذیه‌ای آن بود.

کالیبراسیون آنتوسیانین رسم شد که برای تعیین غلظت آنتوسیانین از آن استفاده شد.

(رقت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ پی پی ام) با استفاده از بافر pH=۱ و pH=۴/۵ به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر بر حسب رنگدانه سیانیدین-۳-گلیکوزید اندازه‌گیری شد [۲۹]. طبق شکل ۱ منحنی

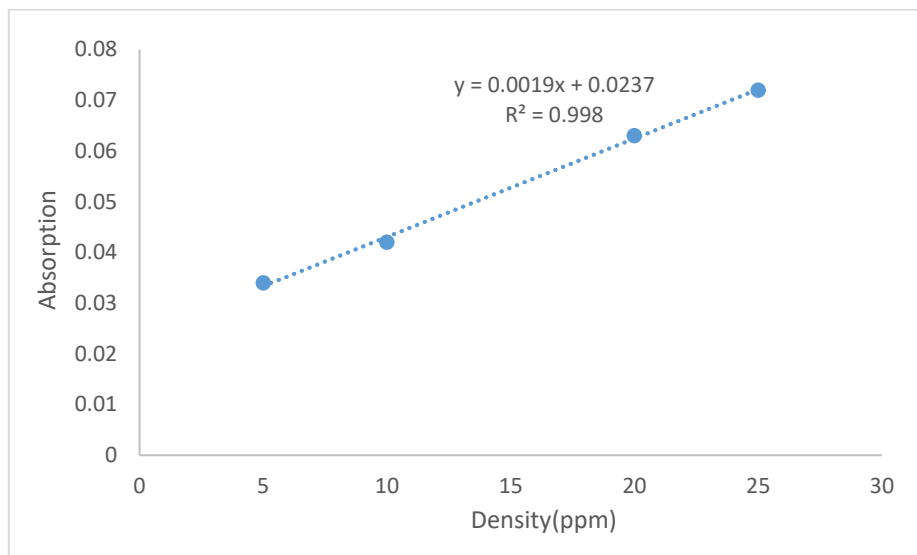


Figure 1: Calibration curve of anthocyanin

۲-۶- تعیین کارایی انکپسولاسیون

برای اندازه‌گیری تاثیر انکپسولاسیون در نانولیپوزوم‌های تهیه شده از روش همایون فال و همکاران (۲۰۲۱) استفاده شد. دو نمونه از نانولیپوزوم‌های حاوی آنتوسیانین انتخاب شدند یک نمونه برای اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین ریزپوشانی نشده و نمونه دیگر برای اندازه‌گیری غلظت کل آنتوسیانین در نانولیپوزوم‌های باردار حاوی آنتوسیانین. نمونه‌های لیپوزومی تهیه شده به مدت ۴۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و بعد از سانتریفیوژ دو فاز جداگانه تشکیل گردید. آنتوسیانین انکپسوله نشده در فاز بالا جمع شده و نانولیپوزوم‌های حاوی آنتوسیانین در فاز پایین تجمع پیدا کردند. به منظور حذف لسیترین که ممکن است در سانتریفیوژ جدا نشوند فاز بالایی را جدا کرده و با کلروفرم با نسبت ۱:۱ مخلوط شده و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ کردن فاز آبی بالا فقط

۲-۴- تهیه نانولیپوزوم‌ها

نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش تزریق اتانول تهیه شدند. به این منظور لسیترین در غلظت ۱۵ میلی‌مولار/ میلی‌لیتر و عصاره آنتوسیانینی در غلظت‌های مختلف در محلول اتانول حل شدند. سپس حدود ۱۰ میلی‌لیتر محلول اتانولی به آرامی به درون ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر تحت فرآیند هموژنیزاسیون با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه تزریق شد و سوسپانسیون لیپوزومی تهیه شده برای آنالیزهای بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید [۳۰]. برای تهیه نمونه شاهد نیز مراحل ذکر شده بدون افزودن عصاره آنتوسیانینی عینا انجام شد.

۲-۵- تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتا نمونه‌ها توسط دستگاه DLS مدل (ZEN3500, Malvern) Instruments, (Worcestershire, UK) در سه مرحله تکرار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد [۳۱].

مخلوط شده و از این مخلوط در طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوری در دامنه طول موج $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ برای نمونه ۱-۹ استفاده شد [۳۲]

۲-۸- آنالیز مورفولوژی (SEM)

برای ارزیابی تغییر سطوح و به عبارتی بررسی مورفولوژی نمونه ۹-۱۱ از دستگاه میکروسکوپ الکترونیکی روبشی انتشار میدانی (FE-SEM) مدل LE01430VP با بزرگنمایی ۵۰۰۰۰ استفاده شد.

۲-۹- پایداری نمونه آنتوسیانین نانولیپوزوم

پایداری نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. کارایی انکپسولاسیون هر ده روز یکبار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند [۲۰].

۲-۱۰- آماده سازی نوشیدنی

تیمارهای مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل نوشیدنی کامبوجا حاوی عصاره آنتوسیانینی کپسوله نشده انجیر سیاه در دو سطح ۴ و ۶ درصد وزنی-حجمی، نوشیدنی کامبوجا حاوی نانولیپوزوم عصاره آنتوسیانینی انجیر سیاه در دو سطح ۴ و ۶ درصد و نمونه شاهد بود (مطابق جدول ۱). از بین تیمارها، نمونه بهینه، به عبارتی نمونه 1-9 (نمونه ای که دارای ۰/۰۹ گرم لسیترین و ۰/۰۱ گرم کلسترول است) انتخاب شد و یک بار بصورت آزاد در دو سطح ۴ و ۶ درصد به نوشیدنی کامبوجا اضافه شد. بار دیگر بصورت نانو شده در دو سطح ۴ و ۶ درصد به نوشیدنی اضافه شده و مورد ارزیابی حسی، اندازه‌گیری رنگ، بریکس، pH، اسیدیته و هیگروسکوپی و انحلال پذیری قرار گرفت.

شامل آب و آنتوسیانین‌ها بود که آن هم یک بار با بافر کلرید پتاسیم و یک بار با بافر استات سدیم رقیق گردید و در نهایت غلظت آنتوسیانین مطابق رابطه زیر اندازه‌گیری و به عنوان آنتوسیانین‌های غیرکپسوله در نظر گرفته شد. برای محاسبه غلظت کل آنتوسیانین‌ها نیز نمونه دیگر مورد آنالیز قرار گرفت و نانولیپوزوم‌های حاوی آنتوسیانین از طریق مخلوط کردن با کلروفرم به نسبت ۱:۱ آنالیز و مراحل دیگر مشابه نمونه قبلی انجام شد و در نهایت غلظت کل آنتوسیانین در نمونه محاسبه گردید [۲۰].

$$= \text{غلظت آنتوسیانین (میلی گرم بر لیتر)}$$

$$= \frac{(A510 - A700)pH1 - (A510 - A700)pH4.5}{\varepsilon \times L} \times MW \times DF \times 1000$$

در این معادله A نشان‌دهنده جذب و ایندکس آن نشان‌دهنده طول موج است، MW وزن مولکولی سیانیدن-۳- گلوکوزید (۴۴۹/۲ گرم بر مول)، DF ضریب رقت، ε جذب مولی سیانیدن-۳- گلوکوزید (۲۶۷/۹۰۰) و L طول مسیر سل (۱ سانتی متر) را نشان می‌دهد. اندازه‌گیری‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد.

= کارایی انکپسولاسیون

$$= \frac{\text{غلظت آنتوسیانین غیرکپسوله با آزاد} - \text{غلظت آنتوسیانین کل}}{\text{غلظت آنتوسیانین کل}} \times 100$$

۲-۷- آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR)

برای آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ از دستگاه FTIR FTIR Spectroscopy RXI, Perkin Elmer مدل U.K by Licence U.S.A, استفاده شد. روش آماده‌سازی نمونه برای اندازه‌گیری با دستگاه FTIR به این صورت است که ترکیبات تشکیل‌دهنده نانولیپوزوم و پودر لیوفیلیزه شده نانولیپوزوم هر کدام با نسبت یک به ۱۰۰ با برومید پتاسیم

Table 1: Kombucha beverage formulation

Microencapsulated anthocyanin solution	Free anthocyanin solution	Kombucha beverage	Sample
-	-	100	Control sample

4	-	96	N4
-	4	96	F4
6	-	94	N6
-	6	94	F6

• The units are in milliliters

N4%: nanoliposomed sample at 4% level

N6%: nanoliposome sample at 6% level

F4%: free sample at 4% level

F6%: free sample at 6% level

۲-۱۴- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده گردید. آزمایشات بریکس، pH، اسیدیته کل، شاخص انحلال پذیری، هیگروسکوپی، رنگ و ارزیابی حسی در سه تکرار انجام شد و آزمایشات FTIR و SEM در یک مرحله و آزمون تعیین غلظت، پایداری، تعیین کارایی انکپسولاسیون و تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا و PDI در سه تکرار انجام گرفت و اطلاعات بدست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تحلیل شد. برای تعیین اختلاف بین میانگین نمونه‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < 0.05$) استفاده شد. کلیه آزمون‌های آماری با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان بازده استخراج

میزان بازده عصاره ی استخراج شده محاسبه شده برابر با مقدار ۰/۶۵٪ به ازای هر یک کیلوگرم انجیر سیاه بود. در تحقیقی که روی استخراج آنتوسیانین از سیب‌زمینی شیرین بنفش توسط اولتراسوند انجام گرفت، نتیجه بدست آمده این بود که یک روش استخراج کوتاه مدت در دماهای بالا ممکن است به استخراج آنتوسیانین‌هایی که نسبت به حرارت حساس هستند کمک کند. در حالی که روش‌های استخراج طولانی مدت در دماهای نسبتاً پایین به بازده کم آنتوسیانین منجر می‌شود [۳۴]. علت تفاوت در میزان آنتوسیانین در پژوهش‌های مختلف می‌تواند به ژنوتیپ، رنگ میوه و فصل باردهی میوه مربوطه باشد [۹].

۲-۱۱- اندازه‌گیری مقدار مواد جامد محلول (بریکس)

نوشیدنی

میزان مواد جامد محلول نوشیدنی توسط دستگاه رفراکتومتر مدل RA-500 KEM در دمای محیط در سه تکرار اندازه‌گیری گردید (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵).

۲-۱۲- تعیین pH نوشیدنی

مقدار pH نمونه‌ها با استفاده از pH متر مدل (Mettler Toledo، کانادا) در دمای اتاق در سه تکرار اندازه‌گیری شد (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵).

۲-۱۳- ارزیابی حسی

برای ارزیابی حسی نمونه‌های نوشیدنی کامبوچا غنی شده با عصاره ی آنتوسیانینی نانو شده و آزاد از ۱۰ نفر ارزیاب استفاده شد. نمونه‌ها در اختیار ارزیاب‌ها قرار داده شد و از آن‌ها خواسته شد تا با چشیدن و ارزیابی نمونه‌های کامبوچا حاوی نانولیپوزوم‌های آنتوسیانینی نظر خود را در مورد عطر، طعم، رنگ و پذیرش کلی آن بیان کنند و به نمونه‌های مختلف از ۱ تا ۵ امتیاز دهند (امتیاز ۱: کیفیت بسیار بد، ۲: ضعیف، ۳: متوسط، ۴: خوب، ۵: عالی) [۳۳]. لازم به ذکر است که اتانل استفاده شده در تهیه نانولیپوزوم قبل از ارزیابی حسی توسط اوپراتور تحت خلاء تبخیر شده بود.

۳-۲- تعیین اندازه ذرات

لیپوزومی با نسبت های مختلف لسیتین- کلسترول) در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج مربوط به ارزیابی اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات تیمارهای مختلف (نمونه های

Table 2: Particle size, particle size distribution and zeta potential of liposomal nano samples containing black fig anthocyanin.

Particle Dispersion Index (PDI)	Zeta potential	Particle size	Liposomal sample
0.41±0.06 ^a	26±7.81 ^b	132.6±17.78 ^c	9-1
0.36±0.09 ^a	36.3±5.73 ^a	260.6±24.58 ^b	8-2
0.43±0.05 ^a	33.66±1.52 ^{ab}	353±59.57 ^b	7-3
0.47±0.15 ^a	42.66±6.42 ^a	740.03±88.75 ^a	6-4

Different lowercase letters in each column indicate significant differences ($P < 0.05$).

همچنین در همین مطالعه، مقادیر PDI برای همه نمونه ها کمتر از ۰/۳ بود و از این نظر بین نمونه ها تفاوت معنی داری وجود نداشت. در این پژوهش پتانسیل زتا همه نمونه ها کمتر از ۴۲/۸۵- میلی ولت بود که نشان دهنده پایداری بالای سیستم ها است. بار منفی نانولیپوزومها در این مطالعه با فسفولیپیدهای آنیونی از جمله فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین در ساختار لسیتین کلزا مرتبط بود [۲۰]. در مطالعه ای که روی نانولیپوزومهای حاوی عصاره آنتوسیانینی کلم قرمز انجام شد، نتیجه حاصله نشان داد که اندازه ذرات نانولیپوزومها از ۳۷/۱۲ تا ۵۶/۱۱ نانومتر باپتانسیل زتا حدود ۳۹- میلی ولت متغیر بود [۳۶]. در مطالعه ای دیگر که روی انکپسوله سازی آنتوسیانینی در لیپوزومها انجام شد، نتیجه حاصله نشان داد که با افزایش غلظت آنتوسیانین، اندازه ذرات لیپوزوم به طور قابل توجهی از ۱۵۲۰ نانومتر به ۲۴۳ نانومتر کاهش یافت، در حالی که PDI به طور قابل توجهی از ۰/۲۴۱ به ۰/۳۴۲ افزایش یافت [۳۷]. همچنین در مطالعه ای دیگر الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) میانگین اندازه ذرات در اسید آسکوربیک نانولیپوزوم شده را بین ۱۰۳ تا ۱۳۶ نانومتر اندازه گیری کردند [۳۸]. این واقعیت ثابت شده است که اگر مقدار پتانسیل زتا نمونه ها بیشتر از ۳۰+ میلی ولت یا کمتر از ۳۰- میلی ولت باشد، به دلیل افزایش فعل و انفعالات دافعه، اعم از الکترواستاتیک، سیستم پایدار است و مستعد تجمع نیست [۲۰]. نمونه ی ۹-۱ به علت داشتن کوچکترین اندازه ذرات و نیز شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا قابل قبول، و

با توجه به جدول ۲، مشاهده می شود که تیمارهای آزمایشی از نظر اندازه ذرات و پتانسیل زتا تفاوت معنی داری ($P < 0.05$)

با یکدیگر داشتند و نمونه ی ۶-۴ دارای بزرگترین اندازه (۷۴۰/۰۳ نانومتر) و نمونه ی ۱-۹ به عنوان نمونه ی بهینه در نظر گرفته شد که دارای کوچکترین اندازه (۱۳۲/۶ نانومتر) ذره بود.

PDI اندازه گیری یکنواختی اندازه ذرات موجود در سوسپانسیون است. بنابراین مقدار آن می تواند منعکس کننده توزیع اندازه همگن و زیکولها باشد [۳۵] که از نظر شاخص پراکندگی ذرات تفاوت معنی داری بین نمونه ها مشاهده نشد ($P > 0.05$). از دیگر خصوصیات نانولیپوزومها، پتانسیل زتا است. پتانسیل زتا که معرف بار سطحی لیپوزومها می باشد، در واقع میزان دافعه بین نانوذرات باردار را نشان می دهد و نقش برجسته ای در پایداری و راندمان انکپسوله سازی دارد. در پژوهشی، همایون فال و همکاران (۲۰۲۱) میانگین اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا در عصاره ی نانولیپوزومی زرشک را بررسی کردند، نتیجه حاصله نشان داد که قطر هیدرودینامیکی نانولیپوزومهای اولیه ۱۴۰/۷۴ نانومتر بود و با افزایش غلظت آنتوسیانین، در نهایت اندازه ذرات به ۱۹۴/۶۷ نانومتر افزایش یافت. نتایج نشان داد که ترکیب انکپسوله شده، در اینجا عصاره زرشک، تأثیر مستقیمی بر اندازه ذرات سوسپانسیون کلوئیدی داشت.

ریزپوشانی برای نمونه‌ی ۹-۱ (نمونه بهینه) و سایر نسبت-های لسیترین-کلسترول به منظور بررسی اثر کلسترول در به دام اندازی ماده فعال، صورت گرفت. نتایج مربوط به بازده ریزپوشانی در شکل ۲ آورده شده است.

به عنوان نمونه‌ی دارای بهترین نسبت لسیترین-کلسترول برای آزمون‌های بعدی انتخاب گردید.

۳-۳- تعیین بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی از مشخصه‌های مهم نانولیپوزوم‌ها است که میزان ماده‌ی فعال به دام افتاده را نشان می‌دهد. بازده

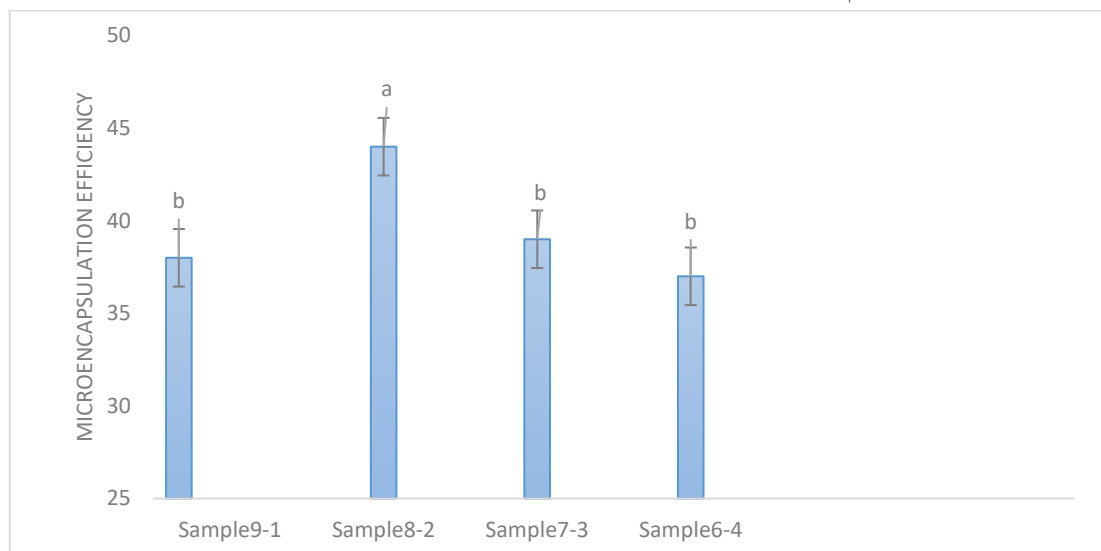


Figure 2: Measurement of nanoliposome microencapsulation efficiency of black fig anthocyanin compounds in samples 9-1, 8-2, 7-3 and 6-4 lecithin-cholesterol

می‌شود. در تحقیقی که توسط دمی‌رجی و همکارانش (۲۰۱۷) روی ترکیبات نانولیپوزومی انجام شد، نتیجه نشان داد که افزایش غلظت کلسترول لیپوزومی میزان کپسولاسیون مواد آبدوست را کاهش داده و میزان رهاسازی را افزایش داد. محققان در یک تحقیق دیگر نشان دادند که با افزایش مقدار کلسترول کارایی کپسولاسیون در نانولیپوزوم‌ها کاهش یافته است [۴۰]. در پژوهشی که روی نانولیپوزوم‌های حاوی پالمیتات ویتامین A انجام شد، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت لسیترین راندمان کپسولاسیون افزایش یافت [۳۹]. در مطابقت با نتیجه‌ی این تحقیق، نتایج یک تحقیق نشان داد که با افزایش مقادیر کلسترول بازده ریزپوشانی نایسین Z کاهش می‌یابد [۴۱]. همچنین الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که با افزایش مقدار فسفولیپید سویا، راندمان کپسولاسیون اسید آسکوربیک افزایش یافت [۳۸].

۳-۴- آزمون FTIR

طیف‌سنجی FTIR روشی مفید برای پایش تغییرات در

طبق نتایج آماری مشاهده می‌شود که نمونه‌های مورد آزمایش از نظر بازده ریزپوشانی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و فقط نمونه‌ی ۸-۲ لسیترین-کلسترول از نظر آماری با سایر نمونه‌ها تفاوت داشت. میزان بازده ریزپوشانی در نمونه‌های ۹-۱، ۸-۲، ۷-۳ و ۶-۴ به ترتیب ۳۸، ۴۴، ۳۹ و ۳۷ درصد بود. نتایج نشان می‌دهد که نمونه‌ی ۸-۲ بیشترین درصد ریزپوشانی را داشت که احتمالاً می‌تواند به دلیل مقدار بهینه‌ی کلسترول آن باشد، همچنین مشاهده شد که با افزایش مقادیر کلسترول، مقدار بازده ریزپوشانی کاهش می‌یابد. کلسترول به منظور کاهش نفوذپذیری غشای لیپیدی، سفت شدن غشاء و افزایش پایداری در غشاء در لایه لیپیدی وارد می‌شود. از این رو وجود کلسترول در غشاء لیپوزوم احتمالاً از پارگی و تغییر در غشای لیپوزوم جلوگیری می‌کند [۳۹]. پس می‌توان نتیجه گرفت با افزایش میزان کلسترول پایداری افزایش می‌یابد و میزان نشت مواد از دیواره کاهش می‌یابد و در نتیجه باعث افزایش درصد کپسولاسیون

گروه‌های عاملی مولکول‌ها است.

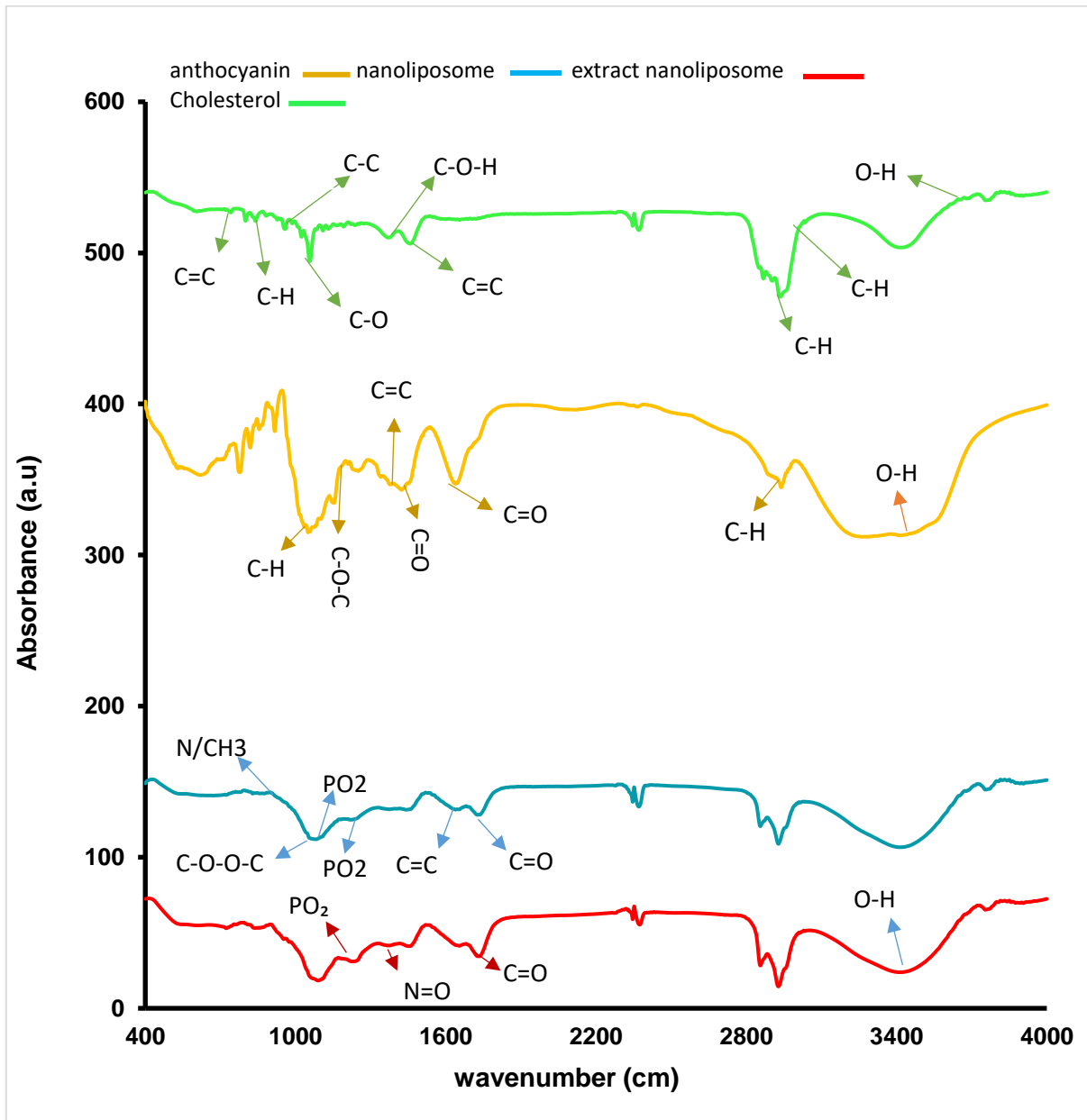


Figure 3: FTIR analysis results of anthocyanin, nanoliposome, extract nanoliposome and cholesterol

۳ مشاهده می شود، پیک های مختلفی در طیف های جذب مربوط به AC و لیپوزوم‌ها مشاهده می شود. برخی از پیک های مربوط به لیپوزوم و عصاره آنتوسیانین بدون تغییر باقی می مانند، در حالی که برخی از آنها دچار تغییراتی می شوند. موقعیت گروه کربونیل لیپیدها پس از اتصال به ترکیبات آنتوسیانین تغییر کرده و به عدد موج پایین تر رسید. اما گروه فسفات لیپیدها به عدد موج بالاتر تغییر کرد. پیک مربوط به 1740 cm^{-1} ارتعاشات کششی گروه های کربونیل استر فسفولیپیدها (C=O) را نشان می دهد. پیوندهای جذبی

در طیف FTIR عصاره آنتوسیانین (شکل ۳)، پیک های 1650 cm^{-1} تا 1800 cm^{-1} نشان دهنده وجود یک آروماتیک کننده هستند، در حالی که 1058 cm^{-1} به تبدیل حلقه آروماتیک C-H مرتبط است. جذب ناحیه 1156 cm^{-1} ناشی از لرزش استرهای C-O-C است. نوار در 1400 cm^{-1} مربوط به C-O 1428 cm^{-1} و 1648 cm^{-1} به ترتیب به گروه های C=C و C=O حلقه معطر اختصاص دارد. همچنین پهنای جذب در 3462 cm^{-1} مربوط به گروه O-H از ارتعاشات فنل و قند است [۴۲]. همانطور که در شکل

لسیتین بسیار الکتروفیل است و حاوی یک اوربیتال خالی است. این گروه یک پیوند داتیو ضعیف با جفت الکترون آزاد گروه OH در ساختار آنتوسیانین ها تشکیل می دهد. سپس به دلیل اثر رزونانس الکترون های حلقه بنزن، به طور موقت به یک پیوند ضعیف $N=O$ تبدیل می شود و یک پیک جدید در 1380 cm^{-1} ایجاد می کند [۴۲].

۳-۵- آنالیز مورفولوژی توسط میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM)

خصوصیات مورفولوژیکی میکروکپسول ها با نسبت ۱-۹ لسیتین-کلسترول، توسط میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM) نشان داده شده است (شکل ۴). ایجاد فرورفتگی ها بر روی برخی از میکروکپسول ها به تبخیر آب سریع و در نتیجه انقباض ذرات در طول فرآیند خشک کردن یا در حلال اعمال شده در طول آنالیز SEM نسبت داده شده است. کره های صاف برای پایداری مواد محصور شده و همچنین برای رهاسازی کنترل شده مطلوب هستند. این مفهوم یکی از اهداف اصلی ریز انکپسوله سازی مواد غذایی است زیرا می تواند کارایی افزودنی های غذایی را بهبود بخشد [۴۳].

متعلق به ارتعاشات کششی پیوندهای کربن-کربن مضاعف آلکن ها، $C=C$ در 1650 cm^{-1} شناسایی شد. ارتعاشات متقارن و نامتقارن PO_2^* در 1236 cm^{-1} و 1092 cm^{-1} آشکار شد. علاوه بر این، باند موجود در 1070 cm^{-1} به پیوندهای کششی متقارن و نامتقارن $CO-O-C$ و در نهایت، نوارهای 936 cm^{-1} ارتعاشات کششی نامتقارن $N(CH_3)_3$ را نشان می دهند. علاوه بر این، ظاهر منطقه مربوط به گروه های $O-H$ نیز تغییر می کند. محدودیت باندهای $O-H$ با ایجاد پیوندهای هیدروژنی همراه است. موج $OH\ AC$ در حضور لیپوزوم ها به اندازه 14 cm^{-1} به سمت اعداد موج پایین تر جابه جا شد. این ممکن است به دلیل شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه های OH آنتوسیانین ها (فنولیک و قند) و گروه های عاملی فسفولیپیدها (فسفات و کربوکسیل) باشد [۴۲]. موج 1740 cm^{-1} مرتبط با ارتعاشات $C=O$ است. تحت تاثیر حضور لیپیدها و انتقال به فرکانس های پایین تر نشان می دهد که گروه کربن موجود در حلقه C فنلی آنتوسیانین ها با مولکول های لیپیدی پیوند هیدروژنی ایجاد می کند. همانطور که مشاهده می شود، در 1380 cm^{-1} پیک جدیدی با شدت جذب کم در ساختار نانولیپوزوم های حاوی عصاره آنتوسیانین ایجاد می شود. این نوار جذب ممکن است به ارتعاشات کششی $N=O$ - تعلق داشته باشد. در واقع، گروه $N(CH_3)_3$ موجود در ساختار

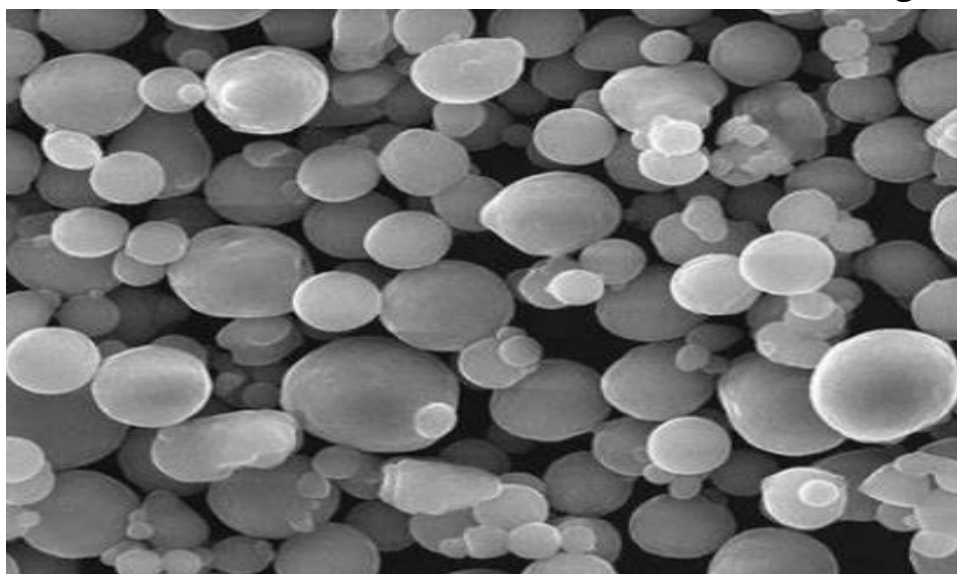


Figure 4: FESEM image for lecithin-cholesterol sample 1-9

۳-۶- تعیین میزان پایداری

طی دوره نگهداری ۶۰ روزه در شکل ۵ نشان داده شده است.

نتایج مربوط به ارزیابی پایداری نمونه‌های نانولیپوزومی

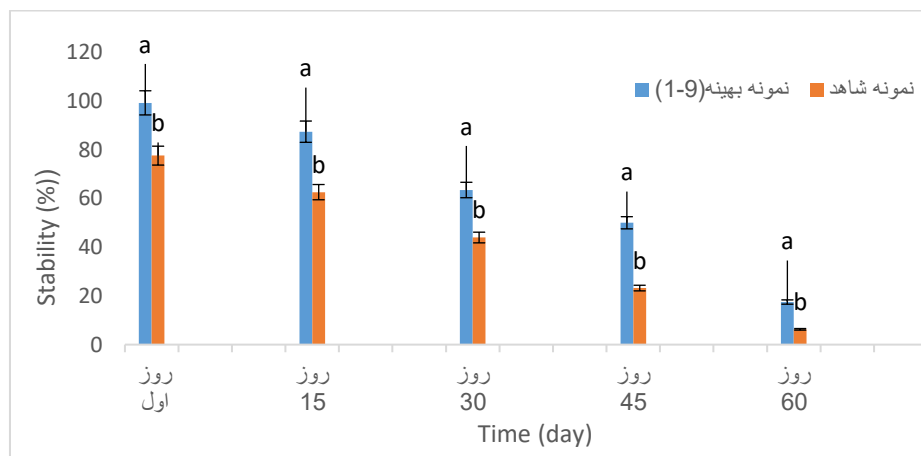


Figure 5: Determination of stability for lecithin-cholesterol sample 1-9

Different lowercase letters in each column indicate significant differences ($P < 0.05$)

پایداری خوبی را از خود نشان داد که به این واقعیت نسبت داده می‌شد که پایین بودن دما از تجزیه نانولیپوزوم‌ها جلوگیری می‌کند [۴۹].

چلندا و همکاران (۲۰۱۱) پایداری و قدرت لیپوزوم‌ها را برای نگهداری فلوکونازول (*fluconazole*) در طول یک ماه در یخچال (۹ درجه سانتیگراد)، اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) و دمای بالا (۴۵ درجه سانتیگراد) ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که لیپوزوم‌ها در دمای پایین تر پایدارتر و قوی تر هستند (نشتی کمتر از ۰.۵٪) و دماهای بالاتر باعث سیالیت بیشتر لایه های لیپیدی و نشت بیشتر فلوکونازول می‌شود [۵۰].

۳-۶- ویژگی‌های نوشیدنی حاوی عصاره ی آنتوسیانینی

ویژگی نوشیدنی‌های غنی شده با عصاره آنتوسیانینی (در سطوح ۴ و ۶ درصد بصورت نانو شده و آزاد و نمونه شاهد) مورد بررسی قرار گرفتند و مواد جامد محلول در آب (بریکس)، pH و خصوصیات حسی آنها ارزیابی شدند. همچنین برای اندازه‌گیری شاخص انحلال پذیری و هیگروسکوپیک، نوشیدنی‌ها خشک شده و پودر نوشیدنی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

طبق شکل ۵ مشاهده می‌شود که میزان پایداری نمونه‌های نانو شده در روزهای مختلف باهم تفاوت معنی داری داشتند. میزان پایداری در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰م به ترتیب: ۹۹/۳۳، ۸۷/۵، ۶۳/۵، ۵۰/۰۶ و ۱۷/۵ درصد بوده و رفته رفته گذشت زمان باعث کاهش میزان پایداری می‌شود، که نشان دهنده این است مواد از دیواره‌های لیپوزومی به بیرون نشت کرده اند و طی دوماه نگهداری میزان پایداری از ۹۹/۳۳ درصد به ۱۷/۵ درصد رسیده است که می‌تواند به علت تخریب دیواره لیپوزوم‌ها باشد. افزودن کلسترول به فرمول لیپوزوم نیز باعث کاهش نفوذپذیری غشای لیپوزوم می‌شود. بنابراین، مواد به دام افتاده نمی‌توانند به راحتی نشت کنند. در پژوهشی محمدی و همکاران (۲۰۱۴) پایداری ترکیبات نانولیپوزومی ویتامین D3 راطی دوماه در ۴ درجه سانتی‌گراد بررسی کردند و نتیجه گرفتند که براساس ماهیت چربی دوستی مواد به دام افتاده، تخریب رخ نمیدهد و مواد پایداری خوبی را طی دوره نگهداری از خود نشان دادند [۴۸]. در تحقیقی پایداری ذخیره سازی نانولیپوزوم‌های کورکومین توسط چن و همکاران (۲۰۱۵) (مورد بررسی قرار گرفت. نانولیپوزوم‌های کورکومین هنگامی که در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند،

۳-۶-۱- مواد جامد محلول در آب

آب افزایش یافته و باعث افزایش در میزان بریکس می‌شود. در تحقیقی که بر روی چای کامبوجای آماده شده با چای های گیاهی مختلف انجام گرفت، نتایج نشان داد که نسبت بریکس در ابتدای تخمیر و پس از آن در تمام ارقام چای تفاوت داشتند، به طوری که در ابتدای فرایند تخمیر کمترین مقدار بریکس در چای سبز و بیشترین مقدار بریکس در چای نعناع مشاهده شد و پس از تخمیر مقادیر بریکس در تمام نمونه‌های چای تفاوت معنی داری داشته و کمترین مقدار بریکس در چای سیاه و بیشترین مقدار بریکس در چای مریم گلی مشاهده شد [۴۴].

نتایج مربوط به اندازه‌گیری بریکس در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نوشیدنی حاوی عصاره نانوپوشینه شده در سطح ۶ درصد دارای کمترین میزان بریکس بوده است و نمونه ی نانو نشده در سطح ۶ درصد دارای بیشترین میزان بریکس بوده است. این امر نشان می‌دهد با افزایش میزان لیپوزوم، میزان مواد جامد نا محلول در آب نیز افزایش می یابد و در نمونه های آزاد به دلیل محلول بودن آنتوسیانین در آب میزان مواد جامد محلول در

Table 3: Brix level of Kombucha beverage containing nano- and non-nano encapsulated anthocyanin extract at two levels of 4 and 6 %

Brix	Sample
5.56±0.20 ^a	Control sample
4.43±0.40 ^b	F4%
5.3±0.3 ^a	F6%
4.06±0.11 ^b	N4%
3.23±0.32 ^c	N6%

Different lowercase letters in each column indicate significant differences (P<0.05).

N4%: nanoliposomed sample at 4% level

N6%: nanoliposome sample at 6% level

F4%: free sample at 4% level

F6%: free sample at 6% level

شده نشان داد که کمترین مقدار pH در نمونه چای سیاه و بیشترین مقدار pH در چای مریم گلی بود و مقدار pH تمام نمونه‌ها پس از تخمیر کاهش یافته و کمترین مقدار pH در چای سیاه و بیشترین مقدار pH در چای مریم گلی مشاهده شد [۴۴]. در پژوهشی دیگر که مقدار pH نوشیدنی کامبوجا در طول دوره ی تخمیر مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان تخمیر مقادیر pH کاهش یافت، اما محتوای اسیدیتته‌ی کل (برحسب اسید استیک) افزایش یافت [۴۵].

۳-۶-۲- اندازه‌گیری pH

نتایج مربوط به مقادیر pH در جدول ۴ گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، تیمارهای مختلف از نظر میزان pH تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. در پژوهشی چای کامبوجا با استفاده از چند عصاره مختلف چای تهیه شد، عصاره های چای مورد استفاده به ترتیب: چای سیاه، چای سبز، چای مریم گلی و نعناع بودند. این نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز در معرض تخمیر قرار گرفتند، مقدار pH اندازه گیری

Table 4: The pH level of Kombucha beverage containing Nanoencapsulated and Non- nanoencapsulated anthocyanin extract at two levels of 4 and 6%

pH	Sample
3±0.005 ^a	Control sample
3.13±0.11 ^a	N4%

3.20± 0.10 ^a	N6%
3.03± 0.05 ^a	F4%
3.06 ±0.05 ^a	F6%

Different lowercase letters in each column indicate significant differences (P<0.05).

N4%: nanoliposomed sample at 4% level

N6%: nanoliposome sample at 6% level

F4%: free sample at 4% level

F6%: free sample at 6% level

از پارامترهای رنگ، بو، طعم، احساس دهانی و پذیرش کلی استفاده شد. تفاوت معنی داری بین نمونه‌ها از نظر رنگ و طعم مشاهده شد. از نظر رنگ نمونه F۶٪ بیشترین امتیاز را داشت و از نظر طعم نمونه شاهد دارای بیشترین امتیاز بود. همچنین از نظر بو، احساس دهانی و پذیرش کلی تفاوت معنی داری بین نمونه‌ها مشاهده نشد.

در تحقیقی که روی چای کامبوچا در چند رقم عصاره مختلف انجام شد، نتایج نشان داد که از نظر طعم، چای نعنای بیشترین امتیاز را به خود اختصاص داد، در حالی که در ارزیابی بویایی، چای نعنای بیشترین امتیاز و چای سیاه کمترین امتیاز را کسب کردند. در ارزیابی رنگ نیز مانند ارزیابی بویایی، چای نعنای بالاترین امتیاز را به خود اختصاص داد و چای لیندن کمترین امتیاز را به خود اختصاص داد. با در نظر گرفتن تمام پارامترها در ارزیابی‌های حسی، مشاهده شد که چای نعنای بالاترین امتیاز و چای لیندن کمترین امتیاز را دارد [۴۴].

در یک تحقیق میزان تغییرات pH نوشیدنی کامبوچا در طول دوره تخمیر مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه نشان داد که pH چای کامبوچا با زمان تخمیر کاهش یافت. در عرض ۳ روز از تخمیر با توجه به افزایش غلظت اسیدهای آلی تولید شده در طی فرآیند تخمیر، مقدار pH از ۵ به ۳ کاهش یافت [۴۶]. در پژوهشی دیگر میزان pH نوشیدنی کامبوچا با طعم چای سیاه ۲/۳۷ و مقدار pH در نوشیدنی کامبوچا با طعم مریم گلی ۳/۲۵ مشاهده شد که دلیل آن به خاطر اسیدهای آلی حاصل از تخمیری که با استفاده از چای سیاه و قند ساکارز تولید شده، مرتبط بود [۴۴].

۳-۶-۳- ارزیابی حسی

نتایج مربوط به ارزیابی حسی نمونه‌های نوشیدنی کامبوچا حاوی عصاره‌ی آزاد ریزپوشانی شده در جدول ۵ نشان داده شده است. در ارزیابی حسی نمونه‌های کامبوچا

Table 5: Sensory evaluation of nanoencapsulated and free kombucha beverage samples at 4 and 6%

General acceptance	mouthfeel	taste	Smell	Color	Treatments
3.5±0.52 ^a	3.3±0.67 ^a	3.5±0.84 ^b	3.5±0.70 ^a	4.5±0.52 ^a	F6%
3.6±0.51 ^a	3.2±0.63 ^a	3.6±0.51 ^b	3.5±0.52 ^a	3.6±0.51 ^b	F4%
3.5±0.97 ^a	3.1±0.56 ^a	3.6±0.69 ^b	3.4±0.84 ^a	3.9±0.31 ^b	N6%
3.6±0.51 ^a	3.2±0.63 ^a	3.9±0.31 ^b	3.3±0.94 ^a	3.8±0.63 ^b	N4%
3.4±0.69 ^a	3.2±0.63 ^a	4.9±0.31 ^a	3.3±0.94 ^a	3.9±0.31 ^b	control

Different lowercase letters in each column indicate a significant difference (P<0.05).

N4%: nanoliposomed sample at 4%

N6%: nanoliposome sample at 6%

F4%: free sample at 4%

F6%: free sample at 6%

طبق نتایج بدست آمده در این پژوهش به طور کلی اندازه ذرات نانوپوشینه شده در محدوده ۷۴۰-۱۳۰ نانومتر بود. همچنین شاخص پراکندگی در محدوده ی

۴- نتیجه گیری

حاصل از DLS مطابقت داشت. همچنین نمونه‌های نوشیدنی آماده شده مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که از بین فاکتورهای مورد بررسی طعم نمونه‌ی شاهد و همچنین رنگ نمونه‌ی نانوشده در سطح ۶ درصد بیشترین مقبولیت را داشتند. این تحقیق نشان داد که بارگذاری آنتوسیانین درون نانولیپوزوم در افزایش پایداری و رنگ این ترکیب باموفقیت همراه بوده و می‌توان در سطح تجاری از آن استفاده نمود.

۰/۳۶ تا ۰/۴۷ و پتانسیل زتا بین ۲۶- mV الی ۴۲/۶۶ - بود. افزایش مقادیر کلسترول اثر نامطلوبی را بر اندازه ذرات و همچنین بازده ریز پوشانی داشت. بطوری که باعث افزایش اندازه ذره و کاهش بازده ریز پوشانی شد. نتایج FTIR نشان دهنده‌ی بارگذاری موفق عصاره آنتوسیانینی در لیپوزوم‌ها بود. همچنین نتایج آنالیز تصاویر FESEM نشان داد که اندازه ذرات در محدوده نانو قرار داشته و ذرات دچار پدیده توده‌ای شدن نشده‌اند و نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی با نتایج

۵- منابع

- [1] Al-Shurait, E. A., & Al-Ali, R. M. (2022). Optimal conditions for anthocyanins extracting from some food wastes. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 503-512.
- [2] Selim, K., Tsimidou, M., & Biliaderis, C. (2000). Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chemistry*, 71(2), 199-206.
- [3] Sharaie, P., Parveen, Ain Afshar, Kamali, Azadeh, & Nazam. (2014). The effect of the type and concentration of wall materials on the microcoating of color compounds of saffron extract using freeze drying. *Engineering Research of Irrigation and Drainage Structures*, 15(1), 25-38
- [4] Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M. I., & Clément, C. (2020). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnology advances*, 43, 107600.
- [5] Arroyo-Maya, I. J., & McClements, D. J. (2015). Biopolymer nanoparticles as potential delivery systems for anthocyanins: Fabrication and properties. *Food research international*, 69, 1-8.
- [6] Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2018). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1800-1810.
- [7] Buchweitz, M., Speth, M., Kammerer, D., & Carle, R. (2013). Impact of pectin type on the storage stability of black currant (*Ribes nigrum* L.) anthocyanins in pectic model solutions. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1168-1178.
- [8] Souza, V. (2015). De; Thomazini, M.; Balieiro, JC; de, C.; Fávoro-Trindade, CS Effect of Spray Drying on the Physicochemical Properties and Color Stability of the Powdered Pigment Obtained from Vinification Byproducts of the Bordo Grape (*Vitis Labrusca*). *Food Bioprod. Process*, 93, 39-50.
- [9] Moradkhani (2020). Investigating the phytochemical characteristics of the fruit of three genotypes of *L. Ficus carica* plant in Khoy city. *Ecophytochemistry of medicinal plants*, 8(2), 30-44
- [10] Kikha, Z., Seifi, A., Varasteh, F., Faryal, & Ghasemnejad. (2015). Investigating some morphological and phytochemical traits in different stages of growth and fruit development in three genotypes of *Ficus carica*. *Ecophytochemistry of medicinal plants*, 35-42.
- [11] He, J., & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1, 163-187.
- [12] Kruger, M. J., Davies, N., Myburgh, K. H., & Lecour, S. (2014). Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food research international*, 59, 41-52.
- [13] Rezaei, A., Varshosaz, J., Fesharaki, M., Farhang, A., & Jafari, S. M. (2019). Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges. *International journal of nanomedicine*, 4589-4599.

- [14] Moser, P., Souza, R. T. D., & Nicoletti Telis, V. R. (2017). Spray drying of grape juice from hybrid cv. BRS Violeta: microencapsulation of anthocyanins using protein/maltodextrin blends as drying aids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12852.
- [15] Bakowska-Barczak, A. M., & Kolodziejczyk, P. P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial crops and products*, 34(2), 1301-1309.
- [16] Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical engineering journal*, 14(3), 217-225.
- [17] He, B., Zhang, L.-L., Yue, X.-Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.-L., & Yue, P.-X. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70-76.
- [18] Khazaei, K. M., Jafari, S., Ghorbani, M., & Kakhki, A. H. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate polymers*, 105, 57-62.
- [19] Pérez-Masiá, R., López-Nicolás, R., Periago, M. J., Ros, G., Lagaron, J. M., & López-Rubio, A. (2015). Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. *Food Chemistry*, 168, 124-133.
- [20] Homayoonfal, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2021). Encapsulation of berberis vulgaris anthocyanins into nanoliposome composed of rapeseed lecithin: A comprehensive study on physicochemical characteristics and biocompatibility. *Foods*, 10(3), 492.
- [21] Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., & Omri, A. (2018). Process variables and design of experiments in liposome and nanoliposome research. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(4), 324-344.
- [22] Hasan, M., Messaoud, G. B., Michaux, F., Tamayol, A., Kahn, C. J., Belhaj, N., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2016). Chitosan-coated liposomes encapsulating curcumin: Study of lipid-polysaccharide interactions and nanovesicle behavior. *RSC advances*, 6(51), 45290-45304.
- [23] Reza Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, 18(4), 309-327.
- [24] Mahdi, A. A., Mohammed, J. K., Al-Ansi, W., Ghaleb, A. D., Al-Maqtari, Q. A., Ma, M., Ahmed, M. I., & Wang, H. (2020). Microencapsulation of fingered citron extract with gum arabic, modified starch, whey protein, and maltodextrin using spray drying. *International journal of biological macromolecules*, 152, 1125-1134.
- [25] Bryła, A., Lewandowicz, G., & Juzwa, W. (2015). Encapsulation of elderberry extract into phospholipid nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 167, 189-195.
- [26] Emami, S., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S. H., Valizadeh, H., & Hesari, J. (2016). Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(9), 737-759.
- [27] Lee, P. S., Yim, S. G., Choi, Y., Ha, T. V. A., & Ko, S. (2012). Physicochemical properties and prolonged release behaviours of chitosan-denatured β -lactoglobulin microcapsules for potential food applications. *Food Chemistry*, 134(2), 992-998.
- [28] Delfanian, M., Esmailzadeh Kenari, R., & Sahari, M. A. (2016). Utilization of Jujube fruit (*Ziziphus mauritiana* Lam.) extracts as natural antioxidants in stability of frying oil. *International Journal of Food Properties*, 19(4), 789-801.
- [29] Sepeharifar, Roshank, & Hassanlou. (2010). Investigation of polyphenol compounds, anthocyanins and total flavonoids and antioxidant properties of the medicinal plant-of Qaraqat (*Vaccinium arctostaphylos* L.) collected from four different regions of Iran. *Scientific Research Quarterly Journal of Medicinal Plants*, 9(33), 66-74.
- [30] Zou, L.Q., Liu, W., Liu, W.L., Liang, R.H., Li, T., Liu, C.M., Cao, Y.L., Niu, J. and Liu, Z., (2014). Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), pp.934-941.
- [31] Yuan, L., Geng, L., Ge, L., Yu, P., Duan, X., Chen, J., & Chang, Y. (2013). Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *International journal of pharmaceutics*, 454(1), 82-89.
- [32] Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(1), 3.
- [33] Hamidi, M., Pirozifard, M. K., Alizadeh Khaledabad, M., & Almasi, H. (2018).

- Nano-Liposome of Grape Seed Extract with a New Formulation and its Application in the Dough. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 6(4), 403-412.
- [34] Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., Jing, P., & Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, 197, 266-272.
- [35] Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146-152.
- [36] Ghareaghajlou, N., Hallaj-Nezhadi, S., & Ghasempour, Z. (2022). Nano-liposomal system based on lyophilization of monophasic solution technique for encapsulating anthocyanin-rich extract from red cabbage. *Dyes and Pigments*, 202, 110263.
- [37] Zhao, L., Temelli, F., & Chen, L. (2017). Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations. *Journal of Functional Foods*, 34, 159-167.
- [38] Alexander, M., Lopez, A. A., Fang, Y., & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *Lwt*, 47(2), 427-436.
- [39] Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food bioscience*, 13, 49-55.
- [40] Demirci, M., Caglar, M. Y., Cakir, B., & Gülseren, İ. (2017). Encapsulation by nanoliposomes. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*, 74-113.
- [41] Bochicchio, S., Barba, A. A., Grassi, G., & Lamberti, G. (2016). Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 9-16.
- [42] Homayoonfal, M., Mousavi, M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2022). Modifying the Stability and Surface Characteristic of Anthocyanin Compounds Incorporated in the Nanoliposome by Chitosan Biopolymer. *Pharmaceutics*, 14(8), 1622.
- [43] Osorio, C., Acevedo, B., Hillebrand, S., Carriazo, J., Winterhalter, P., & Morales, A. L. (2010). Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6977-6985.
- [44] Kayisoglu, S., & Coskun, F. (2020). Determination of physical and chemical properties of kombucha teas prepared with different herbal teas. *Food Science and Technology*, 41, 393-397.
- [45] Zhao, Z.-j., Sui, Y.-c., Wu, H.-w., Zhou, C.-b., Hu, X.-c., & Zhang, J. (2018). Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 732-741.
- [46] Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392-398.
- [47] Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O., & Stoia, M. (2013). Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*, 60(2), 383-389.
- [48] Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 2), 569.
- [49] Chen, X., Zou, L.-Q., Niu, J., Liu, W., Peng, S.-F., & Liu, C.-M. (2015). The stability, sustained release and cellular antioxidant activity of curcumin nanoliposomes. *Molecules*, 20(8), 14293-14311.
- [50] Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5(27), 1-9.



Nanoliposome of black fig Anthocyanins and its application in kombucha beverage

Jami, A. ¹, Fathi-Achachlouei, B. ^{2*}, Shaddel, R. ³

1. MSc student, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Professor, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3. Associate Professor, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/6/10
Accepted: 2024/1/22

Keywords:

Nanoliposome,
Black fig extract,
Anthocyanins,
Kombucha beverage

DOI: [10.22034/FSCT.21.148.45](https://doi.org/10.22034/FSCT.21.148.45).

*Corresponding Author E-Mail:
bahram1356@yahoo.com
or
b_fathi@uma.ac.ir

ABSTRACT

Anthocyanin is one of the bioactive compounds, which is the main pigment of many fruits and vegetables. Since anthocyanins have low thermal stability during food processing, the use of these compounds as natural pigments in foods is associated with challenges. Therefore, microencapsulation of anthocyanin compounds with liposomes is important. Nanoencapsulation of bioactive compounds with liposomes is an effective and efficient way to increase the stability of polyphenolic compounds. Liposomes are polar lipid vesicles that form bilayer structures in polar solvents such as water. In this research, nanoliposomes in ratios of 9-1, 8-2, 7-3 and 6-4 lecithin-cholesterol were prepared using the solvent injection method. Then, the size and zeta potential tests were conducted to determine the characteristics of the produced particles. The average particle size (average hydrodynamic diameter) and particle size distribution for different lecithin-cholesterol ratios were in the range of 132-740 nm and 0.47-0.41, respectively. Zeta potential values were also obtained in the range of -26 to -42 mv. After determining the efficiency of Nanoencapsulation, FTIR test was performed to investigate possible reactions between anthocyanins and nanoliposome wall materials. The morphology of anthocyanin-loaded lecithin-cholesterol nanoliposomes with a ratio of 9-1 was shown by scanning electron microscopy (SEM). The stability of the liposomal sample with a ratio of 9-1 lecithin-cholesterol was evaluated by calculating the amount of release of encapsulated anthocyanin during 60 days of storage at ambient temperature. Samples with 9-1 lecithin-cholesterol ratio were used in Kombucha beverage formulation. Sensory properties of prepared beverages were evaluated which the results showed among the samples, smell, mouthfeel and overall acceptance parameters had no significant difference ($P>0.05$). The results obtained in this research showed that nanoliposomes are an efficient system for encapsulating of anthocyanins