



مقاله علمی-پژوهشی

بهینه سازی عصاره کاکل ذرت نانو ریزپوشانی شده به روش سطح پاسخ و ارزیابی خواص ریزپوشینه های حاوی

عصاره پایدار شده با صمغ دانه ریحان و ایزوله پروتئین کنجد

ذاکر آفاکشی پور^۱، زینب رفتنی امیری^{۲*}، رضا اسماعیل زاده کناری^۲

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

ساری، ساری، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

ساری، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در این مطالعه از صمغ دانه ریحان (BSG) بصورت منفرد و در ترکیب با ایزوله پروتئین کنجد (SPI) به نسبت های ۱:۰ و ۱:۱ به منظور انکپسوله کردن عصاره کاکل ذرت (CTE) با استفاده از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی استفاده شد. همچنین به منظور بهینه سازی و بررسی اثر متغیرهای غلظت عصاره کاکل و زمان هموژنیزاسیون بر پاسخ اندازه ذرات و راندمان از معادله درجه دوم استفاده شد. در ابتدا محتوای فنلی کل (TPC)، محتوای فلاونوئید کل (TFC)، فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضد میکروبی عصاره کاکل ذرت بررسی شد. علاوه بر این، فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH & FRAP) اندازه گیری شده، پتانسیل بسیار بالایی از این ترکیبات (FRAP=۲۸۸/۱۱، DPPH=۸۵/۰۵) را برای انکپسوله کردن نشان داد. محتوای فنل کل و فلاونوئید حاصل از نتایج آزمون به ترتیب ۱۹۶۸/۲۳ و ۱۳۴۶/۲۰ بود. نتایج حاصل از آنالیز نشان داد نانو ذرات حاصل از ریزپوشانی توسط صمغ دانه ریحان کمترین اندازه ذرات (۴۹۴/۴nm) را داشتند. همچنین بیشترین کارایی درون پوشانی (۷۶/۲ درصد) نیز متعلق به نمونه ریزپوشانی شده با صمغ دانه ریحان بود. مقدار پتانسیل زتا در استفاده از پوشش ترکیبی افزایش (۴۴/۵۷) یافت و به بالاترین مقدار خود رسید. در طی نگهداری نانوامولسیون های ریزپوشانی در بازه زمانی صفر، ۲۱، ۱۵، ۷، ۳ روز، با گذشت زمان پایداری نانوامولسیون ها کاهش یافت به نحوی که بالاترین پایداری مربوط به عصاره نانو ریزپوشانی شده در پوشش ترکیبی (۹۴/۸۵ برای روز صفر و ۳۳/۸ برای روز ۲۱) را به خود اختصاص داد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ریزپوشانی عصاره کاکل ذرت با صمغ دانه ریحان کارایی بیشتری از پوشش ترکیبی دارد اما با بررسی سایر پارامترها مانند پایداری، پیشنهاد می گردد این صمغ در ترکیب با سایر مواد دیواره از جمله ایزوله پروتئین کنجد مورد استفاده قرار گیرد تا نتایج مطلوب حاصل شود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۷	
کلمات کلیدی:	
عصاره کاکل، ریزپوشانی، اندازه ذرات، مواد دیواره، بهینه سازی	
DOI: 10.22034/FSCT.21.149.81.	
* مسئول مکاتبات: zramiri@gmail.com z.raftani@sanru.ac.ir	

۱- مقدمه

با توجه به افزایش آگاهی و تقاضای مصرف کنندگان برای دریافت مواد غذایی سالم و طبیعی بدون افزودنی های مصنوعی، در سالیان اخیر، صنایع غذایی بیشتر به استفاده از افزودنی های طبیعی پرداخته است. عصاره های گیاهی و اسانس ها طیف وسیعی از نگهدارنده های غذایی طبیعی هستند که عموماً ایمن شناخته شده اند. عصاره های گیاهی و اسانس ها عطر و طعم مشخصی دارند و فعالیت آنتی اکسیدانی خوب و همچنین خواص ضد میکروبی از خود نشان می دهند. با توجه به طبیعت فرار و واکنش پذیری شیمیایی آنها، ترکیبات زیست فعال گیاهی را نمیتوان در بیشتر سیستم های غذایی با موفقیت استفاده کرد. قدرت اختلاط ضعیف و دو فازه شدن یکی از مشکلاتی است که در اثر افزودن مستقیم عصاره ها و اسانس ها به کمپلکس های غذایی پدید می آید. تخریب حرارتی، شیمیایی و نوری ترکیبات زیست فعال از دیگر معضلاتی هستند که این مواد افزودنی طبیعی ایجاد میکنند [1].

ذرت (*Zea mays L.*) منبع غنی از مواد مغذی است و به همین دلیل، به طور گسترده برای خوراک انسان استفاده می شوند [2]. علاوه بر این، دانه های ذرت به دلیل محتوای ترکیبات فنولی و کاروتنوئیدی دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به دانه های گندم، جو و برنج هستند [3]. مطالعات اپیدمیولوژیک ارتباطی بین مصرف رژیم غذایی کاروتنوئیدها و پیشگیری از بیماری های مزمن را نشان داده است که در برخی موارد با فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات مرتبط است. فنول ها گروه بسیار متنوعی از فیتوکمیکال ها هستند. آنها در دانه های غلات به صورت آزاد و باند شده یافت می شوند [4]. ترکیبات فنولی در گل ها، میوه ها، دانه ها و سایر قسمت های گیاه یافت می شود. ترکیبات فنولی گیاهان به دلیل اثرات ضد التهابی، ضد سرطانی و کاهش قند خون دارای اثرات مفید بر سلامت انسان شناخته می شوند [5].

جالب توجه است که هر دو نوع ترکیب (فنولی و کاروتنوئیدی) در غلظت های بالا در سرتاسر گیاه ذرت، به ویژه در گل، غلاف، برگ، کاکل و پوست آن یافت شده اند. به طور کلی کاکل و غلاف از ضایعات پس از برداشت گیاه ذرت هستند. به دلیل محتوای بالای ترکیبات زیست فعال در بخش های مختلف گیاه، علاقه مندی برای استفاده بالقوه از این ترکیبات فیتوشیمیایی وجود دارد [6]. عبارتی از کاکل می توان محصولات با ارزش مانند روغن های فرار، گلیکوزیدهای فلاونول کامفرول، ایزورهمتین و کورستین و لیپیدها تولید کرد چرا که همانطور که گفته شد این بخش از ذرت حاوی فلاونوئید، آلکالوئید، آلانتوئین، پنتوسان، اینوزیتول، پلی ساکارید، ویتامین K و C، چندین نوع اسید آمینه آلی و استرول می باشد [7]. همچنین عصاره کاکل ذرت دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی است و توانایی بالایی در مهار تکثیر سلول های سرطانی معده دارد. با افزایش آگاهی مصرف کنندگان از عوارض سوء نگهدارنده های شیمیایی بر سلامت انسان، گرایش در به کارگیری نگهدارنده های طبیعی به ویژه اسانس ها و عصاره های گیاهی در فرآورده های غذایی افزایش یافته است. به کارگیری عصاره های گیاهی دارای ویژگی ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی به صورت ریزپوشانی شده راهکاری کاربردی در رسیدن به فرآورده های غذایی ایمن تر با کیفیت بالاتر و عمر انبارمانی بیشتر بوده، در نتیجه کاهش ضایعات را سبب می گردد. بنابراین کاکل ذرت دارای خاصیت زیست فعال قابل توجهی است و ممکن است به عنوان ماده خام در تولید بسیاری از محصولات با ارزش در مقیاس صنعتی استفاده شود [8].

ریزپوشانی کردن عصاره های گیاهی با استفاده از دیواره های بیوپلیمری به علت افزایش پایداری مواد ریزپوشانی شده بوسیله محافظت آنها از تغییرات محیطی، آنزیمی و شیمیایی، فراهم کردن حالت بافری در برابر تغییرات pH

کاهش سمیت است همانطور که گفته شد پلی فنول ها ترکیبات طبیعی هستند که خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی دارند. چندین مطالعه تأیید کردند که خوردن غذاهای غنی از پلی فنول می تواند اثرات محافظتی قلبی و کلیوی را در برابر بیماری های مختلف بدون کاهش فعالیت ضد سرطانی آن ها ایجاد کند. با این حال، پایداری، فراهمی زیستی و اندازه پلی فنل ها، انتقال آن ها را در سراسر غشای سلولی و در نتیجه فعالیت بیولوژیکی در داخل بدن را محدود می کند. برای گذر از این مشکلات؛ محققان حامل های نانوذرات را توسعه داده اند. گزارش شده است که نانوذرات باعث افزایش پایداری پلی فنول ها، فراهمی زیستی، انتقال در سراسر سلول و فعالیت بیولوژیکی می شوند [12].

هیدروکلوئیدها عمدتاً کربوهیدراتهای پیچیده‌ای هستند که برای بهبود قوام و ویژگیهای بافتی مواد غذایی مایع و نیمه مایع استفاده می شوند. فعالیت آنها بستگی به نوع و غلظت هیدروکلوئیدها، دما و شرایط فرآیند و همچنین محتوای مواد جامد و ترکیب شیمیایی مواد غذایی دارد در میان انواع هیدروکلوئیدها، آنهایی که از منابع گیاهی به دست می آیند، به دلیل فراوانی و راحتی بیشتر در استخراج، در بخشهای صنعتی مورد توجه بسیاری قرار گرفته اند. علاوه بر این، با داشتن ویژگیهای زیستی و تجزیه بیولوژیکی هیدروکلوئیدهای گیاهی، می توان از آنها با موفقیت در زمینه های مختلف مانند صنایع غذایی و دارویی استفاده کرد. دانه ریحان از گیاه ریحان است که یک عضو از خانواده Labiatae میباشد. این گیاه در اصل بومی ایران، ترکیه، هند و دیگر مناطق گرمسیری آسیا، آفریقا و اروپا است. برگ های تازه یا خشک شده ریحان به عنوان چاشنی در سراسر جهان و اسانس های آن در داروسازی و طعم دهنده ها استفاده می شوند. دانه های ریحان هنگام خیساندن در آب ژل تولید میکنند و به طور سنتی در نوشیدنی ها و دسرهای آسیایی مانند فالوده و شربت استفاده می شوند صمغ دانه ریحان هیدروکلوئیدی با وزن مولکولی بالا (۲۳۲۰ کیلودالتون) و

مقابله با تغییرات حرارتی و تغییرات یونی، محافظت در برابر طعم ها و بوهای ناخوشایند و آزاد شدن کنترل شده ماده ریزپوشانی شده می تواند به عنوان روشی برای افزایش عمر ماندگاری مورد استفاده قرار بگیرد [9]. امروزه از پوشش های مختلفی جهت ریزپوشانی کردن مواد استفاده می شود که ممکن است ساختار پلی ساکارییدی، پروتئینی و یا لیپیدی داشته و از منابع گیاهی، دریایی، حیوانی و میکروبی تهیه گردند. در انتخاب دیواره بایستی به ویژگیهای اولیه از جمله ترکیب و ساختار شیمیایی، وزن مولکولی و همچنین خواص ثانویه نظیر حلالیت، رفتار رئولوژیکی، توانایی تشکیل فیلم، کیفیت فیلم، فعالیت سطحی، دوام و تجزیه پذیری، نقطه ذوب و جوش توجه شود. در فرآیند ریزپوشانی انواع مختلف کربوهیدرات (نشاسته، کیتوزان، مالتودکسترین، دکسترین، ساکارز، دکسترین های حلقوی)، سلولز (کربوکسی متیل سلولز، متیل سلولز، اتیل سلولز)، صمغ ها (صمغ عربی، آگار، آلژینات سدیم، کاراگینان و...) چربی ها (لیپوزوم، واکس، مونوگلیسریدها، روغن ها)، پروتئین ها (کازئین، آب پنیر، ژلاتین، آلبومین و...) و پلیمرهایی با درجه غذایی (پلی پروپیلن، پلی وینیل استات و ...) غالباً به عنوان ماده ی دیواره یا حامل استفاده می شود. پوشش ها ممکن است به صورت منفرد و یا ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند [10].

برای ریزپوشانی عصاره ها روش های مختلفی وجود دارد که مهمترین آنها استفاده از روش تولید امولسیون است. یک امولسیون از فاز آبی، فاز روغنی و امولسیفایر یا سورفاکتانت تشکیل شده است [11]. نانو تکنولوژی توانایی کنترل ماده در مقیاس اتمی و استفاده از خواص و ویژگی های نوظهور ماده در ابعاد ۱۰۰-۱ نانومتر است. کپسوله کردن مواد فعال زیستی یک رویکرد عملی و کارآمد برای تنظیم رهایش دارو، افزایش پایداری فیزیکی مواد فعال، محافظت از آن ها از واکنش با محیط، کاهش فراریت، افزایش زیست فعالی،

کنجد به عنوان یک منبع پروتئین و به عنوان یک عنصر در صنایع غذایی استفاده می شود. ایزوله ها یا کنسانتره های پروتئین کنجد معمولاً با رسوب ایزوالکتریک تهیه می شوند. کنجاله کنجد و پروتئین جدا شده سرشار از متیونین (۲/۵-۴ درصد) و اسیدهای آمینه حاوی گوگرد (۳/۸-۵/۵ درصد) هستند. پروتئین کنجد از ۸۰٪ α -گلوبولین و ۲۰٪ بتا-گلوبولین تشکیل شده است. خواص عملکردی و فیزیکوشیمیایی کنسانتره پروتئین کنجد، ایزوله و همچنین استفاده از آن به عنوان مکمل غذایی برای نوشیدنی و نان تاکنون گزارش شده است [15].

به طور کلی هدف از این پژوهش: ۱- تعیین محتوای فنولی کل و فلاونوئیدی عصاره کاکل ذرت ۲- ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره کاکل ذرت ۳- بهینه سازی به روش سطح پاسخ و انتخاب غلظت بهینه برای ریزپوشانی عصاره با پوشش دیواره های متفاوت

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

ذرت دانه ای واریته سینگل کراس ۷۰۴ از مزرعه در شهر هشتگرد استان البرز تهیه شد. صمغ دانه ریحان از شرکت ریحان گام پارسیان، ایزوله پروتئین کنجد بعد از استخراج روغن کنجد دانه سیاه خریداری شده از شهرستان خداآفرین، طبق روش قلیایی (Onsaard et al. (2010)، تمامی تغییرات استخراج گردید، تمامی مواد شیمیایی و حلال های مورد استفاده از شرکت سیگما آلدردیج تهیه گردید. آب دوبار تقطیر برای تمام نمونه های مورد استفاده قرار گرفت [16].

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- تهیه عصاره کاکل

کاکل ذرت (۳۰ یا ۴۵ روز بعد از گل دهی) برای استخراج عصاره مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کاکل به مدت ۵ روز در هوای معمولی (دمای اتاق) خشک شد و سپس به منظور

ویسکوزیته ذاتی (۳/۹۱۷ متر مکعب بر کیلوگرم) است. که تحت عنوان هتروپلی ساکارید آنیونی حاوی گلوکومانان شناخته می شود [13].

پلی ساکاریدها در تماس با مایعات سلولی تمایل دارند به سرعت احاطه^۱ و سپس تجزیه شوند، بنابراین امکان آزادسازی داخل سلولی را فراهم می کنند. علاوه بر این، وجود گروه های آبدوست در ساختار آنها، مانند گروه های هیدروکسیل، کربوکسیل و آمینوگروه ها یک استراتژی مفید برای بهبود فراهمی زیستی ترکیبات هسته است. بنابراین، پلی ساکاریدها آینده امیدوارکننده ای به عنوان ترکیبات بیوپلیمری برای تهیه نانوذرات دارند و یافتن منبع جدیدی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر به ویژه پلیمرهای مشتق شده از گیاه با خواص مناسب، یک حوزه فعال تحقیقاتی است. صمغ دانه ریحان (BSG^۲) یک هیدروکلوئید با وزن مولکولی بالا مشتق شده از گیاه است. صمغ دانه ریحان محلول ویسکوزیته بالا و رفتار رقیق شونده با برشی ایجاد می کند و به عنوان یک تثبیت کننده، امولسیفایر، جایگزین چربی، فیلم خوراکی و کنترل کننده رشد کریستال یخ است [14].

کنجد (*Sesamum indicum L.*) یکی از اولین محصولات زراعی مورد استفاده است که برای استفاده از روغن آن کشت می شود. کشورهای عمده تولید کنجد هند، سودان، چین و برمه هستند که حدود ۶۰ درصد از کل تولید را تشکیل می دهند. تقریباً ۵۰ درصد روغن و ۲۵ درصد پروتئین در دانه کنجد وجود دارد. روغن از دانه کنجد به روش استخراج با حلال و پرس مکانیکی استخراج می شود. محصول جانبی که پس از استخراج روغن باقی می ماند کنجاله کنجد نامیده می شود و حاوی تقریباً ۵۰ درصد پروتئین است. متیونین و تریپتوفان در دانه کنجد به میزان زیادی وجود دارد که آن را در بین سایر دانه های روغنی برجسته می کند. هر پروتئین با ویژگی های فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد خود مشخص می شود که بر فرآیند تأثیر بیشتری می گذارد. بنابراین، کنجاله

بود، مخلوط گردید. سپس ۴ میلی لیتر سدیم کربنات (۱مولار) به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا فاز آبی گسترش یابد و سپس جذب آن در ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر-UV Vis قرائت شد. مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره بر اساس میلی گرم اکی والان اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم نمونه بیان گردید [6]. فلاونوئید عصاره بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید اندازه گیری شد و بر حسب اکی والان روتین بیان شد [19].

۲-۲-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب DPPH

برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ها، مطابق با روش کاپوچی و همکاران (۲۰۱۷) عمل شد. ۰/۳ میلی لیتر از عصاره با غلظت های مختلف با ۲/۷ میلی لیتر محلول متانولی (۱۰-۶×DPPH) مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد و جذب در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. نمونه شاهد حاوی تمام ترکیبات و شرایط ذکر شده بدون افزودن عصاره است. آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ به میزان ۱۰۰ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید [5].

$$\text{جذب DPPH} / (\text{جذب نمونه} - \text{DPPH}) = \text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

۲-۲-۵- فعالیت آنتی اکسیدانی بر حسب FRAP

برای تعیین قدرت احیاکنندگی آهن، در لوله آزمایش به ۰/۰۲ میلی لیتر عصاره (با غلظت های مختلف بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر) یا محلول استاندارد آبی سولفات آهن (غلظت ۰/۳۷-۰/۱۸۵ میکرومول)، ۱ میلی لیتر از محلول کاری اضافه و مخلوط شد. مخلوط فوق ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده و سپس جذب نوری نمونه ها قرائت شد. فعالیت احیاکنندگی عصاره بر حسب میکرو مول آهن در میلی گرم محاسبه شد. آنتی اکسیدانی سنتزی TBHQ به میزان ۱۰۰ppm به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید [20].

خروج بیشتر محتوای رطوبت آن، با استفاده از آون هوای داغ در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و سپس با استفاده از آسیاب به اندازه تقریبی ۱ میلی متر پودر و از الک با مش ۵۰ عبور داده شد، برای استخراج عصاره کاکل از حلال اتانولی با درجه غذایی استفاده شد. مطابق روش ارائه شده توسط یونس و همکاران (۲۰۲۲)، با کمی تغییرات، حدود ۱۰ گرم پودر کاکل ذرت خشک به ۲۰ میلی لیتر محلول اتانول-آب ۶۰ درصد (وزنی/وزنی) اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تکان دهنده در دمای اتاق قراردادده شد. و در ادامه با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر و عصاره حاصله تا زمان انجام آزمایش در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [17].

۲-۲-۲- تهیه نانوامولسیون

برای تهیه نانوامولسیون، عصاره در سه سطح ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به فاز روغنی که حاوی توئین ۸۰ و روغن سویا است، اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به هم زده شد. سپس در زمان های مختلف به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه با استفاده از اولتراتوراکس و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد هموژن شد. صمغ دانه ریحان به صورت منفرد و در ترکیب با ایزوله پروتئینی کنجد در غلظت ۳۰ درصد و در نسبت های ۱:۱ و ۱:۱ تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. ۲ نمونه بهینه با بهترین اندازه برای پوشش دهی استفاده شد. محلولهای پوششی به آرامی در نسبت محلول به امولسیون ۵ به ۱ و ۵ به ۲ به امولسیون تهیه شده اضافه شد. برای کاهش بیشتر اندازه امولسیون های تهیه شده به مدت ۳ دقیقه در معرض اولتراسوند نوع پروبی قرار گرفت و به این ترتیب نانوامولسیون مورد نظر تهیه گردید [18].

۲-۲-۳- تعیین محتوای فلاونوئیدی و فنول تام

مقدار ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره با ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو که به نسبت ۱۰ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده

اسکن شد. خواص نوری پراکندگی در امتداد لوله شیشه ای در زمان های مختلف، منحنی را به عنوان "اثر انگشت ماکروسکوپی" در نظر گرفته شد. داده های حاصل از پراکندگی برگشتی نانوامولسیون در ۰، ۳، ۷، ۱۵ و ۲۱ روز در طول نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به دست آمد [23].

۳- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از نرم افزار Design Expert 11.1.1 به منظور طراحی آزمایش، تحلیل داده ها، مدل سازی، بهینه کردن پارامترها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی استفاده گردید. همچنین برای بررسی پارامترهایی نظیر ارزیابی اندازه ذرات، راندمان ریزپوشانی و تجزیه تحلیل سایر پارامترهای آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون آنووا و با استفاده از روش طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

۴- نتایج و بحث

۴-۱- طرح آزمایشی و بهینه سازی داده ها

تیمارها در ۱۳ آزمایش بر اساس طرح مرکب مرکزی چیده شد. متغیرهای مستقل مورد استفاده شامل غلظت عصاره و زمان هموژنیزاسیون بود و پاسخ های اندازه گیری شده شامل اندازه ذرات و بازدهی بودند. غلظت های تعیین شده توسط نرم افزار برای فاکتورهای مورد نظر در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. همچنین تاثیر هر یک از فاکتورها بر روی پاسخ ها به شکل فرمول زیر محاسبه می گردد.

فرمول (۱): عصاره کاکل نانوریزپوشانی شده با پوشش

ترکیبی (BSG:SPI):

$$\text{Yield} = +78.31 + 2.50A + 6.33B - 14.09A^2 - 17.59B^2$$

$$\text{Particle Size} = +693.38 + 24.17A + 52.50B - 66.33A^2 - 138.33B^2$$

A: Concentration B: Homogenization Time

فرمول (۲): عصاره کاکل نانوریزپوشانی شده با پوشش صمغ

دانه ریحان

$$\text{Yield} = +94.72 + 2.50A + 6.94B - 21.67A^2 - 18.33B^2$$

$$\text{Particle Size} = +624.33 - 0.8333A + 19.92B - 131.00A^2 - 48.75B^2$$

۲-۲-۶- فعالیت ضد میکروبی عصاره کاکل ذرت به منظور تعیین فعالیت آنتی میکروبی عصاره از حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) با استفاده از روش سری های رقت استفاده شد. ابتدا در هر یک از پنج لوله آزمایش، ۲ میلی لیتر محیط کشت مولر هیتتون برآث ریخته شد. سپس به اولین لوله، ۲ میلی لیتر از عصاره افزوده و توسط شیکر لوله کاملاً با محیط کشت مخلوط شد. با کمک سمپلر، ۲ میلی لیتر از لوله اول به لوله دوم اضافه شده و پس از هم زدن، نیمی از آن به لوله بعدی انتقال یافت. به همین ترتیب تا لوله پنجم رقیق سازی ادامه یافت و از لوله پنجم ۲ میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد. با این روش غلظت های ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی لیتر تهیه گردید. سپس به همه لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (در حد نیم مک فارلند) اضافه شد. دهانه همه لوله ها با پنبه بسته شده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در انتها، لوله ها از لحاظ کدورت بررسی شدند و کمترین سری رقت فاقد کدورت به عنوان کمینه غلظت مهاری ترکیب عصاره ها گزارش گردید [21].

۲-۲-۷- تعیین خواص نانو ذرات

ویژگی های نانوذرات شامل اندازه ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیک با کمک دستگاه زتاسایزر انجام شد. نمونه ها با آب دیونیزه به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شدند.

۲-۲-۷-۱- راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی به وسیله ی اندازه گیری نسبت فنول های ریزپوشانی شده به کل فنول ها که برای تهیه نانوذرات استفاده شد، محاسبه گردید [22].

۲-۲-۷-۲- پایداری فیزیکی نانوامولسیون

جهت تعیین پایداری فیزیکی نانوامولسیون ها، ۷ میلی لیتر از نانوامولسیون های مختلف به یک لوله شیشه ای استوانه ای با کف تخت اضافه و از پایین به بالا توسط یک منبع نور

علامت مثبت در مقابل عبارت ها نشان دهنده اثر
 سینرژیستی و علامت منفی نشان دهنده اثر آنتاگونیستی
 است. A: Concentration B: Homogenization Time

Table1- Independent variables and Nano emulsion responses of encapsulated corn tassel extract with composite coating by central composite design(CCD) method

Std	Run	Factor 1 A:Concentration	Factor 2 B:Homogenization Time	Response 1		Response 2	
				Yield(%)		Particle Size(nm)	
				Actual	Predicted	Actual	Predicted
		%	Min	%	%	nm	nm
12	1	20	10	80	78.31	700	693.38
6	2	30	10	65	66.72	659	651.22
3	3	10	15	50	50.47	520	517.06
5	4	10	10	60	61.72	612	602.89
4	5	30	15	55	55.47	568	565.39
2	6	30	5	45	42.80	450	460.39
10	7	20	10	80	78.31	700	693.38
1	8	10	5	40	37.80	400	412.06
8	9	20	15	68	67.06	602	607.55
13	10	20	10	80	78.31	700	693.38
7	11	20	5	50	54.39	525	502.55
11	12	20	10	80	78.31	700	693.38
9	13	20	10	75	78.31	650	693.38

Table2- Independent variables and Nano emulsion responses of encapsulated corn tassel extract with basil seed gum coating by central composite design(CCD) method

Std	Run	Factor 1 A:Concentration	Factor 2 B:Homogenization Time	Response 1		Response 2	
				Yield		Particle Size	
				Actual	Predicted	Actual	Predicted
		%	min	%	%	nm	nm
7	1	20	5	70	67.99	555	555.67
2	2	30	5	50	50.28	430	423.83
4	3	30	15	65	64.17	450	463.67
1	4	10	5	45	45.28	420	425.50
10	5	20	10	95	94.72	620	624.33
3	6	10	15	60	59.17	475	465.33
11	7	20	10	95	94.72	620	624.33
8	8	20	15	80	83.33	575	595.50
5	9	10	10	70	70.56	490	494.17
9	10	20	15	85	83.33	620	595.50
12	11	20	10	95	94.72	627	624.33
6	12	30	10	75	75.56	500	492.50
13	13	20	10	95	94.72	627	624.33

۴-۲- اندازه ذرات و پتانسیل زتا

متوسط اندازه نانو ذرات ریزپوشانی شده در جدول ۳ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود هر دو نوع پوشش مورد استفاده از نظر اندازه در محدوده نانومتر قرار دارند. نانوپوشش ترکیبی بزرگترین (SPI:BSG- 533.28nm) و نانوپوشش تهیه شده از صمغ دانه ریحان (BSG-494.45nm) کوچکترین اندازه را داشت که هر دو پوشش باهم اختلاف آماری معنی داری داشتند. به عبارتی نتایج نشان داد که تغییر در مواد دیواره بر اندازه نانوریزپوشانی تاثیر معنی داری دارد. با بررسی جدول ۳ ملاحظه می شود کاهش اندازه ذرات نانوپوشانی شده با صمغ دانه ریحان بیشتر از پوشش ترکیبی است که با یافته های خرمی و همکاران ۱۳۹۸ مطابقت دارد [24]. بررسی مطالعات آنان نشان می دهد که افزودن غلظت کمی از صمغ ریحان به امولسیون سدیم کازینات باعث تغییر معنی داری اندازه ذرات و کاهش آن شده است. کاهش اندازه ذرات به علت جذب پلی ساکاریدهای آنیونی بر روی سطح قطرات پوشیده شده از پروتئین ها می باشد. همچنین اندازه ذرات یک پارامتر کلیدی است که خواص عملکردی پروتئین ها مثل حلالیت، امولسیفایری و قابلیت تشکیل کف را تحت تاثیر قرار می دهد که طبق یافته های Ding et al. 2021 تیمار پروتئین های mantle حاصل از گوش ماهی با اولتراسوند، اندازه ذرات را بطور معنی دار کاهش داد (بطور میانگین در ۳۰۰ وات، ۳۱۴/۶۰ نانومتر) [25]. که این کاهش با افزایش شدت اولتراسوند، بیشتر شد. که علت کاهش اندازه ذرات در اثر تیمار با اولتراسوند احتمالا مربوط به این واقعیت است که فعل و انفعالات غیرکوالانسی و کنش های شدید بین توده های پروتئین توسط اثر توربولانت، کاویتاسیون و نیروی برشی قوی ناشی از شدت اولتراسوند آسیب دیده است. همچنین آنان گزارش کردند که بعلت کاویتاسیون و نیروی برشی ناشی از تیمار با اولتراسوند، ساختار پروتئین کاهش یافته و در نتیجه برخی از گروه های سولفیدریل آزاد در معرض، به راحتی پیوندهای دی سولفیدی تشکیل می دهند بنابراین پایداری ساختار

پروتئین گوش ماهی mantle بهبود می یابد. Osman gul et al. 2023 گزارش کردند که تیمار پروتئین های کنجد با اولتراسوند منجر به کاهش معنی دار اندازه ذرات (کمتر از ۴۰ میکرومتر) در مقایسه با نمونه شاهد (۱۲۰ میکرومتر) گردید که علت این امر نیز کاهش فعل و انفعالات بین ذره ها می باشد [26]. همچنین آنان در مطالعات خود اعلام کردند که افزایش در زمان اولتراسوند تغییرات محسوسی ایجاد نمی کند که علت این امر احتمالا ساختار توده ای بالای ترکیبات نامحلول ایزوله پروتئین می باشد. حسینی و همکاران ۱۳۹۵ در بررسی پایداری نانوامولسیون روغن ماهی پایدار شده با ایزوله پروتئین آب پنیر (تهیه شده به روش فراصوت) طی نگهداری گزارش کردند که در اثر تیمار محلول با اولتراسوند در زمان های مختلف، اندازه ذرات بطور معنی دار (از ۶۰۰ نانومتر به زیر ۱۰۰ نانومتر) کاهش یافت. افزایش زمان طی فرایند اولتراسوند باعث می شود که ذرات شکسته شده روغن فرصت بیشتری پیدا کنند تا توسط امولسیفایر پوشیده شده و سبب جلوگیری از افزایش قطر ذرات گردند و فقط ساختار را ریز نکرده بلکه خود پروتئین نیز در حال ریز شدن می باشد [27]. اندازه ذرات نانوامولسیون هایی که تحت تاثیر اولتراسوند قرار گرفتند به عواملی مانند زمان، درجه حرارت، قدرت و شدت اولتراسوند، خصوصیات مکانیکی و فیزیکی صمغ، نوع ماده ضدمیکروب و انتی اکسیدان و خواص نوری پوشش دارد. [28]. پورشایگان و همکاران ۱۳۹۸ در مطالعه خود اندازه ذرات نانوامولسیون صمغ دانه ریحان و قدومه شیهری حاوی عصاره پوست کیوی را در محدوده ۸۱/۵۳ تا ۱۵۶/۱۷ گزارش کردند [29]. همچنین به منظور بررسی اثر متقابل متغیرهای مستقل بر صفات مورد آزمایش، نمودار پاسخ سطحی رسم شد. در هر نمودار اثر دو متغیر بررسی گردید. شکل ۲۱ تصویر سه بعدی اثر غلظت و زمان هموزنیسیون بر اندازه ذرات نانوامولسیون عصاره کاکل ذرت ریزپوشانی شده با صمغ دانه ریحان به صورت منفرد و در ترکیب با ایزوله پروتئین کنجد را نشان می دهد.

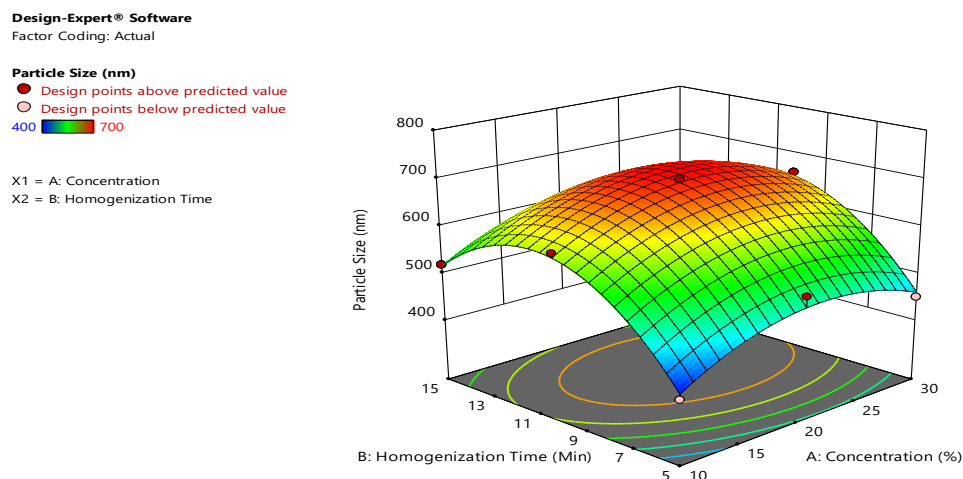


Figure1. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of concentration- homogenization time on Nano emulsion particle size corn tassel extract encapsulated with basil seed gum and sesame protein isolate

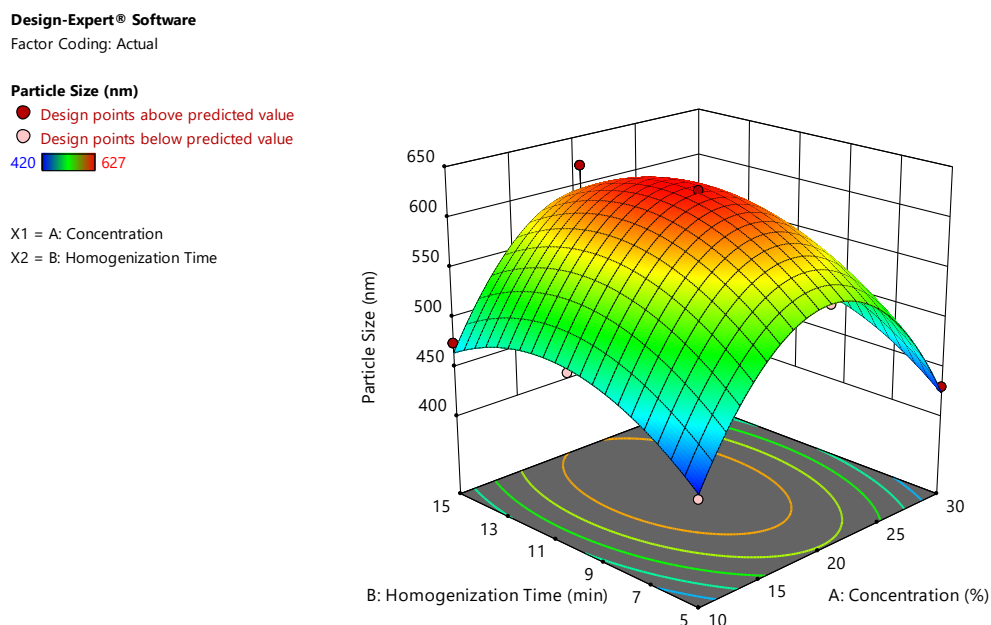


Figure2. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of concentration- homogenization time on Nano emulsion particle size corn tassel extract encapsulated with basil seed gum

ریزپوشانی شده با صمغ دانه ریحان و زمان هموژنیزاسیون ۵ دقیقه به دست آمده است. مطابق مطالعات انجام شده، عصاره، به علت خواص ویسکوزیته تأثیر مهمی در اندازه ذرات و کارایی نانوامولسیون دارد لذا ماده محصور شده با ویسکوزیته کم می تواند تجزیه قطرات نانوامولسیون را تسهیل کند و منجر به کاهش اندازه ذرات گردد. همچنین غلظت بالای نمونه نه تنها ویسکوزیته را افزایش می دهد بلکه باعث افزایش ترسیب نمونه شده و منجر به اندازه

همان طور که در شکل ۱ می بینید با افزایش غلظت عصاره کاکل ذرت با پوشش ترکیبی و زمان هموژنیزاسیون، اندازه ذرات افزایش یافت. با توجه به اینکه یکی از اهداف نانوامولسیون رسیدن به کوچکترین حد اندازه ذرات است لذا با بررسی نمودار سه بعدی مشاهده می شود که کمترین مقدار اندازه ذرات در غلظت ۱۰٪ و زمان ۵ دقیقه حاصل شده است. همچنین با بررسی شکل ۲ مشاهده می شود که کمترین مقدار اندازه ذرات در غلظت ۱۰٪ عصاره کاکل ذرت

نشان داد که کارایی درون پوشانی عصاره کاکل درون کپسول ها با تغییر مواد دیواره به طور معنی دار تغییر می یابد. نوع دیواره و اندازه ذره از عوامل تاثیرگذار در راندمان انکپسولاسیون هستند. همچنین ویسکوزیته از عوامل تاثیرگذار بر راندمان انکپسولاسیون می باشد. چون با افزایش ویسکوزیته حرکت مواد فرار کاهش یافته و در نتیجه راندمان انکپسولاسیون افزایش می یابد [33]. همچنین فشار هموژنیزاسیون بالاتر از ۵۰۰ بار، تأثیر مثبت روی راندمان انکپسولاسیون داشته و باعث افزایش آن میشود، اما بالاتر از این مقدار، افزایش فشار هموژنیزاسیون باعث کاهش راندمان انکپسولاسیون میگردد [34]. با بررسی جدول ۳ مشاهده می شود میزان راندمان نانوریزپوشانی عصاره کاکل در پوشش صمغ دانه ریحان $76/2\%$ و در پوشش ترکیبی $58/2\%$ می باشد. بعبارتی بیشترین میزان راندمان مربوط به استفاده از صمغ دانه ریحان بصورت منفرد است. به طور کلی دلیل افزایش راندمان وجود صمغ در ماتریس دیواره است که با ایجاد پوشش محافظ در سطح عصاره کاکل این حالت را ممکن می سازد. همچنین علت پایین بودن راندمان در حالت ترکیبی احتمالاً به دلیل بالا رفتن فشار اسمزی در اثر افزایش مقدار پروتئین باشد [35] که نتایج حاصله با تحقیقات عباسی گزنی و همکاران ۱۴۰۱ [36] مطابقت دارد. دلیل تفاوت در درصد نانوریزپوشانی را می توان به اندازه ذرات نانومولسیون های تهیه شده نسبت داد. لذا هرچه اندازه ذرات امولسیون کوچکتر باشد راندمان ریز پوشانی افزایش می یابد. که نتایج حاصله از این پژوهش نشان داد که باتوجه به کوچکتر بودن اندازه ذرات نانومولسیون پوشش داده شده با صمغ دانه ریحان نسبت به پوش ترکیبی، راندمان ریزپوشانی با پوشش صمغ بیشتر است. نتایج مطالعات ما با یافته های جمشیدی و همکاران ۲۰۲۰ [37] مطابقت دارد.

قطرات بزرگتر می شود. که نتایج حاصله با یافته های Li et al. 2017 [30] مطابقت دارد. پتانسیل زتا معمولاً برای تعیین پایداری سیستم محلول استفاده می شود. بالابودن پتانسیل زتای ذرات امولسیون موجب بالا رفتن نیروی دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه افزایش پایداری فیزیکی سیستم می گردد. [31]. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است پتانسیل زتای محلول نانومولسیون حاوی عصاره کاکل در پوشش صمغ دانه ریحان و همچنین در پوشش ترکیبی، مثبت است. که نشان دهنده اسیدهای آمینه با بار مثبت بیشتر از بار منفی در سطح پروتئین است. پتانسیل زتای مثبت پوشش های مورد استفاده (صمغ دانه ریحان و پروتئین ایزوله کنجد) نشان می دهد که آن برای افزایش پایداری محلول به دلیل دافعه الکترواستاتیک خوب، مقید است. که مقادیر آن برای پوشش ترکیبی (۴۵/۵۷) بیشتر از پوشش در صمغ دانه ریحان (۴۱/۸۵) می باشد. نتایج حاصله با یافته های Osman et al., 2023 [26] مطابقت دارد. آنان گزارش کردند که تیمار پروتئین کنجد با اولتراسوند منجر به افزایش پتانسیل زتا (۳۹/۸۵mV) و در نتیجه پایداری امولسیون می شود. که علت این افزایش ممکن است به دلیل نیروهای مکانیکی مانند کاویتاسیون باشد که در طول اولتراسوند رخ می دهد. گروه های قطبی در ناحیه داخلی پروتئین بعلاوه اثر کاویتاسیون به سطح مولکول های پروتئین حرکت می کنند بنابراین بار خالص بیشتری در محلول پروتئین اصلاح شده وجود دارد که برهم کنش های الکترواستاتیکی کمپلکس های محکم تری را تشکیل می دهند که پایداری و توزیع محلول را بهبود می بخشد [32].

۴-۳- کارایی درون پوشانی

کارایی درون پوشانی میزان به دام افتادن عصاره کاکل ذرت درون کپسولها را نشان می دهد. نتایج حاصله در جدول ۳

Table 3- Particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency of Nano emulsion encapsulated with different wall materials

Type of Nano emulsion	Mean particle size(nm)	Zeta potential (mv)	Encapsulation efficiency (%)
BSG	494.45 ^b	+41.85 ^b	76.2 ^a
BSG:SPI	533.28 ^a	+45.57 ^a	58.27 ^b

Dissimilar letters showed a statistically significant difference at the level of P <0.05
BSG: Basil seed gum, SPI: Sesame protein isolate

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Yield (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
40 80

X1 = A: Concentration
X2 = B: Homogenization Time

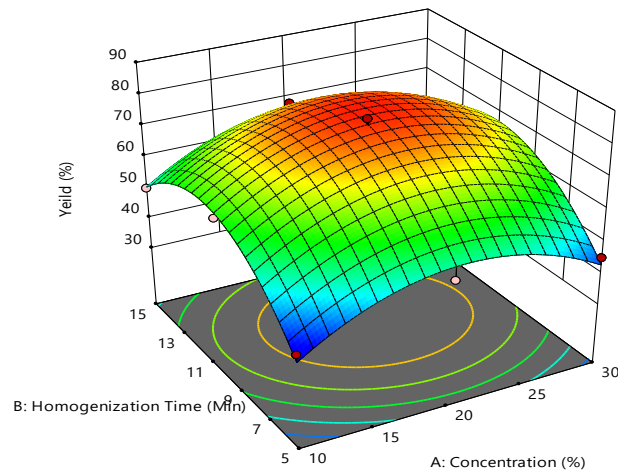


Figure3. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of concentration- homogenization time on Nano emulsion efficiency corn tassel extract encapsulated with basil seed gum and sesame protein isolate

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Yield (%)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
45 95

X1 = A: Concentration
X2 = B: Homogenization Time

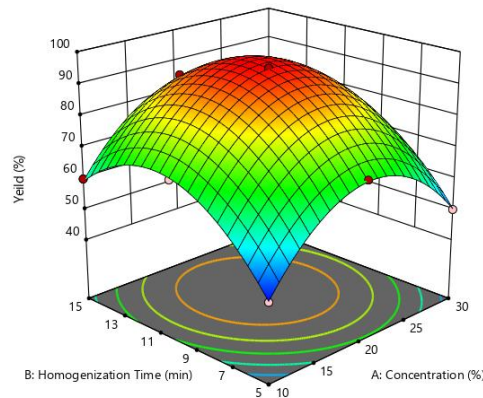


Figure4. Three-dimensional diagram, the simultaneous effect of concentration- homogenization time on Nano emulsion efficiency corn tassel extract encapsulated with basil seed gum

با افزایش غلظت عصاره و زمان هموژنیزاسیون بازدهی افزایش یافت (شکل ۴). همانطور که در شکل ۴ می بینید از آنجایی که غلظت عصاره به علت خواص ویسکوزیته تاثیر مهمی در اندازه ذرات و کارایی نانوامولسیون دارد لذا ماده

همان طور که در شکل ۳ می بینید با افزایش غلظت عصاره کاکل ذرت با پوشش ترکیبی و زمان هموژنیزاسیون، بازدهی افزایش یافت. در بررسی تاثیر غلظت-زمان هموژنیزاسیون بر راندمان عصاره کاکل ذرت با پوشش صمغ دانه ریحان نیز

ارائه شده برای نمونه‌ها با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند. که بیشترین پایداری مربوط به نانوامولسیون عصاره کاکل ریزپوشانی شده با پوشش ترکیبی در روز صفر و کمترین پایداری آن مربوط به نانوامولسیون عصاره کاکل ریزپوشانی شده با صمغ دانه ریحان در روز ۲۱ می باشد. با بررسی نتایج حاصله، پوشش ترکیبی پایداری بیشتری دارد که نشان از تاثیر نوع دیواره بر پایداری دارد که نتایج به دست آمده از پتانسیل زتا نیز نشان داد که نانوامولسیون حاوی عصاره ترکیبی پایداری بیشتری دارد. حسینی و همکاران ۱۳۹۵ در بررسی پایداری نانوامولسیون روغن ماهی پایدارشده با ایزوله پروتئین آب پنیر (تهیه شده به روش فراصوت) طی نگهداری گزارش کردند که با گذشت زمان در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) پایداری نانوامولسیون کاهش یافت که علت این امر حرکت سریعتر ذرات به سطح در دمای بالاتر که انعقاد جاذبه ای را افزایش می دهد [29]. یافته های غفوری و همکاران ۱۴۰۰ در خصوص بررسی پایداری فیزیکی و شیمیایی نانوامولسیون امگا۳ نشان می دهد که پایداری در مدت زمان نگهداری کاهش پیدا می کند به عبارتی روند خامه ای شدن با گذشت زمان افزایش پیدا می کند که این امر احتمالاً به دلیل وجود ذراتی با اندازه‌های ناهمگون و وجود ذرات بدون سورفاکتانت احتمالی، ذرات در اثر حرکات تصادفی با یکدیگر ادغام شده و پدیده انبوهش در طی مدت زمان نگهداری صورت میگیرد. [40]. نتایج ارائه شده توسط شهرام پور و همکاران ۱۴۰۱ نیز موید مطالعات ما بود که زمان نگهداری در پایداری امولسیون و نانوامولسیون تأثیرگذار است و با افزایش زمان نگهداری اندازه ذرات افزایش می‌یابد [41].

محصور شده با ویسکوزیته کم می تواند تجزیه قطرات نانوامولسیون را تسهیل کند. همچنین غلظت بالای نمونه نه تنها ویسکوزیته را افزایش می دهد بلکه باعث افزایش ترسیب نمونه شده و منجر به اندازه قطرات بزرگتر می شود. که نتایج حاصله با یافته های Li et al. 2017 مطابقت دارد. [30] لذا باتوجه به اینکه در نانوریزپوشانی عصاره های گیاهی هدف رسیدن به حداکثر راندمان مطلوب است لذا ماکزیمم راندمان مربوط به غلظت ۲۰٪ و زمان ۱۰ دقیقه هموژنیزاسیون می باشد.

۴-۴- پایداری نانوامولسیون ها

پایداری امولسیون به عوامل مختلفی بستگی دارد که می توان مهم ترین این عوامل را تجمع و به هم آمیختگی ذرات دانست. طبق قانون استوکس سرعت حرکت قطرات با مربع شعاع آن رابطه مستقیم دارد. در نتیجه از طریق کاهش اندازه قطرات می توان پایداری امولسیون را افزایش داد. اندازه ذرات و توزیع آن ها بر بسیاری از خواص امولسیون مانند جدایی فاز، پایداری در طی نگهداری، مقاومت به رویه بستن، خصوصیات ظاهری، گرانبوی، ویژگی های حسی و ارگانولپتیکی و غیره تاثیر بسیاری دارد [38]. به طور معمول پلی ساکاریدهای گیاهی به عنوان پایدارکننده های امولسیونی نوع روغن در آب شناخته می شوند. این زیست بسپارها از طریق یک مکانیسم غیرجاذب و با کاهش حرکت قطرات روغن به پایداری امولسیون کمک می کنند [39]. پایداری نانوامولسیون عصاره کاکل ریز پوشانی شده با پوشش صمغ دانه ریحان به صورت منفرد و ترکیبی در طی نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در روزهای صفر، ۳، ۷، ۱۵، ۲۱ در جدول ۴ ارائه شده است. همان گونه که انتظار می رفت پایداری نانوامولسیون ها با گذشت زمان کاهش یافت. مقادیر

Table4- Investigation of stability in different samples of Nano emulsion prepared from corn tassel extract encapsulated with BSG and BSG: SPI

Extract name	Stability of Nano emulsion in days(%)				
	0	3	7	15	21
Corn tassel extract Nano emulsion encapsulated with basil seed gum	89/42 ^{Ab}	74/67 ^{Bb}	63/95 ^{Cb}	43/20 ^{Db}	20/89 ^{Eb}

Corn tassel extract Nano emulsion encapsulated with basil seed gum and sesame protein isolate	94/85 ^{Aa}	82/00 ^{Ba}	70/23 ^{Ca}	55/41 ^{Da}	33/80 ^{Ea}
---	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Dissimilar letters showed a statistically significant difference at the level of $p < 0.05$

et al. 2018[44] که محتوای فنولی تام عصاره کاکل ذرت را به

ترتیب $70/33 \frac{mgGAE}{g} DW$ و $29/24 \frac{mgGAE}{g} DW$ تا $29/45$ گزارش کردند، مطابقت دارد.

Table5-Total phenol and Flavonoid content of corn tassel extract

Extract name	Flavonoid(querctin equivalent/g)	Total phenol content(mg GA/100gDW)
Corn tassel	1346.20±86.65	124.47±1968.23

۶-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

عصاره کاکل ذرت دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی است و توانایی بالایی در مهار تکثیر سلول های سرطانی معده دارد[8]. در جدول ۶ مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کاکل ذرت بر حسب DPPH و FRAP ارائه شده است. که این مقدار بر حسب DPPH، ۸۵/۰۵ درصد و بر حسب FRAP، ۲۸۸/۱۱ میکرومول آهن بر لیتر می باشد. Wang et al., 2014 در بررسی مطالعات خود گزارش کردند که فلاونوئیدها، ساپونین و پلی ساکاریدها از غالب ترین ترکیبات موجود در عصاره کاکل ذرت هستند و مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی آنها بر اساس DPPH، به ترتیب ۷۷/۱۸، ۹۰/۳۹ و ۶۰/۲۴ درصد و همچنین بر اساس FRAP به ترتیب ۶۹۱/۰۴، ۲۷۱/۶۵ و ۴۶۲/۵۲ میکرومول بر لیتر است لذا فعالیت آنتی اکسیدانی برجسته ای داشته و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کاکل ذرت به این ترکیبات نسبت داده می شود[19]. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته های Garcia et al., 2021[43] و Khamphasan et al. 2018[44] که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کاکل ذرت را به ترتیب $20/29/61 \frac{molTe}{g} DW$ و $14/29/3 \frac{molTe}{g} DW$ تا $20/085$ (تا $76/8$ تا $81/3$ درصد) گزارش کردند مطابقت دارد.

Table6- Antioxidant activity of corn tassel extract

۴-۵- محتوای فنولی کل و فلاونوئیدی

فنول ها گروه بسیار متنوعی از فیتوکمیکال ها هستند. آنها در دانه های غلات به صورت آزاد و باند شده یافت می شوند [4]. ترکیبات فنولی در گل ها، میوه ها، دانه ها و سایر قسمت های گیاه یافت می شود. ترکیبات فنولی گیاهان به دلیل اثرات ضدالتهابی، ضد سرطانی و کاهش قند خون به دلیل اثرات مفید بر سلامت انسان شناخته می شوند[5]. به طور کلی کاکل و غلاف از ضایعات پس از برداشت گیاه ذرت هستند. به دلیل محتوای بالای ترکیبات زیست فعال در بخش های مختلف گیاه، علاقه مندی برای استفاده بالقوه از این ترکیبات فیتوشیمیایی وجود دارد[6]. از کاکل می توان محصولات با ارزش مانند روغن های فرار، گلیکوزیدهای فلاونول کامفرول، ایزورهمتین و کورستین و لیپیدها تولید کرد چرا که همانطور که گفته شد این بخش از ذرت حاوی فلاونوئید، آلکالوئید، آلدئوئین، پنتوسان، اینوزیتول، پلی ساکارید، ویتامین K و C، چندین نوع اسیدآمین آلی و استرول می باشد[7].

میزان فنول کل و محتوای فلاونوئیدی عصاره کاکل در جدول ۵ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می کنید میزان فنول کل بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم ماده خشک برابر $1968/43$ و مقدار فلاونوئید بر حسب کوئرستین $1346/20$ است. مطابق یافته های Wang et al. 2014 کاکل ذرت حاوی انواعی از ترکیبات زیست فعال از جمله آلکالوئید، فلاونوئیدها، ساپونین ها، پلی ساکاریدها، پنتوزان ها، آلدئوئین، اینوزیتول، ویتامین K&C و استرول ها است [19]. میزان ترکیبات فلاونوئید، ساپونین و پلی ساکاریدها در ذرت به ترتیب $1.67-2.41$ و 4.76 درصد است که این ترکیبات پلی ساکاریدی دارای خواص فیزیولوژیکی از جمله خاصیت آنتی باکتریال دارند[42]. نتایج حاصل از پژوهش ما با یافته های Garcia et al., 2021[43] و Khamphasan

سلولی است. لذا باکتریهای گرم منفی با دیواره مذکور حساسیت کمتری به ترکیبات ضد میکروبی دارند. [26].

فعالیت آنتی میکروبی عصاره کاکل ذرت را می توان به وجود ترکیبات فنولی بالا مانند اسید گالیک، کلروژنیک اسید و کافئیک اسید نسبت داد که تاثیر ضد میکروبی این ترکیبات از طریق تخریب دیواره سلولی، مسدود کردن مسیرهای انتقال یون و ممانعت از سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) است [21]. در واقع باکتریهای گرم منفی به دلیل نوع دیوارهایی که دارند حساسیت کمتری در برابر عوامل ضد میکروبی از خود نشان میدهند، که علت آن میتواند وجود لیپو پلی ساکاریدهای دیواره سلولهای باکتریهای گرم منفی باشد که از ورود مولکولهای آب گریز و بزرگ به داخل سلول ممانعت میکند و از آن جهت که ترکیبات موثر در عصاره گیاهی آب گریز میباشند میتوان نتیجه گرفت که نوع دیواره موجود در باکتریهای گرم منفی مانع نفوذ این ترکیبات به درون سلول و در نتیجه مقاومت باکتریهای گرم منفی به عصارههای گیاهی میشود [45]. مطابق یافته های Elsayed et al., 2022، عصاره کاکل ذرت استخراج شده با اتانول، ناحیه مهار نسبتا پایین تری ($1/8 - 1/9$ میلی گرم بر میلی لیتر) برای باکتری های پاتوژن زا (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *B. cereus* and *S. aureus*) دارد. [21]

Extract name	DPPH radical scavenging activity	FRAP ($\mu\text{mol Fe}+2/\text{L}$)
Corn tassel	85.05±2.61	288.11±24.22

۴-۷- فعالیت آنتی میکروبی عصاره

مطالعات نشان داده است که پلی ساکاریدهای ذرت غیر سمی و دارای رنج وسیعی از خواص فیزیولوژیکی شامل خواص ضدباکتری، ضد تومور، فعالیت ایمنی و هایپوگلیسمی هستند [19]. نتایج ارائه شده در جدول ۷ فعالیت ضد میکروبی عصاره کاکل ذرت را برای ۵ گونه از باکتری های بیماری زای منتقله از غذا شامل باکتری های گرم مثبت (*L. monocytogenes* و *S. aureus*) و باکتری های گرم منفی (*E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa*) را نشان می دهد. تلقیح باکتریایی ۱۰ میکرولیتر به غلظت ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره کاکل ذرت برای تعیین نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی استفاده شد. همانطور که ملاحظه می شود حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری های گرم منفی بیشتر از باکتری های گرم مثبت است. دلیل این امر احتمالا حساسیت بالای این باکتری ها به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره های گیاهی می باشد. باکتریهای گرم منفی یک غشای خارجی نشت ناپذیر دارند که از نظر فیزیوشیمیایی پیچیده تر از غشای دیوارهای

Table 7- Minimum inhibitory concentration (MIC) of Corn tassel extract against pathogenic bacteria

Extract name	Gram-positive bacteria		Gram-negative bacteria		
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Corn tassel	25	25	50	25	50

۵- نتیجه گیری

درون پوشانی عصاره کاکل ذرت مورد ارزیابی قرار گرفت. صمغ دانه ریحان کمترین اندازه ذرات و بالاترین کارایی را نشان داد. بالاترین مقدار پتانسیل زتا و پایداری امولسیون نیز متعلق به پوشش ترکیبی بود. همچنین نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی نشان داد که عصاره کاکل ذرت دارای خاصیت ضد میکروبی است و تاثیر آن بر باکتری های گرم

هدف از این پژوهش بهینه سازی عصاره کاکل ریزپوشانی به روش سطح پاسخ و ارزیابی خواص آنها با دیواره های مختلف (صمغ دانه ریحان و ایزوله پروتئین کنجد) بود. در این پژوهش، کارایی مواد دیواره مختلف و ترکیب آنها در

به منظور بررسی عملکرد این ریزپوشینه ها و کاربردشان در فرمولاسیون غذایی، نیاز به مطالعه آنها در شرایط آزمایشگاهی (In-vitro) است.

۶- منابع

[1] Hosseinnia, M., Almasi, H. and Alizadeh khaledabad, M. (2018). Evaluation of the properties of microcapsules containing Ziziphora clinopodiodesextract stabilized by gum Arabic, whey protein isolate, guar gum and their combinations. *Journal of Food Researches*, 29(4), 101-123.

[2] Adom, K. K., & Liu, R. H. (2005). Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6572-6580.

[3] Kandlakunta, B., Rajendran, A., & Thingnganing, L. (2008). Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. *Food Chemistry*, 106(1), 85-89.

[4] Saura-Calixto, F. (2012). Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: The missing dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(45), 11195-11200.

[5] Capocchi, A., Bottega, S., Spano, C., & Fontanini, D. (2017). Phytochemicals and antioxidant capacity in four Italian traditional maize (*Zea mays* L.) varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(5), 515-524.

[6] Kapcum, C., Uriyapongson, S., & Uriyapongson, J. (2021). Phenolics, anthocyanins and antioxidant activities in waste products from different parts of purple waxy corn (*Zea mays* L.). *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 43(2).

[7] Guven, R. G., Aslan, N., Guven, K., Bekler, F. M., & Acer, O. (2016). Purification and characterization of polyphenol oxidase from corn tassel. *Cellular and Molecular Biology*, 62(13), 6-11.

[8] Duangpapeng, P., Ketthaisong, D., Lomthaisong, K., Lertrat, K., Scott, M. P., & Suriharn, B. (2018). Corn tassel: A new source of phytochemicals and antioxidant potential for value-added product development in the agro-industry. *Agronomy*, 8(11), 242.

[9] Manojlović, V., Nedović, V. A., Kailasapathy, K., & Zuidam, N. J. (2010). Encapsulation of probiotics for use in food products. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 269-302): Springer.

[10] Safari, R., Raftani Amiri, Z., Reyhani Poul., S. and Esmailzadeh Kenari, R. (2022). Evaluation and comparison of antioxidant and antibacterial activity of

مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی است. نتایج حاصل از بهینه سازی به روش سطح پاسخ نشان داد با افزایش غلظت عصاره و زمان هموزنیاسیون در هر استفاده از هر دو دیواره، بازدهی و اندازه ذرات افزایش یافت. با مقایسه مواد دیواره می توان نتیجه گرفت که صمغ دانه ریحان در ترکیب با ایزوله پروتئین کنجد پوشش بهتری برای درون پوشانی است. لذا

phycocyanin extracted from spirulina microalgae (*Spirulina Platensis*) in both pure and nanoencapsulated forms with maltodextrin -sodium caseinate combination coating. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 19(127), 345-358.

[11] McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(6), 577-606.

[12] Sahyon, H. A., & Al-Harbi, S. A. (2020). Antimicrobial, anticancer and antioxidant activities of nano-heart of Phoenix dactylifera tree extract loaded chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo study. *International journal of biological macromolecules*, 160, 1230-1241.

[13] Mohammad Kheshtchin, S., Farahmandfar, R., & Farmani, J. (2022). Effect of homogenization on encapsulation of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel essential oil with basil seed gum. *Innovation Food Technology*. 9(3), 223-238.

[14] Martínez-Ballesta, M., Gil-Izquierdo, Á., García-Viguera, C., & Domínguez-Perles, R. (2018). Nanoparticles and controlled delivery for bioactive compounds: Outlining challenges for new "smart-foods" for health. *Foods*, 7(5), 72.

[15] Saini, C. S., Sharma, H. K., & Sharma, L. (2018). Thermal, structural and rheological characterization of protein isolate from sesame meal. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 426-432.

[16] Onsaard, E., Pomsamud, P., & Audtum, P. (2010). Functional properties of sesame protein concentrates from sesame meal. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 3(4), 420-431.

[17] Younis, M. I., Ren, X., Alzubaidi, A. K., Mahmoud, K. F., Altemimi, A. B., Cacciola, F., ... & Abdelmaksoud, T. G. (2022). Optimized green extraction of polyphenols from *Cassia javanica* L. petals for their application in sunflower oil: Anticancer and antioxidant properties. *Molecules*, 27(14), 4329.

[18] Esmailzadeh Kenari, R., & Razavi, R. (2022). Phenolic profile and antioxidant activity of free/bound phenolic compounds of sesame and properties of encapsulated nanoparticles in different wall materials. *Food science & nutrition*.

[19] Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., & Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical

- scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry*, 126(1), 261-269.
- [20] Sulaiman, S. F., Sajak, A. A. B., Ooi, K. L., & Seow, E. M. (2011). Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. *Journal of Food Composition and analysis*, 24(4), 506-515.
- [21] Elsayed, N., Marrez, D. A., Ali, M. A., El-Maksoud, A. A. A., Cheng, W., & Abdelmaksoud, T. G. (2022). Phenolic profiling and in-vitro bioactivities of corn (*Zea mays* L.) tassel extracts by combining enzyme-assisted extraction. *Foods*, 11(14), 2145.
- [22] Esmailzadeh Kenari & Razavi, R. (2021). Evaluation of Antioxidant Effect of Free and Nano encapsulated Polyphenol of Sesame on Changes in Fatty Acid Profile of Kilka Fish Oil Under Accelerated Conditions. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 15(4), 71-90.
- [23] Velderrain-Rodríguez, G. R., Acevedo-Fani, A., González-Aguilar, G. A., & Martín-Belloso, O. (2019). Encapsulation and stability of a phenolic-rich extract from mango peel within water-in-oil-in-water emulsions. *Journal of functional foods*, 56, 65-73.
- [24] Khorami, M., Hosseini-Parvar, S.H & Motamed zadegan, A. (2021). The influence of Basil seed gum on the stability, particle size and rheological properties of oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate. *Food Processing and Preservation Journal*. 12(2), 139-156.
- [25] Ding, Q., Tian, G., Wang, X., Deng, W., Mao, K., & Sang, Y. (2021). Effect of ultrasonic treatment on the structure and functional properties of mantle proteins from scallops (*Patinopecten yessoensis*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105770
- [26] Gul, O., Saricaoglu, F. T., Atalar, I., Gul, L. B., Tornuk, F., & Simsek, S. (2023). Structural Characterization, Technofunctional and Rheological Properties of Sesame Proteins Treated by High-Intensity Ultrasound. *Foods*, 12(9), 1791.
- [27] Hosseini, S.M.H., Nejadmansori, M. & Niyakosari, M. (2016). Stability of fish oil nanoemulsion stabilized with whey protein isolate (prepared by ultrasonic method) during storage. The first international congress and the 24th national congress of food science and industries of Iran. <https://civilica.com/doc/574004>
- [28] Razavi R, Kenari RE, Farmani J, Jahanshahi M. (2020). Fabrication of zein/alginate delivery system for Nano food model based on pumpkin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165:3123-34.
- [29] Pourshaygan, M., Esmailzadeh Kanari, R. & Farahmandfar, R. (2019). Separated and Combined Effects of Nano Coating of Basil seed gum and perfoliatum seed gum Containing Kiwi Peel Extract to Increase Shelf Life of Sheep's Meat. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(88), 83-95.
- [30] Li, X., Wang, L., & Wang, B. (2017). Optimization of encapsulation efficiency and average particle size of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides nanoemulsions using response surface methodology. *Food chemistry*, 229, 479-486.
- [31] Tarighati, H., Raftani Amiri, Z. and Esmailzadeh Kenari, R. (2021). Comparison of free and encapsulated extracts of *Mentha pulegium*'s leaves in *Allysum homolocarpum*, chitosan and chitosan-*Allysum homolocarpum* on oxidative stability of soybean oil during 18 days' incubation conditions. *Journal of Food Researc*, 32(3), 29-60.
- [32] Wang, T.; Chen, X.; Wang, W.; Wang, L.; Jiang, L.; Yu, D.; Xie, F. (2021). Effect of ultrasound on the properties of rice bran protein and its chlorogenic acid complex. *Ultrason. Sonochem.* 79, 105758. [CrossRef]
- [33] Herculano, E. D., de Paula, H. C., de Figueiredo, E. A., Dias, F. G., & Pereira, V. D. A. (2015). Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. *LWT - Food Sci. Technol.*, 61(2), 484-491
- [34] Carmona, P. A., Tonon, R. V., da Cunha, R. L., & Hubinger, M. D. (2013). Influence of emulsion properties on the microencapsulation of orange essential oil by spray drying. *J. Colloid Sci. Biotechnol*, 2(2), 130-139
- [35] Maleki, O., Khaledabad, M. A., Amiri, S., Asl, A. K., & Makouie, S. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in whey protein isolate -crystalline Nano cellulose -inulin composite enhanced gastrointestinal survivability. *LWT*, 126, 109224.
- [36] Abbasi Ghaznaq, M., Rezazadeh Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M. & Amiri, S. (2023). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 with composite wall of xanthan gum, soy protein isolate and fructooligosaccharide: investigation microcapsule characteristics. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 19(133), 297-308.
- [37] Jamshidi M, Esmailzadeh Kenari R, Motamedzadegan A and Biparava P. (2020). Encapsulation of Unsaponifiable Matter of Rice Bran Oil By chitosan and *Lepidium perfoliatum* Seed Gum: Characterization and Antioxidant Activity, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 7(21):1-9.
- [38] Akbari, E., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A., Alami, M. & Kashaninejad, M. (2016). Effect of sage seed gum and soybean protein isolates on the oil in water emulsion stability. *Innovative Food technologies*, 3(2), 23-32.
- [39] Dickinson, E., Murray, B. S., Stainsby, G., & Anderson, D. M. (1988). Surface activity and

emulsifying behaviour of some Acacia gums. *Food Hydrocolloids*, 2(6), 477-490.

[40] Ghafoori, Z., Fazlara, A., Pourmahdi, M. and Bavarsad, N. (2022). Evaluation of physical and chemical stability of Omega -3 nanoemulsion and its antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 128(19), 119-131.

[41] Shahrampour, M. & Razavi, S.M.A. (2022). Evaluation of stability antimicrobial and antioxidant activity of macromulsion and nanoemulsion of rosemary essential oil. *Innovative Food technologies*, 9(3), 195-207.

[42] Wang, L. C., Yu, Y. Q., Fang, M., Zhan, C. G., Pan, H. Y., Wu, Y. N., & Gong, Z. Y. (2014). Antioxidant and antigenotoxic activity of bioactive extracts from corn tassel. *Journal of Huazhong*

University of Science and Technology [Medical Sciences], 34, 131-136.

[43] Díaz-García, A., Salvá-Ruíz, B., Bautista-Cruz, N., & Condezo-Hoyos, L. (2021). Optimization of a natural low-calorie antioxidant tea prepared from purple corn (*Zea mays* L.) cobs and stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *LWT*, 150, 111952.

[44] Khamphasan, P., Lomthaisong, K., Harakotr, B., Ketthaisong, D., Scott, M. P., Lertrat, K., & Suriharn, B. (2018). Genotypic variation in anthocyanins, phenolic compounds, and antioxidant activity in cob and husk of purple field corn. *Agronomy*, 8(11), 271.

[45] Aminian, R., Mardani, M. and Davoodnia, B. (2018). The effect of hydro alcoholic extract of *Plantago major* and *Astragalus hamosus* on some gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of plant research (Iranian Journal of Biology)*, 31(3), 556-567.



Optimization of Nano encapsulated corn tassel extract by response surface methodology and evaluation of the properties of Nanoencapsules containing extract stabilized by basil seed gum and combination of basil seed gum and sesame protein isolate

Zaker Aghakeshipour¹, Zeynab Raftani Amiri^{2*}, Reza Esmailzadeh Kenari²

1- Ph. D Student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Engineering, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Article History: Received:2023/8/19 Accepted:2023/11/18</p>	<p>In this study, basil seed gum (BSG) alone, and in combination with sesame protein isolate (SPI) were used in ratios 1:0 and 1:1 in order to encapsulate corn tassel extract (CTE) using the response surface method in the central composite design template was used. Also, the quadratic equation was used to optimize and investigate the effect of the concentration of corn tassel extract and homogenization time on the response of particle size and efficiency. At first, total phenolic content (TPC), antioxidant activity and antibacterial activity of corn tassel extract were investigated. In addition, the measured antioxidant activity (DPPH&FRAP) showed a very high potential of these compounds (FRAP=288.11, DPPH=85.05) for encapsulation. The content of total phenol and flavonoids obtained from the test results were 1968.23 and 1346.20, respectively. The analysis results showed that the nanoparticles obtained from coating basil seed gum had the lowest particle size (494.4nm). Also, the highest coating efficiency (76.2%) belongs to the sample coated with basil seed gum. The value of zeta potential increased (+44.57) in the use of composite coating, and reached its highest value. During the storage of encapsulated Nano emulsion in the period of 0,3,7,15 and 21 days, the stability of nanoemulsions decreased with the passage of time, in such a way that, the highest stability related to encapsulated Nano extract in the combined coating (94.85 per day zero and 33.8 for day 21). The result of this study showed that nanoencapsulated of corn tassel extract with basil seed gum is more effective than the combined coating. But by checking other parameters (such as stability), It is suggested to use this gum in combination with other wall materials, including sesame protein isolates, to achieve the desired results.</p>
<p>Keywords:</p> <p>Tassel extract, encapsulate, particle size, wall material, optimization</p>	
<p>DOI: 10.22034/FSCT.21.149.81.</p> <p>*Corresponding Author E-Mail: zramiri@gmail.com; z.raftani@sanru.ac.ir</p>	