



کاربرد روش رسوب ضدحلال در ریزپوشانی عصاره‌های هسته رقم خرماي ربي در بیوپلیمر پروتئینی زئین

عبدالواحد صفرزائی^۱، رضا اسماعیل زاده کناری^{۲*}، رضا فرهمندفر^{۳*}، احمد مهرآوران^۴، حامد فنایی^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۴- دانشیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

۵- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۳

کلمات کلیدی:

فراصوت،

هسته خرماي ربي،

حامل زئین،

نانوریزپوشانی،

رسوب ضدحلال

DOI: 10.22034/FSCT.20.145. 188

* مسئول مکاتبات:

r.farahmandfar@sanru.ac.ir ،

reza_kenari@yahoo.com

هدف از این مطالعه، بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی استخراجی از هسته رقم خرماي ربي به روش فراصوت و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات زئین بارگذاری شده با این عصاره‌ها بود. تیمار فراصوت جهت استخراج عصاره متانولی از پودر هسته خرما و روش رسوب ضدحلال جهت ریزپوشانی عصاره‌های متانولی هسته خرما به میزان ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ گرم در حامل بیوپلیمری زئین مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، میزان ترکیبات فنولی کل و IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از هسته خرماي ربي در زمان ۴۵ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حمام فراصوت و غلظت حلال متانول ۷۰ درصد به ترتیب ۳۶۹/۷۴ میلی‌گرم اکسی‌والان اسید گالیک بر گرم وزن خشک و ۵/۰۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. با افزایش نسبت عصاره ریزپوشانی شده در حامل زئین از ۰/۱ تا ۰/۴، میزان کارایی ریزپوشانی از ۸۵/۹۰ به ۹۵/۱۹ درصد و اندازه ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی از ۱۲۹/۹۵ به ۱۸۳/۳۰ نانومتر افزایش و میزان پتانسیل زتا نانوذرات از ۱۹/۱۵+ به ۴۸/۱۴ میلی‌ولت کاهش یافت. میزان اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین فاقد عصاره به ترتیب ۱۰۹/۳۰ نانومتر و ۲۱/۹۶+ میلی‌ولت تعیین گردید. نتایج آنالیز ATR-FTIR بیانگر آن بود که با افزایش نسبت عصاره متانولی ریزپوشانی شده در حامل زئین، پیک کشش پیوند O-H...O از ۳۲۹۲/۸۵ به ۳۲۹۴/۸۵ cm⁻¹ تغییر و افزایش یافته است. در بررسی تصاویر FE-SEM، نانوذرات زئین فاقد عصاره و بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما دارای مرفولوژی نیمه کروی بودند. به طور کلی، ماهیت آبگریز حامل زئین باعث اتصال آن با ترکیبات فنولی عصاره هسته خرماي ربي از طریق ایجاد اینتراکشن‌های غیرکوالانسی، واندروالسی، هیدروژنی و هیدروفوب گردیده است. از این رو، زئین می‌تواند به عنوان یک حامل قدرتمند در ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

در سالیان اخیر، استقبال فراوانی از مواد فیتوشیمیایی زیست‌فعال نوین مشتق شده از گیاهان دارویی خاص به منظور ارتقاء شاخص‌های سلامتی آحاد جامعه به عمل آمده است. این امر ناشی از اثرات سلامتی‌بخش این ترکیبات زیست‌فعال بر سلامت بشر می‌باشد [۱]. ترکیبات عملگرای زیست‌فعال به طور کلی به دو دسته مولکول‌ها (مانند ویتامین‌ها، اسیدهای چرب، کاروتنوئیدها، استرول‌های گیاهی، پلی‌فنول‌ها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها) و سلول‌های زنده (پروبیوتیک‌ها) تقسیم‌بندی می‌شوند [۲]. ترکیبات زیست‌فعال مختلف موجود در عصاره‌ها و اسانس‌های استخراجی از گیاهان از جمله ترکیبات فنولی دارای خواص ارزشمندی نظیر ضدآلرژی، ضدالتهاب، ضد-میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضددیابتی و ... می‌باشند [۳]. علیرغم آن که عصاره‌ها و اسانس‌ها به عنوان متابولیت‌های فرار گیاهی به دلیل وجود این خصوصیات با ارزش به طور گسترده‌ای در پزشکی، لوازم آرایشی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این حال، کاربرد آنها هنوز به دلیل اشکالاتی نظیر حلالیت کم در آب، فراریت و ثبات اندک در غذاها کاملاً موثر نیست. علاوه بر این، عصاره‌ها و اسانس‌ها می‌توانند طعم‌های نامطلوبی را در مواد غذایی ایجاد کنند و اثرات منفی را بر کیفیت حسی فرآورده‌ها به دنبال داشته باشند. از طرف دیگر، عصاره‌ها و اسانس‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی در برابر استرس‌های محیطی نظیر حرارت، pH، اکسیژن و نور حساس و ناپایدار هستند [۴]. این امر کاربرد مستقیم آنها در فرمولاسیون‌های غذایی را محدود می‌کند. پیشرفت‌های انجام شده در زمینه فناوری نانو در سالیان اخیر به صنعت این اجازه را داده است تا این موانع را برای استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به عنوان عامل نگهدارنده، دارای ارزش تغذیه‌ای و سلامتی‌بخش برطرف کند. نانوریزپوشانی، فرآیند ریزپوشانی داروها و ترکیبات زیست‌فعال درون ماتریس حامل با هدف محافظت از آنها در برابر تخریب بیولوژیکی، افزایش ماندگاری مولکول‌های زیست‌فعال، جلوگیری از تجزیه اکسیداتیو آنها، تعدیل سینتیک انتشار، توزیع زیستی، کنترل رهایش ترکیبات زیست‌فعال و بهبود خواص حسی و بافتی

مواد غذایی می‌باشد. فناوری نانوریزپوشانی دارای توانایی رویارویی با چالش‌های صنعت غذا در زمینه تحویل کارآمد ترکیبات عملگرای زیست‌فعال و نیز مدیریت رهایش اجزاء طعم-دهنده مواد غذایی است [۵]. کاهش اندازه ذرات در مقیاس نانو (کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر) می‌تواند نقش عمده‌ای را در زیست-دسترس‌پذیری، حلالیت و تحویل هدفمند ترکیبات مغذی در اثر افزایش نسبت سطح به حجم داشته باشد [۶].

انواع ماتریس حامل در فناوری نانو به سه دسته لیپیدی، پلیمری و لیپیدی-پلیمری طبقه‌بندی می‌شوند. سمیت بالقوه پلیمرها، فقدان روش‌های تولید در مقیاس گسترده برای پلیمرها و نیز محدودیت در کاربرد بیوپلیمرهای مناسب (پروتئین و کربوهیدرات) و در نهایت، نیاز به استفاده از حلال‌های آلی، استفاده از نانوحامل‌های پلیمری را محدود ساخته است. با وجود فواید بی‌شمار نانوحامل-های پروتئینی و کربوهیدراتی، امکان صنعتی شدن آنها به دلیل کاربرد فرآیندهای حرارتی یا شیمیایی پیچیده گسترده با عدم قابلیت کنترل کامل وجود ندارد [۷].

زئین به عنوان حامل بیوپلیمری، یک پلی‌آمین و پروتئین اصلی ذرت است. زئین یک پلیمر آبگریز بوده و همچنین یک ماده ترموپلاستیک می‌باشد. این پروتئین به دلیل آبگریز بودن، شفاف و غیرمحلول در آب است و در برابر باکتری‌ها مقاوم بوده و ذاتا دارای فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد [۸]. از جمله ویژگی‌های منحصربفرد انتخاب زئین به عنوان حامل در ریزپوشانی می‌توان به مقاومت بسیار زیاد آن به آنزیم‌های هضم-کننده و قابلیت هضم کمتر در دستگاه گوارش و کاربرد گسترده در تحویل ترکیبات زیست‌فعال از طریق ریزپوشانی آسان مولکول‌های آبگریز بواسطه برهمکنش‌های هیدروفوبی قوی با آنها اشاره کرد [۹].

امروزه هسته خرما که جزء ضایعات میوه خرما محسوب می‌شود به دلیل ویژگی‌های دارویی و دارا بودن اجزاء تغذیه‌ای مختلف نظیر انواع ویتامین‌ها، قندها، کربوهیدرات-ها، فیبرهای رژیمی، مواد معدنی، اسیدهای آمینه و لیپیدها مورد توجه قرار گرفته است [۱۰]. هسته خرما غنی از

پروتئین (۵/۱ گرم در ۱۰۰ گرم)، چربی (۹ گرم در ۱۰۰ گرم)، فیبرهای رژیمی (۷۳/۱ گرم در ۱۰۰ گرم)، فنولیک‌ها (۳۹۴۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) و آنتی‌اکسیدان‌ها (۸۰۴۰۰ میکرومول در ۱۰۰ گرم) می‌باشد [۱۱]. میزان قند هسته خرما پایین بوده و در حدود ۷/۲-۷/۶ درصد می‌باشد [۱۲]. اسیدهای فنولیک شناسایی شده در هسته خرما شامل اسید گالیک، پروتوکاتچونیک اسید، وانیلیک اسید، کافئیک اسید، p-کوماریک اسید، فرولیک اسید، m-کوماریک اسید و o-کوماریک اسید می‌باشند [۱۳]. عصاره‌های استخراجی از هسته خرما دارای عملکرد کارآمدی در درمان آسیب‌های عصبی با کاهش استرس اکسیداتیو مغز می‌باشند [۱۴]. فیبر غذایی موجود در پودر و عصاره هسته خرما نقش مهمی را در پیشگیری از دیابت، چاقی و هیپرلیپیدمی و نیز نقش محافظتی در برابر فشار خون، بیماری عروق کرونر قلب، کلسترول، سرطان روده بزرگ، سرطان پروستات و اختلالات روده‌ای ایفا می‌کند [۱۵].

خرمای ربی^۱ جزء خرماهای بومی استان سیستان و بلوچستان محسوب می‌شود که در شهرستان‌های زابل، سراوان، ایرانشهر و چابهار کشت می‌گردد. رنگ خرمای ربی، قهوه‌ای تیره تا سیاه می‌باشد. هسته خرمای ربی کوچکتر از گوشته بوده و شستشوی آن با توجه به پوست و بافت آن راحت است. خرمای ربی در گروه خرماهای نیمه خشک با میزان رطوبت کمتر از ۱۴ درصد طبقه‌بندی می‌شود. اندازه این رقم خرما کمی بلند بوده و طول طبیعی آن بین ۳-۵ سانتی‌متر می‌باشد. تاکنون مطالعات محدودی در دنیا پیرامون بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های هسته رقم خرمای ربی انجام شده است. رادفر و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای به بررسی میزان ترکیبات فنولی کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی و پروفایل ترکیبات فنولی عصاره‌های استخراجی از هسته رقم خرمای ربی با حلال اتانول ۸۰ درصد به روش ماسراسیون پرداختند و میزان ترکیبات فنولی کل و IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از هسته رقم خرمای ربی را به ترتیب ۲۴۲۳ میلی‌گرم اکی‌والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن

خشک و ۲۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و نیز پروفایل ترکیبات فنولی عصاره هسته رقم خرمای ربی را شامل گالیک اسید، وانیلیک اسید، ۳-و-۴-دی‌هیدروکسی بنزوئیک اسید، ۵-و-۲-دی-هیدروکسی بنزوئیک اسید، سینامیک اسید، کافئیک اسید و کلروژنیک اسید گزارش کردند [۱۶]. علاوه بر این تاکنون، مطالعه‌ای پیرامون استفاده از حامل زئین جهت ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما و بررسی ویژگی‌های ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما انجام نشده است. با این وجود، جیوان، یارمند و مددلو (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، اقدام به ریزپوشانی عصاره‌های آبی استخراجی از هسته رقم خرمای کبکاب با استفاده از نانوکریستال‌های نشاسته در سیستم میکروامولسیون و بررسی پارامترهای ریزپوشانی نمودند و میانگین اندازه، توزیع اندازه و پلی‌دیسپرسیته نانوکریستال‌های نشاسته بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما را به ترتیب ۱۹۸ نانومتر، ۱۰۵-۳۷۶ نانومتر و ۰/۱۶۲، کارایی ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما در نانوکریستال‌های نشاسته را ۶۲ درصد و مرفولوژی نانوکریستال‌های فاقد عصاره و بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما را به صورت نیمه کروی گزارش کردند [۱۷]. صادقی، مددلو و یارمند (۲۰۱۴) در تحقیقی دیگر، اقدام به ریزپوشانی عصاره‌های آبی استخراجی از هسته رقم خرمای کبکاب با استفاده از میکروامولسیفیکاسیون-تشکیل ژل سرد پروتئین‌های آب پنیر و بررسی پارامترهای ریزپوشانی نمودند. این محققان، میانگین اندازه ایزوله پروتئین آب پنیر پس از تیمار حرارتی، ذرات فاقد عصاره و کپسول‌های بارگذاری شده با عصاره را به ترتیب ۲۳، ۳۰۴ و ۲۳۰ نانومتر و نیز تبدیل جزئی باند آمید نوع اول در ایزوله پروتئین آب پنیر به باند آمید نوع دوم در ذرات و کپسول‌ها و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی را در آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز گزارش کردند. علاوه بر این، مرفولوژی کروی بیشتر ذرات را در اثر ریزپوشانی بدون تاثیر بر رفتار حرارتی آنها ارائه نمودند [۱۸]. با توجه به نقش فناوری نانو در حفاظت از ترکیبات زیست‌فعال عصاره‌های هسته خرما، فراهم نمودن امکان غنی‌سازی نانو مواد غذایی، افزایش زیست‌دسترسی، رهايش هدفمند و اثربخشی عصاره‌های هسته خرما در پیشگیری و درمان بیماری‌ها در این تحقیق سعی بر آن است تا پتانسیل زئین به عنوان حامل بیوپلیمری در

ریزپوشانی عصاره‌های متانولی هسته رقم خرماي ربي مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-محلولا و مواد شیمیایی

کلیه محلول‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید آنالیتیکال بودند. معرف فولین سیوکالچو، اسیدگالیک تک آبه، کربنات سدیم بدون آب (Na_2CO_3)، حلال اتانول ۹۶ درصد، حلال متانول با خلوص بیشتر از ۹۹/۹ درصد و اسید استیک گلاسیال از کمپانی مرک آلمان، آب مقطر دوبار تقطیر از شرکت زلال طب شیمی ایران، پودر ۲و۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و پودر زئین از کمپانی سیگما آمریکا تهیه شده بودند.

۲-۲-آماده‌سازی پودر هسته خرما

میوه درخت خرما (*Phoenix dactylifera* L.) رقم ربي از نخلستان‌های شهرستان زابل از توابع استان سیستان و بلوچستان در شهریور ماه سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری و پس از جداسازی هسته از گوشته جهت حذف بقایای خرما با آب مورد شستشو قرار گرفت. پس از آن، هسته‌ها به مدت یک هفته در محیط آزمایشگاه بر روی صافی قرار داده شدند تا به طور کامل خشک گردند. در ادامه، هسته‌های خشک شده توسط آسیاب صنعتی مخصوص مجهز به سیستم خنک‌کننده (ساخت شرکت فلاوینا، ایران)، تحت خلاء پودر گردیده و پودرهای حاصل از الکی با قطر منافذ یک میلی‌متر عبور داده شدند.

۲-۳-استخراج عصاره متانولی به روش فراصوت

میزان ۲۵ گرم از نمونه پودر هسته خرما با ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول ۷۰ درصد به نسبت ۱:۴ حجمی/وزنی مخلوط و با استفاده از مگنتیک شیکر با ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۳۰ دقیقه به طور یکنواخت همگن گردید. در فرآیند استخراج عصاره به روش فراصوت از ظروف دربدار با گنجایش ۵۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد تا در حین فراصوت‌دهی با حمام فراصوت در فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز و توان ۴۸۰ وات، تبخیر حلال تا حد امکان کاهش یابد. در فرآیند استخراج عصاره با حمام فراصوت

(Bandelin مدل DT 102H ساخت کشور آلمان) از دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و زمان ۴۵ دقیقه استفاده گردید. پس از اتمام تیمار فراصوت، عصاره استخراج شده از پودر هسته خرما با استفاده از سانتریفوژ (ATP مدل RF14000 ساخت کشور آلمان) با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۳۰ دقیقه از مواد جامد گیاهی جدا گردیده و از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. در ادامه، جداسازی حلال و تغلیظ عصاره توسط دستگاه تبخیرکننده چرخشی تحت خلاء (Heidolph مدل Hei-VAP Value Digital ساخت کشور آلمان) در دمای ۴۰ درجه سلسیوس با هدف ممانعت از آسیب به ترکیبات فنولی و ۲۰۰ دور در دقیقه انجام شد. به منظور حذف باقیمانده حلال، عصاره تغلیظ شده بر روی پلیت پخش و درون آون خلاء با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا به طور کامل خشک گردد. سپس عصاره تا انجام فرآیند آزمون در فریزر با دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید [۳].

۲-۴-آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

۲-۴-۱-اندازه‌گیری ترکیبات فنلی کل^۱

میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره‌های استخراجی از هسته خرما از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین سیوکالچو مورد ارزیابی قرار گرفت [۳]. در این روش، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره تهیه شده (با غلظت ۱۰۰۰ ppm در حلال اتانول ۷۰درصد) با سمپلر به لوله آزمایش انتقال داده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین سیوکالچو و ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه و به خوبی همگن گردید. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱۵۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰درصد در دمای اتاق به لوله اضافه و توسط شیکر لوله به طور مناسب یکنواخت گردید. محتویات لوله آزمایش به مدت ۲ ساعت در محیطی تاریک و در دمای اتاق نگهداری شد و سپس میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO مدل 2150 ساخت ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۷۶۰ نانومتر مورد خوانش قرار گرفت. میزان ترکیبات فنولی کل موجود در عصاره از روی معادله خط بدست آمده از منحنی استاندارد جذب-غلظت اسید گالیک

¹ - Total Phenolic Content (TPC)

بر حسب میلی گرم اکی والان اسید گالیک در گرم عصاره گزارش شد (معادله ۱).

$$Y = 2/950.7 X - 0.39$$

$$R^2 = 0.9951$$

که در این معادله Y: میزان جذب و X: میزان ترکیبات فنولی کل بر حسب میلی گرم اکی والان اسید گالیک در میلی لیتر می باشد.

۲-۴ تعیین میزان فعالیت مهار رادیکال های آزاد

به منظور تعیین میزان فعالیت مهار رادیکال های آزاد عصاره های استخراجی از هسته خرما از آزمون DPPH و معرف ۲۰۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل استفاده شد [۳]. در این آزمون، میزان ۵ میلی لیتر از محلول متانولی DPPH ۰/۰۰۴ درصد به ۵۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف عصاره تهیه شده با حلال متانول (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ ppm) اضافه گردید و پس از اختلاط، در دمای اتاق و محیطی تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری و سپس جذب نمونه ها و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مورد خوانش قرار گرفت. میزان فعالیت مهار رادیکال های آزاد DPPH بر حسب درصد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

میزان جذب نمونه - میزان جذب شاهد	میزان فعالیت
میزان جذب شاهد	مهار رادیکال -
$\times 100$	های آزاد
	=(درصد)

۲-۵ ریزپوشانی عصاره هسته خرما

ریزپوشانی عصاره متانولی استخراجی از پودر هسته رقم خرمای ربی در حامل زئین با استفاده از روش مبتنی بر متد ضدحلال با برخی اصلاحات انجام گردید [۱۹]. بدین منظور، جهت تهیه فاز حلال، غلظت های مختلف عصاره متانولی از طریق انحلال پودر عصاره متانولی با مقادیر ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ گرم در

حلال دوگانه اتانول/آب (با نسبت ۷۰ به ۳۰ حجمی/حجمی) با استفاده از مگنتیک شیکر در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و رساندن حجم نهایی محلول به ۱۵ میلی لیتر (تهیه غلظت های عصاره به ترتیب ۰، ۳/۳، ۶/۶، ۱۰ و ۱۳/۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و پس از رسیدن دمای محلول به دمای محیط، انحلال میزان ۰/۵ گرم از پودر زئین در آن (غلظت محلول زئین ۳۳/۳ میلی گرم بر میلی لیتر) و همزدن محلول تهیه شده بر روی مگنتیک شیکر در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ ساعت و سپس همگن سازی بیشتر آن توسط هموژنایزر مکانیکی دیجیتال (IKA مدل T18 Digital Ultra Turax ساخت کشور آلمان) با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تهیه شدند. از این رو، نسبت عصاره به زئین به ترتیب ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ حاصل گردید. سپس دیسپرسیون ها به منظور کاهش بیشتر اندازه ذرات تحت پیش تیمار فراصوت با هموژنایزر فراصوت نوع پروپ با فرکانس ثابت ۲۰ کیلوهرتز Bandelin Sonopuls مدل HD 2070 ساخت کشور آلمان (با تعداد ۶ سیکل، زمان هر سیکل ۳۰ ثانیه و زمان استراحت ۱۵ ثانیه بین سیکل ها) در حمام یخ قرار داده شدند. در ادامه، فاز حلال توسط بورت با میانگین سرعت جریان ۱ قطره در هر ثانیه به فاز ضدحلال (۴۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه) در حال اختلاط بر روی مگنتیک شیکر با ۱۵۰۰ دور در دقیقه اضافه گردید. با تشکیل رسوب سریع در دمای محیط، سوسپانسیون هایی از نانوذرات زئین در آب بدست آمد. در ادامه، بلافاصله سوسپانسیون ها به لوله های فالكون منتقل و تحت سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پلت های تشکیل شده پس از جداسازی و انتقال به پلیت به مدت ۴۸ ساعت تحت خشک کردن انجمادی با فریز درایر Zirbus مدل VaCo 2 ساخت کشور آلمان) در فشار ۰/۰۱۷ میلی پاسکال و دمای ۵۷- درجه سانتیگراد و سپس آسیاب (خرد کردن با آسیاب برقی و ساییدن در هاون از جنس عقیق) به منظور دستیابی به نمونه های نانوذره ای پودری جامد قرار داده شدند. در نهایت، نمونه های پودر شده تا زمان انجام آزمون در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

۲-۶ آزمون های ریزپوشانی

۶-۲-۱ ارزیابی کارایی ریزپوشانی

تعیین میزان عصاره ریزپوشانی شده با استفاده از میزان ترکیبات فنولی کل موجود در هر کپسول انجام گردید [۲۰]. بدین منظور، جهت استخراج عصاره از کپسول‌ها، میزان ۲۰۰ میلی‌گرم از هر کپسول به ۲ میلی‌لیتر محلول استخراجی شامل متانول: اسید استیک: آب به ترتیب با نسبت ۴۲:۸:۵۰ (حجمی/حجمی/حجمی) اضافه و به مدت ۱ دقیقه با استفاده از شیکر لوله همگن و پس از آن تحت تیمار با امواج حمام فراصوت با توان ۴۸۰ وات، فرکانس ثابت ۳۵ کیلوهرتز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. در ادامه، عملیات سانتریفوژ با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. میزان ترکیبات فنولی کل محلول رویی استخراج شده با استفاده از روش رنگ سنجی فولین سیوکالچو مورد ارزیابی قرار گرفت [۳]. کارایی ریزپوشانی بر حسب درصد از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{کارایی ریزپوشانی (درصد)} = \frac{\text{میزان ترکیبات فنولی ریزپوشانی شده}}{\text{میزان اولیه ترکیبات فنولی موجود}} \times 100$$

۶-۲-۲ ارزیابی اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات

اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات به روش پراکنش نور دینامیک^۱ با استفاده از دستگاه زتا سایزر^۲ (Particulate systems مدل HD NanoPlus ساخت ایالات متحده آمریکا) و از طریق انحلال نمونه‌ها در حلال اتانول ۷۰ درصد (به دلیل عدم انحلال نانوذرات زئین در آب مقطر و حلالیت بالای آن در حلال اتانول با غلظت‌های بیشتر از ۶۰ درصد) با نسبت ۱ به ۱۰۰ در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با زاویه پراکنش ۹۰ درجه و در طول موج ۶۵۷ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۲۱].

۶-۲-۳ طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز تجهیز شده با بازتابش کلی کاهش یافته^۳

طیف‌های مادون قرمز نانوذرات زئین فاقد عصاره، عصاره متانولی و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی با استفاده از طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز تجهیز شده با بازتابش کلی کاهش یافته (Bruker مدل TENSOR II ساخت کشور آلمان) در محدوده عدد موج ۴۰۰۰-۵۰۰ cm^{-1} (۱۶ اسکن برای هر نمونه در رزولوشن ۴ cm^{-1}) ثبت گردیدند [۲۲]. در این روش، میزان ۵ میلی‌گرم از نمونه نانوذرات کاملاً نرم شده در هاون از جنس عقیق بر روی سطح کریستال الماس ATR قرار داده شده و همزمان با اعمال فشار یکنواخت تا حدود ۷۵ psi بر نمونه، طیف‌های فروسرخ مربوطه تهیه و قرائت گردیدند. از نرم افزار OPUS جهت تجزیه و تحلیل عملکرد FTIR استفاده شد.

۶-۲-۴ بررسی ریزساختار نانوذرات

ریزساختار (شکل، مرفولوژی و یکپارچگی در پوشش) نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی^۴ (KYKY مدل EM8000F ساخت کشور چین) مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۳]. برای این منظور، نمونه‌های نانوذره پودری بر روی سطح پلیت سیلیکونی پاشیده شده و سپس با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند. در ادامه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی با ولتاژ شتاب‌دهنده ۱۰ کیلوولت عکس-برداری انجام گردید.

۷-۲ روش آماری

مقایسات میانگین نتایج آزمون‌های ریزپوشانی عصاره استخراجی از هسته رقم خرمای ربی در حامل زئینی با استفاده از آزمون توکی^۵ در سطح ۹۹ درصد ($\alpha=1\%$) به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۸ انجام شد.

3 - Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

4 - Field Emission-Scanning Electron Microscope (FE-SEM)

5 - Tukey test

1 - Dynamic Light Scattering (DLS) method

2 - Zeta-sizer

۳- نتایج و بحث

۳-۱ میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی پودر هسته رقم خرما ی ربی

در این مطالعه، میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته رقم خرما ی ربی در زمان ۴۵ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حمام فراصوت و غلظت حلال متانول ۷۰ درصد، 369.74 ± 0.85 میلی گرم اکی‌والان اسیدگالیک در گرم وزن خشک عصاره بدست آمد. رادفر و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از پودر هسته رقم خرما ی ربی با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد به روش غرقابی را 2423 میلی گرم اکی‌والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن خشک عصاره گزارش کردند [۱۶] که این میزان در مقایسه با مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرما به روش فراصوت در مطالعه اخیر به مراتب کمتر می‌باشد. دهقانیان و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از هسته‌های خرما به روش غرقابی را $175/4$ میلی گرم اکی‌والان اسید گالیک در گرم گزارش کردند [۲۴] که این میزان در مقایسه با مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته خرما به روش فراصوت در مطالعه اخیر کمتر می‌باشد. ال-فارسی^۱ و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای بیشترین میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از سه رقم خرما ی بومی کشور عمان به روش غرقابی را در محدوده ۳۱۰۲-۴۴۳۰ میلی گرم اکی‌والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن مرطوب گزارش کردند [۲۵]. این میزان در مقایسه با مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر به مراتب کمتر می‌باشد. این تفاوت در میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از هسته‌های ارقام خرما نسبت به مطالعه اخیر می‌تواند تا حد زیادی به اثر کارآمد امواج فراصوت در استحصال ترکیبات ارزشمند از مواد گیاهی در زمان کوتاه نسبت به روش سنتی استخراج غرقابی نسبت داده شود. تیمار فراصوت با

محتوای انرژی بالای امواج باعث ایجاد نیروی برشی، شکستن و متلاشی کردن دیواره‌های سلولی و افزایش احتمال رهایش محتویات گیاه به محیط استخراج، بهبود سرعت انتقال جرم و کوتاه شدن زمان استخراج می‌گردد. پارامتر زمان فراصوت‌دهی، مدت انتقال جرم را افزایش می‌دهد [۳، ۲۶]. پارامتر دمای فراصوت‌دهی نیز منجر به افزایش حلالیت پلی‌فنول‌ها و تسریع فرآیند انتقال جرم پلی‌فنول‌ها از سلول‌های گیاهی به محیط استخراج می‌شود [۲۷]. انرژی حرارتی با تخریب ساختار سلولی ماتریس باعث افزایش راندمان استخراج می‌گردد. تخریب ساختار سلول باعث افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی و تجزیه متابولیت‌های ثانویه حاصل از برهم‌کنش‌های ماتریس (پلی‌فنول‌ها با لیپوپروتئین‌ها) و از این رو، افزایش حلالیت و انتقال جرم پلی‌فنول‌ها می‌شود. علاوه بر این، افزایش دمای حلال می‌تواند منجر به کاهش کشش سطحی و در نتیجه افزایش مرطوب شدن مواد گیاهی و استخراج کارآمدتر شود. دمای بالا منجر به کاهش ویسکوزیته محیط استخراج و نفوذ حلال به ذرات گیاه گردیده و از این رو، فرآیند استخراج، بهبود یافته و تسریع می‌گردد [۲۸]. سیستم‌های حلال دوگانه (الکل-آب) به دلیل میل ترکیبی بسیار با ترکیبات فنولی، راندمان استخراج پلی‌فنول‌ها را افزایش می‌دهند. علاوه بر این، حلال‌های با قطبیت و کشش سطحی بالا و ویسکوزیته و فشار بخار نسبتاً پایین نظیر ترکیب آب و متانول از هم‌گسیختگی سلولی و رهایش ترکیبات استخراجی را تسهیل نموده و منجر به افزایش شدت کاویتاسیون فراصوت و به تبع افزایش نفوذپذیری سلولی می‌گردند [۲۹]. بایبکر^۲ و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از هسته‌های خرما ی غیربوداده و بوداده با استفاده از حلال متانول ۸۰ درصد در زمان ۳۰ دقیقه و دمای ۶۰ درجه سانتیگراد حمام فراصوت را در محدوده ۵۲۵/۳۵-۵۹۵/۸۳ میلی گرم اکی‌والان اسید گالیک در ۱۰۰ گرم ماده خشک گزارش کردند [۳۰] که در مقایسه با میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر به مراتب کمتر می‌باشد. این اختلاف می‌تواند ناشی از تفاوت در ارقام هسته خرما و استفاده از تیمار حرارتی و دماهای بالا (۱۸۰-۲۲۰

درجه سانتیگراد) در برشته کردن هسته‌های خرما باشد. برشته کردن شدید قهوه هسته خرما می‌تواند باعث کاهش پتانسیل آنتی-اکسیدانی آن گردد [۳۰]. افشاری و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه-ای، بیشترین و کمترین میزان ترکیبات فنولی کل عصاره‌های استخراجی از پودر هسته رقم خرماي استعمران به روش غرقابی با حلال‌های آب و اتانول-آب با غلظت‌های مختلف را به ترتیب ۷۴۲/۳۷ میلی‌گرم اکی والان اسید گالیک در گرم وزن خشک (با نسبت حلال‌های اتانول ۷۵ درصد و آب ۲۵ درصد) و ۲۳۶/۰۷ میلی‌گرم اکی والان اسید گالیک در گرم وزن خشک (با حلال آب ۱۰۰ درصد) گزارش کردند [۳۱] که این میزان بیشینه در مقایسه با مقدار ترکیبات فنولی کل عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر بیشتر می‌باشد. این اختلاف در میزان ترکیبات فنولی کل می‌تواند ناشی از تفاوت در ارقام هسته خرما، میزان رسیدگی خرما، شرایط اقلیمی و محیطی کشت خرما، وضعیت رشد، نوع کودهای مورد استفاده، فصل برداشت خرما، انواع بیماری‌ها و آفات، نوع خاک، روش فرآوری، شرایط انبارش و نیز شرایط استخراج عصاره از جمله نوع و غلظت حلال، دما و زمان فرآیند و تاثیر امواج فراصوت در استخراج کارآمد ترکیبات آنتی‌اکسیدان بویژه ترکیبات فنولی از پودر هسته خرما نسبت به روش استخراج سنتی غرقابی باشد [۳۲].

۲-۳ میزان IC₅₀ عصاره‌های متانولی پودر هسته رقم خرماي ربی

IC₅₀^۱ بیانگر غلظتی از عصاره با توانایی مهار ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH می‌باشد. ارزیابی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH که همان اندازه‌گیری توانایی ترکیبات احیاکننده نظیر فنول‌ها در انتقال اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد است، رایج-ترین روش اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بوده و بر پایه بی‌رنگ شدن محلول DPPH توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در عصاره استوار است. DPPH یک رادیکال آزاد است که در دمای اتاق و در حلال متانول پایدار بوده و محلولی با رنگ بنفش تولید می‌کند. هنگامی که رادیکال‌های آزاد با آنتی‌اکسیدان-ها واکنش می‌دهند، ویژگی رادیکالی آزاد آنها به علت شکستن

زنجیره از بین رفته و رنگ آنها از بنفش به زرد روشن تغییر پیدا می‌کند. تغییر رنگ محلول متأثر از جزء آنتی‌اکسیدان دهنده اتم هیدروژن به رادیکال آزاد می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های DPPH را به شکل پایدارتری کاهش می‌دهند. بنابراین هر چه عصاره دارای ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی بیشتری باشد میزان IC₅₀ آن کمتر خواهد بود [۳، ۳۳]. به طور کلی بین میزان ترکیبات فنولی کل و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از هسته‌های خرما ارتباط مستقیمی وجود دارد. در این مطالعه، میزان IC₅₀ عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته رقم خرماي ربی در زمان ۴۵ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتیگراد حمام فراصوت و غلظت حلال متانول ۷۰ درصد، ۵/۰۸±۰/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل گردید. رادفر و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای، میزان IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از پودر هسته رقم خرماي ربی با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد به روش غرقابی را ۲۰/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۱۶] که این میزان در مقایسه با مقدار IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرما با حلال متانول به روش فراصوت در مطالعه اخیر بیشتر و از این رو، قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها کمتر می‌باشد. دهقانیان و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای، میزان IC₅₀ عصاره-های متانولی استخراجی از هسته‌های خرما به روش غرقابی را ۴۱/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۲۴] که این میزان در مقایسه با مقدار IC₅₀ عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر بیشتر می‌باشد. افشاری و همکاران (۲۰۲۳) در مطالعه‌ای، کمترین و بیشترین میزان IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرماي رقم استعمران به روش غرقابی با حلال‌های آب و اتانول-آب با غلظت‌های مختلف را به ترتیب ۰/۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (با نسبت حلال‌های اتانول ۷۵ درصد و آب ۲۵ درصد) و ۶/۸۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (با حلال آب ۱۰۰ درصد) گزارش کردند [۳۱] که این مقادیر در مقایسه با میزان IC₅₀ عصاره‌های متانولی استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر بیشتر می‌باشد. جثودنه^۲ و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای، کمترین میزان IC₅₀ عصاره‌های استخراجی از پودر هسته هشت رقم خرماي بومی کشور الجزایر به روش غرقابی با

ترکیب حلال‌های استون ۷۵ درصد و آب ۲۵ درصد در مرحله رسیدگی خرما را ۳۷/۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۳۴] که این میزان در مقایسه با مقدار IC_{50} عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر بیشتر می‌باشد. غفور^۱ و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی تاثیر روش‌های سوکسله، سیال CO_2 فوق بحرانی و تحت بحرانی بر استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان از ارقام هسته خرماي Ambara, Sukari, Majdool و Sagai کشور عربستان سعودی پرداختند و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به عصاره استخراجی از هسته خرماي Majdool به روش سیال CO_2 تحت بحرانی (با IC_{50} ۱۰۹/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به عصاره استخراجی از هسته خرماي Sagai به روش سوکسله (با IC_{50} ۳۵۳/۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت دادند و میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی به روش سیال CO_2 فوق بحرانی و تحت بحرانی را در محدوده ۱۰۹/۶۹-۲۲۸/۷۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند [۳۵] که نسبت به میزان IC_{50} عصاره‌های استخراجی از پودر هسته خرما در مطالعه اخیر به مراتب بیشتر می‌باشد. این تفاوت در میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی عصاره‌های استخراجی از هسته‌های ارقام خرما نسبت به مطالعه اخیر می‌تواند تا حد زیادی به کارایی فوق‌العاده امواج فراصوت در استحصال ترکیبات ارزشمند از پودر هسته خرما نسبت به روش‌های سنتی استخراج نظیر سوکسله و غرقابی و روش‌های نوین استخراج نظیر سیال CO_2 فوق بحرانی و تحت بحرانی و نیز تفاوت در ژنوتیپ ارقام خرما و شرایط محیطی و اقلیمی کشت خرما نسبت داده شود.

۳-۳ میزان کارایی ریزپوشانی عصاره‌های هسته رقم خرماي ربی در حامل ژئینی

میزان کارایی ریزپوشانی معمولا به عنوان تعداد دقیق ترکیبات زیست‌فعالی که در یک سیستم به طور حقیقی محافظت می‌شوند، تعریف می‌گردد [۳۶]. با توجه به جدول ۱ که میزان کارایی ریزپوشانی عصاره‌های متانولی هسته رقم خرماي ربی در حامل ژئینی را نشان می‌دهد، مشاهده گردید که با افزایش میزان غلظت

عصاره‌های هسته خرما از ۳/۳ تا ۱۳/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال اتانول-آب ۷۰ درصد یا به عبارت دیگر، افزایش نسبت عصاره‌ها به حامل ژئین از ۰/۱ تا ۰/۴، کارایی ریزپوشانی افزایش یافت. در این مطالعه، میزان میانگین کارایی ریزپوشانی عصاره-های متانولی در حامل ژئینی $4/04 \pm 91/42$ درصد بدست آمد و با افزایش نسبت ریزپوشانی عصاره‌ها در حامل ژئین از ۰/۱ به ۰/۴، میزان کارایی ریزپوشانی عصاره‌های متانولی هسته رقم خرماي ربی در حامل ژئینی از ۸۵/۹۰ به ۹۵/۱۹ درصد افزایش یافت. همچنین بین میزان کارایی ریزپوشانی عصاره‌های متانولی در حامل ژئینی با نسبت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد ($P < 0.01$) مشاهده شد. کالیاری^۲ و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، میزان کارایی ریزپوشانی عصاره‌های استخراجی از کالیس‌های چای ترش در نانوذرات ژئینی حاصل از متد ضدحلال را بین ۶۶/۱ و ۱۰۰ درصد بیان نموده و فاز حلال حاوی بیشتر از ۱ گرم پودر ژئین در ۱۵ میلی‌لیتر حلال اتانول-آب ۸۰ درصد را قادر به ریزپوشانی عصاره به میزان ۰/۵-۱/۵ میلی‌لیتر با کارایی ریزپوشانی بیشتر از ۹۱ درصد گزارش کردند [۱۹]. این میزان از کارایی ریزپوشانی با توجه به استفاده از روش و حامل یکسان در نانوریزپوشانی عصاره‌ها با مطالعه حاضر مطابقت دارد. ساسی^۳ و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای با استفاده از روش خشک کردن انجمادی، پلی‌فنول‌های عصاره هسته خرما را در دیواره‌ای از پروتئین زرده تخم مرغ به همراه صمغ عربی ریزپوشانی و کارایی ریزپوشانی پلی‌فنول‌های عصاره هسته خرما را بین ۴۴/۰۶ و ۹۹/۷۵ درصد و کمترین کارایی ریزپوشانی را برای دیواره صمغ عربی (به تنهایی) و روند کاهشی میزان کارایی ریزپوشانی پلی‌فنول‌های عصاره هسته خرما را با افزایش نسبت دیواره صمغ عربی به زرده تخم مرغ بیان کردند. اثر افزایشی پروتئین زرده تخم مرغ و سایر پروتئین‌ها از جمله ژئین در بهبود میزان کارایی ریزپوشانی پلی‌فنول‌های عصاره هسته خرما می‌تواند ناشی از اینتراکشن‌های قوی هیدروفوب و پیوندهای هیدروژنی غیرکوالانسی بین پروتئین‌ها و پلی‌فنول‌ها نسبت به کربوهیدرات-ها و پلی‌فنول‌ها باشد [۳۷]. لیو^۴ و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه-

2 - Calliari

3 - Sassi

4 - Liu

1 - Ghafoor

۳-۴ اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های هسته رقم خرمای ربی

اندازه و بار ذرات، دو فاکتور عمده با نقش‌های کلیدی در ریزپوشانی و سیستم تحویل ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند. دافعه یا جاذبه الکترواستاتیک یا بار میان نانومواد یکی از اساسی‌ترین پارامترهای موثر بر پایداری کلوئیدی نانوفرمولاسیون‌ها و اینتراکشن آنها با محیط اطرافشان می‌باشد. از این رو، پتانسیل زتا یک پارامتر سطحی اساسی در شناسایی نانوذرات است که در مرز نسبی یون‌های احاطه شده (لایه منتشر) در سطح نانوذرات و یون‌های آزاد در محلول تعیین می‌شود. غلظت یونی و pH محلول دو عاملی هستند که بر ترکیب لایه منتشر و پتانسیل زتا تاثیر می‌گذارند [۳۹]. در مطالعه حاضر، میانگین اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین (فاقد عصاره) به ترتیب $109/30 \pm 9/75$ نانومتر و $21/96 \pm 0/05$ میلی‌ولت و میانگین اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی هسته خرما به ترتیب $153/23 \pm 21/70$ نانومتر و $17/21 \pm 2/04$ میلی‌ولت حاصل گردید. با توجه به داده‌های جدول ۲ که نشان‌دهنده میانگین اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین فاقد عصاره‌های متانولی و ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی هسته خرما می‌باشد، مشخص گردید که با افزایش میزان غلظت عصاره‌های هسته خرما از $3/3$ تا $13/3$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال اتانول-آب ۷۰ درصد یا با افزایش نسبت عصاره‌های متانولی ریزپوشانی شده در حامل زئین از $0/1$ به $0/4$ ، اندازه نانوذرات افزایش و پتانسیل زتا نانوذرات کاهش یافته است. در این مطالعه، اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی هسته خرما به ترتیب در محدوده $129/95$ – $183/30$ نانومتر و $14/48$ – $19/15$ میلی‌ولت تعیین گردید. حیوان، یارمند و مددلو (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای، میانگین اندازه نانوکریستال‌های نشاسته (فاقد عصاره) و نانوکریستال‌های نشاسته بارگذاری شده با عصاره آبی هسته رقم خرمای کبکاب از طریق میکرومولسیفیکاسیون را به ترتیب 164 و 198 نانومتر گزارش کردند [۱۷]. در مطالعه‌ای دیگر، صادقی، یارمند و مددلو (۲۰۱۴) میانگین قطر ذرات پروتئین آب پنیر (فاقد عصاره) و پروتئین آب پنیر بارگذاری شده با عصاره آبی هسته رقم خرمای کبکاب از طریق

ای، افزایش کارایی ریزپوشانی رسوراترول در کواسروات‌های کمپلکس زئین-صمغ عربی را از $55/85$ به $74/2$ درصد پس از سونیکاسیون گزارش کردند و این امر را به تاثیر برهم‌کنش‌های غیرکوالانسی و فضایی ایجاد شده بین رسوراترول، زئین و صمغ عربی در یکنواخت‌سازی بیشتر نانوذرات و از این رو، افزایش کارایی ریزپوشانی رسوراترول و از طرف دیگر تاثیرات شگرف حرارتی، مکانیکی و کایتاسیونی امواج فراصوت در افزایش کارایی ریزپوشانی رسوراترول نسبت دادند [۳۸]. این میزان از کارایی ریزپوشانی با توجه به تفاوت در مدت زمان تیمار با امواج فراصوت و استفاده از حامل کربوهیدراتی نسبت به مطالعه حاضر کمتر می‌باشد. از این رو، افزایش کارایی ریزپوشانی و ریزپوشانی مطلوب عصاره‌های اتانولی هسته رقم خرمای ربی با افزایش غلظت عصاره‌ها در حامل زئینی از طریق ایجاد اینتراکشن‌های قوی پلی‌فنول‌های عصاره با نانوذرات حامل پروتئینی زئین و نیز اثر تقویتی امواج فراصوت در بهبود میزان کارایی ریزپوشانی امری منطقی به نظر می‌رسد.

Table 1. Encapsulation efficiency of Rabbi date seed methanolic extracts in zein nanoparticles

Sample	Extract-to zein ratio	Encapsulation efficiency (%)
Zein loaded with 0.05 g of date seed extract	0.1	85.90 ± 0.16^a
Zein loaded with 0.1 g of date seed extract	0.2	91.13 ± 0.02^b
Zein loaded with 0.15 g of date seed extract	0.3	93.49 ± 0.02^c
Zein loaded with 0.2 g of date seed extract	0.4	95.19 ± 0.03^d

* All numbers are the average of three replicates.

** There is a significant difference between the values with different letters in each column ($p < 0.01$).

میکرومولسیفیکاسیون-تشکیل ژل سرد را به ترتیب ۳۰۴ و ۲۳۰ نانومتر گزارش کردند [۱۸] که این مقادیر نسبت به مطالعه حاضر بیشتر می باشد. کالباری و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه ای، میانگین قطر ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره های اتانولی کالیس های چای ترش با استفاده از متد ضدحلال را بین $25 \pm 9/37$ و $257/4 \pm 64$ نانومتر و افزایش اندک میانگین اندازه ذرات با افزایش غلظت زئین در فاز حلال از ۳۳ تا ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر را گزارش نمودند [۱۹] که تقریباً با محدوده میانگین اندازه ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره های متانولی در مطالعه حاضر از طریق افزایش غلظت عصاره های متانولی در فاز حلال مطابقت دارد. این تطابق محدوده میانگین اندازه ذرات می تواند تا حد زیادی به استفاده از روش یکسان (متد ضدحلال) در ریزپوشانی عصاره ها نسبت داده شود. با این وجود، کمتر بودن میزان ماکزیمم اندازه ذرات در مطالعه حاضر می تواند ناشی از تاثیر پیش تیمار فراصوت در فرآیند ریزپوشانی عصاره های هسته خرما در حامل زئین و تاثیر کارآمد امواج فراصوت در کاهش هر چه بیشتر اندازه ذرات و نیز ثابت و کمتر بودن غلظت حامل ($33/3$ میلی گرم بر میلی لیتر) در مطالعه حاضر نسبت به روند افزایشی غلظت حامل زئین (از $33/3$ تا 100 میلی گرم بر میلی لیتر) و افزایش اندازه ذرات در مطالعه فوق باشد. افزایش اندک اندازه ذرات با افزایش غلظت عصاره های هسته خرما در فاز حلال حاوی پلیمر زئین به دلیل تشکیل هسته (هسته زایی) و رشد ذرات ایجاد شده با فوق اشباعیت در آب به عنوان ضدحلال می باشد [۴۰]. با افزایش غلظت مواد محلول، سرعت هسته زایی افزایش می یابد. افزایش بیش از حد غلظت مواد محلول منجر به تجمع هسته ها و ایجاد ذرات بزرگتر می شود [۱۹]. ژو^۱ و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ای، میانگین اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین (فاقد پروسیانیدین های زغال اخته) را به ترتیب $382/8 \pm 9/8$ نانومتر و $22/80 \pm 1/56$ میلی ولت، اندازه و پتانسیل زتا نانوذرات زئین بارگذاری شده با پروسیانیدین های زغال اخته را به ترتیب در محدوده $391/8 \pm 9/8$ - $447/2 \pm 24/1$ نانومتر و $20/88 \pm 1/38$ - $14/24 \pm 0/89$ میلی ولت و کاهش میزان پتانسیل زتا با افزایش اندازه نانوذرات زئین بارگذاری شده با

پروسیانیدین های زغال اخته را گزارش کردند [۴۱] که نسبت به مطالعه حاضر، میانگین اندازه و پتانسیل زتا ذرات زئین (فاقد پروسیانیدین های زغال اخته) بیشتر بوده اما محدوده تغییر پتانسیل زتا نانوذرات زئین بارگذاری شده با پروسیانیدین های زغال اخته و کاهش پتانسیل زتا با افزایش اندازه نانوذرات با مطالعه حاضر مطابقت دارد. لوکو-آلکاراز^۲ و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه ای، میانگین قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتا ذرات زئین (فاقد عصاره) را به ترتیب $159/26 \pm 5/96$ نانومتر و $22/63 \pm 1/52$ میلی ولت و میانگین قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتا ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره آبی پوست پرتقال از طریق متد ضدحلال را به ترتیب $199/96 \pm 2/87$ نانومتر و $11/86 \pm 0/63$ میلی ولت گزارش نمودند [۴۲] که نسبت به مطالعه حاضر، میانگین قطر هیدرودینامیکی و پتانسیل زتا ذرات زئین (فاقد عصاره) و میانگین قطر هیدرودینامیکی ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره بیشتر و پتانسیل زتا ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره نسبت به مطالعه حاضر کمتر می باشد. این اختلاف در میانگین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات زئین (فاقد عصاره) و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره می تواند به تفاوت در میزان غلظت زئین و غلظت عصاره های مورد استفاده در ریزپوشانی در مطالعات متعدد نسبت داده شود. از طرف دیگر، کاهش پتانسیل زتا با افزایش غلظت یا نسبت عصاره ریزپوشانی شده در زئین به افزایش احتمال وجود عصاره در سطح ذره نسبت داده می شود. این تغییرات در بار سطحی به دلیل وجود گروه های هیدروکسیل ترکیبات فنولی در عصاره می باشد [۴۲]. هر چه میزان ترکیبات فنولی و به تبع گروه های هیدروکسیل (با بار منفی) عصاره ریزپوشانی شده بیشتر باشد میزان بار مثبت حامل زئین بیشتر کاهش خواهد یافت. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این موضوع است که نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره هسته رقم خرما ربی دارای بار مثبت می باشند. این ویژگی الکتریکی به دلیل ایتراکشن الکترواستاتیک بین سطح ذره و غشاء سلولی می تواند جذب سلولی عصاره ریزپوشانی شده را بهبود بخشد [۴۳]. افزایش اندازه ذرات در اثر افزودن عصاره

متانولی خالص و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی

طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) روشی قدرتمند برای شناسایی ساختار شیمیایی و وجود گروه‌های عاملی در مواد زیستی و تعیین کاربردهای آنها با عوامل کلیدی می‌باشد. در مطالعه حاضر، وجود ترکیبات فنولی در عصاره متانولی خالص و اینتراکشن آنها با حامل زئین با استفاده از ATR-FTIR تعیین گردید. طیف ATR-FTIR عصاره متانولی خالص (شکل ۱ (a)) یک سیگنال گسترده و پهن را در محدوده ۳۶۰۰ تا ۲۹۲۹ cm^{-1} که مربوط به کشش گروه‌های هیدروکسیل (-OH) اکسوکرومیک ترکیبات فنولی است، نشان می‌دهد [۴۵]. باند ۳۲۶۱ cm^{-1} عصاره متانولی خالص هسته خرما ممکن است به کشش -OH گروه هیدروکسیل عامل کربوکسیلیک (COOH) روی حلقه بنزن اسیدهای فنولیک اختصاص داشته باشد [۴۶]. سیگنال در محدوده ۲۹۲۹ تا ۲۸۲۰ cm^{-1} مربوط به کشش گروه پیوندی CH_2 عصاره متانولی خالص است. باند بین ۱۰۴۳ تا ۹۸۸ cm^{-1} مربوط به سیگنال تشخیص گروه‌های آروماتیک (C=O) موجود در ترکیبات فنولی عصاره متانولی خالص می‌باشد. این نتایج تقریباً با آنالیز ATR-FTIR ترکیبات فنولی استخراجی از بلوبری‌های بیلوکسی^۱ با حلال متانول اسیدی توسط گونزالز-کروز^۲ و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد [۴۵]. پیک‌های ATR-FTIR عصاره متانولی خالص مشاهده شده در ۱۶۰۶، ۱۵۲۱ و ۱۴۴۰ cm^{-1} با کشش C=C حلقه‌های آروماتیک گروه‌های عاملی معمول ترکیبات فنولی مرتبط می‌باشد. پیک مشاهده شده در ۱۲۸۳ cm^{-1} به پیوند C-O موجود در فلاونوئیدهای عصاره متانولی خالص نسبت داده می‌شود. پیک مشاهده شده در ۱۰۴۳ cm^{-1} به ارتعاش C-O غیرمتقارن عصاره متانولی خالص نسبت داده می‌شود. پیک‌های نمایان شده عصاره متانولی خالص در ۷۷۴ و ۵۱۶ cm^{-1} به خمش خارج از صفحه پیوندهای C-H موجود در حلقه‌های بنزن نسبت داده می‌شوند. این نتایج ATR-FTIR مطالعه حاضر با نتایج آنالیز FTIR عصاره آبی هسته رقم خرماي کبکاب توسط باقری و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت دارد [۴۶].

ناشی از آرایش فضایی زنجیره‌های اسید آمینه زئین در تعامل با مولکول‌های عصاره ریزپوشانی شده می‌باشد [۴۴].

Table 2. Mean size and zeta potential of extract-free and extract-loaded zein particles

Sample	Extract-to zein ratio	Particle mean size (nm)	Zeta potential (mV)
Extract-free zein	0	109.30±9.75 ^a	+21.96±0.05 ^a
Zein loaded with 0.05 g of date seed extract	0.1	129.95±3.74 ^{acd}	+19.15±0.07 ^b
Zein loaded with 0.1 g of date seed extract	0.2	142.25±5.58 ^{acd}	+18.85±0.14 ^b
Zein loaded with 0.15 g of date seed extract	0.3	157.45±5.86 ^{bcd}	+16.35±0.07 ^c
Zein loaded with 0.2 g of date seed extract	0.4	183.30±6.93 ^b	+14.48±0.05 ^d

* All numbers are the average of three replicates.

** There is a significant difference between the values with different letters in each column ($p < 0.01$).

۳-۵ بررسی طیف‌های تبدیل فوریه مادون قرمز تجهیز شده با بازتابش کلی کاهش یافته نانوذرات زئین فاقد عصاره، عصاره

۳۴۲۳/۸۹ به $3443/78 \text{ cm}^{-1}$ را گزارش کردند و این امر را به فعالیت قوی‌تر پیوند هیدروژنی بین اجزاء نانوذرات زئین-کازئینات سدیم بارگذاری شده با روتین نسبت دادند [۴۸]. این گونه ایتراکشن‌ها منجر به سازگاری هر چه بیشتر اجزاء نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما به دلیل پیوند هیدروژنی و نیروهای آبگریز می‌شوند [۴۶].

طیف ATR-FTIR نانوذرات زئین فاقد عصاره (شکل ۱ (b)) دارای سیگنال‌هایی در 1643 و 1530 cm^{-1} می‌باشد که مربوط به وجود آمیدهای نوع I و نوع II در ساختار اسیدهای آمینه پروتئین زئین است. باند جذب آمید نوع I مربوط به کشش محوری پیوند C-O است که در طول باند جذب آمید نوع II با زاویه نامتقارن با پیوند N-H قرار دارد. باندهای جذب در محدوده 2956 تا 2872 cm^{-1} مربوط به پیوندهای C-H رادیکال‌های CH_2 و CH_3 تشکیل‌دهنده ساختار زئین می‌باشند. باند جذب در 3600 تا 3014 cm^{-1} متعلق به کشش محوری گروه عاملی هیدروکسیل (OH-) می‌باشد. این نتایج تقریباً با آنالیز FTIR نانوذرات زئین تولید شده به روش مبتنی بر pH توسط ژنگ^۱ و همکاران (۲۰۲۲) مطابقت دارد [۴۷]. شباهت زیاد طیف‌های ATR-FTIR نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره-های متانولی هسته رقم خرمای ربی (نسبت عصاره به زئین ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴) (شکل ۱ (c)، (d)، (e) و (f)) و نانوذرات زئین فاقد عصاره بیانگر آن است که به دام‌افتادن عصاره‌های هسته خرما درون نانوذرات اتصال‌یافته عرضی زئین عمدتاً فیزیکی بوده و ایتراکشن‌های شیمیایی احتمالی بین عصاره‌ها و ماتریس زئین از نوع پیوندهای هیدروژنی، غیرکوالانس و اندروالس و ایتراکشن‌های آبگریز می‌باشند [۱۷]. طیف‌های ATR-FTIR نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی بیانگر آن است که با افزایش نسبت عصاره متانولی ریزپوشانی شده در حامل زئین از ۰/۱ تا ۰/۴، پیک کشش پیوند O-H...O از $3292/85$ به $3294/85 \text{ cm}^{-1}$ تغییر یافته و افزایش می‌یابد. این در حالی است که نانوذرات زئین فاقد عصاره دارای پیک کشش پیوند O-H $3292/29 \text{ cm}^{-1}$ می‌باشند. این تغییرات و جابجایی پیک OH- ممکن است ناشی از تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی بین باندهای آمید در زئین و گروه‌های هیدروکسیل در عصاره‌های هسته خرما و به عبارت دیگر، افزایش فعالیت پیوند هیدروژنی بین عصاره‌های هسته خرما با نانوذرات زئین باشد. ژانگ و هان^۲ (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای با افزایش میزان روتین بارگذاری شده در نانوذرات زئین-کازئینات سدیم (از ۰/۰۵ گرم تا ۰/۲ گرم) روند افزایشی تغییر پیک کشش پیوند O-H...O از

1 - Zheng

2 - Zhang and Han

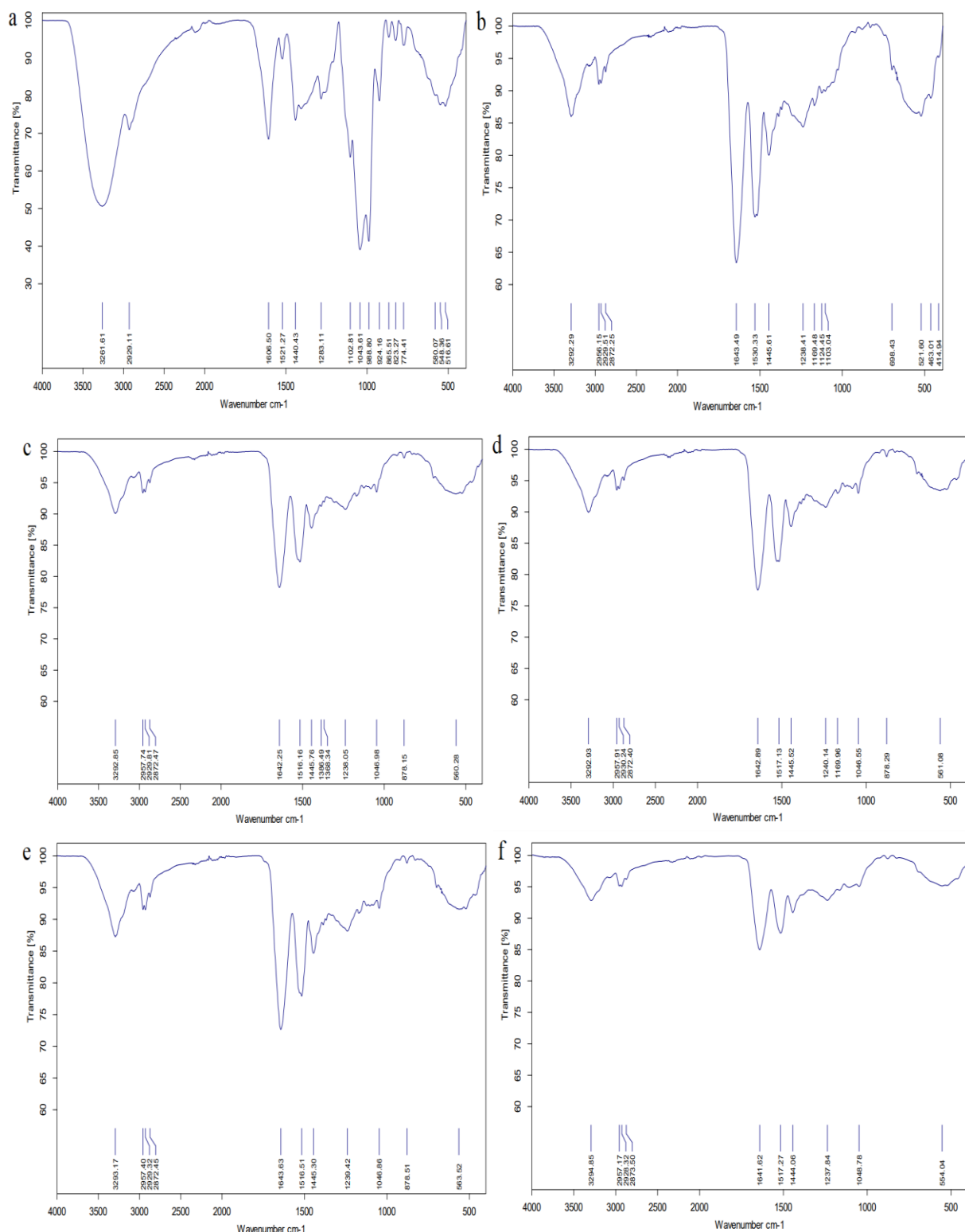


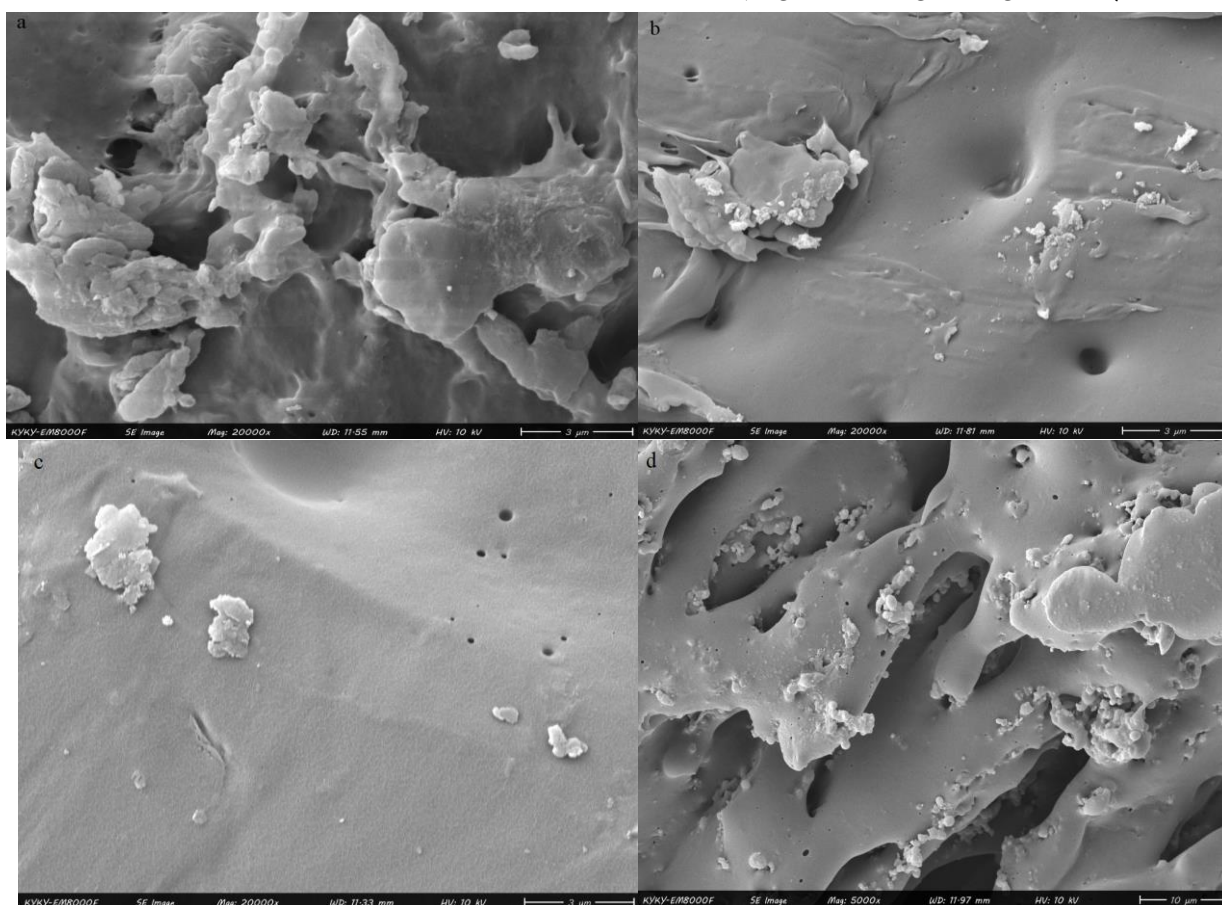
Figure 2. ATR-FTIR spectra of Rabbi date seed pure methanolic extract (a), extract-free zein nanoparticles (b), and extract-loaded zein nanoparticles at ratios of 0.1 (c), 0.2 (d), 0.3 (e), and 0.4 (f).

۳-۶ بررسی ریزساختار نانوذرات زئین فاقد عصاره و

نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نانوذرات زئین فاقد عصاره و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی (نسبت عصاره به زئین ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴) در شکل ۲ (a)، (b)، (c)، (d) و (e) آورده شده‌اند. در مطالعه حاضر مشاهده گردید که نانوذرات زئین فاقد عصاره و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی دارای مرفولوژی و آرایش نیمه کروی اتصال یافته با یکدیگر یا دارای همپوشانی با هم در حالت خشک در هنگام بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی می‌باشند [۱۷، ۴۶]. در بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی، پدیده اتصال

عرضی یا تجمع نانوذرات زئین و نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره خشک شده انجمادی مشهود بود [۴۹]. به گونه‌ای که با افزایش نسبت عصاره متانولی ریزپوشانی شده در حامل زئین از ۰/۱ تا ۰/۴، اتصالات عرضی و تجمعات نانوذرات زئین و عصاره‌های هسته خرماای رقم ربی بهبود یافت. این امر موید افزایش کارایی ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما و افزایش احتمال به دام‌اندازی عصاره‌های هسته خرما در شبکه پلیمری حامل زئین با افزایش نسبت عصاره به زئین می‌باشد. افزایش ذرات زئین بارگذاری شده با عصاره به ایتراکشن‌های غیرکوالانسی واندروالس، هیدروژنی و هیدروفوب بین عصاره هسته خرماای ریزپوشانی شده و ماتریس پروتئینی کپسول‌ها نسبت داده می‌شود [۱۸].



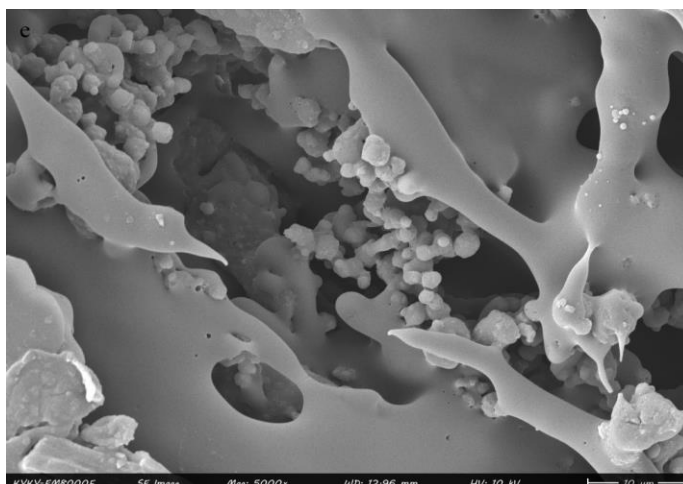


Figure 2. FE-SEM images of extract-free zein nanoparticles (a) and extract-loaded zein nanoparticles at ratios of 0.1 (b), 0.2 (c), 0.3 (d), and 0.4 (e).

عصاره‌های متانولی هسته خرما و اندازه نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های هسته خرما افزایش و پتانسیل زتا نانوذرات زئین بارگذاری شده با عصاره‌های متانولی هسته خرما کاهش یافته است. نتایج ATR-FTIR و تصاویر FE-SEM گواه پتانسیل فوق‌العاده حامل زئین در ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما، ایجاد ایتراکشن‌های قدرتمند با مواد هسته آگریز و قابلیت کاربرد آن در فرمولاسیون‌های مواد غذایی و تولید انواع نانوغذا بوده‌اند.

۵-منابع

- [1] Abdel-Shaheed, M. M., Abdalla, E. S., Khalil, A. F., & El-Hadidy, E. M. (2021). Effect of Egyptian Date Palm Pollen (*Phoenix dactylifera* L.) and Its Hydroethanolic Extracts on Serum Glucose and Lipid Profiles in Induced Diabetic Rats. *Food and Nutrition Sciences*, 12(2): 147.
- [2] Pateiro, M., Gómez, B., Munekata, P. E., Barba, F. J., Putnik, P., Kovačević, D. B., & Lorenzo, J. M. (2021). Nanoencapsulation of promising bioactive compounds to improve their absorption, stability, functionality and the appearance of the final food products. *Molecules*, 26(6): 1547.
- [3] Safarzaei, A., Sarhadi, H., Khodaparast, M. H. H., Shahdadi, F., & Dashipour, A. R. (2020). Optimization of aqueous and alcoholic extraction of

۴-نتیجه گیری

استفاده از فناوری‌های غیرحرارتی نظیر تیمار فراصوت ضمن افزایش کارایی و راندمان استخراج ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدان از پودر هسته خرما منجر به کاهش زمان استخراج و حفظ ترکیبات حساس به حرارت در مقایسه با روش‌های سنتی استخراج می‌شود. ویژگی آگریزی بیوپلیمر زئین باعث افزایش قابلیت آن در ایجاد ایتراکشن‌های غیرکوالانسی و اندروالسی، هیدروژنی و هیدروفوب با ترکیبات فنولی عصاره‌های هسته خرما و شناسایی آن به عنوان یک حامل قدرتمند در ریزپوشانی عصاره‌های هسته خرما گردیده است. به طوری که با افزایش نسبت عصاره ریزپوشانی شده در حامل زئین، کارایی ریزپوشانی

phenolic and antioxidant compounds from Caper (*Capparis spinosa* L.) Roots assisted by ultrasound

waves. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 22(4): e100747.

- [4] Kenari, R. E., Amiri, Z. R., Motamedzadegan, A., Milani, J. M., Farmani, J., & Farahmandfar, R. (2020). Optimization of Iranian golpar (*Heracleum persicum*) extract encapsulation using sage (*Salvia macrosiphon*) seed gum: chitosan as a wall materials and its effect on the shelf life of soybean oil during storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14: 2828-2839.

- [5] Tahir, A., Shabir Ahmad, R., Imran, M., Ahmad, M. H., Kamran Khan, M., Muhammad, N., ... & Javed, M. (2021). Recent approaches for utilization of food components as nano-encapsulation: a review. *International Journal of Food Properties*, 24(1): 1074-1096.
- [6] Dehghan, B., Esmaeilzadeh Kenari, R., & Raftani Amiri, Z. (2020). Nano-encapsulation of orange peel essential oil in native gums (*Lepidium sativum* and *Lepidium perfoliatum*): Improving oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11): e14889.
- [7] Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19: 29-43.
- [8] Mohamed, S. A., El-Sakhawy, M., & El-Sakhawy, M. A. M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers*, 238: 116178.
- [9] Razavi, R., Kenari, R. E., Farmani, J., & Jahanshahi, M. (2020). Fabrication of zein/alginate delivery system for nanofood model based on pumpkin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165: 3123-3134.
- [10] Khalid, S., Khalid, N., Khan, R. S., Ahmed, H., & Ahmad, A. (2017). A review on chemistry and pharmacology of Ajwa date fruit and pit. *Trends in food science and technology*, 63: 60-69.
- [11] Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2008). Nutritional and functional properties of dates: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(10): 877-887.
- [12] Amir, A., Ansari, I., Arif, F., Bano, S., Amir, F., Ahmad, U., & Raza, A. (2020). A review on phyto-pharmacological significance of ajwa pits (*Phoenix dactylifera* L.). *BioScientific Review*, 2(3): 26-45.
- [13] Hussein, A. M., El-Mousalamy, A. M., Hussein, S. A., & Mahmoud, S. A. (2015). Effects of palm dates (*Phoenix dactylifera* L.) extracts on hepatic dysfunctions in Type 2 diabetic rat model. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 4: 62-79.
- [14] Kalantaripour, T. P., Asadi-Shekaari, M., Basiri, M., & Najari, A. G. (2012). Cerebroprotective effect of date seed extract (*Phoenix dactylifera*) on focal cerebral ischemia in male rats. *Journal of Biological Sciences*, 12(3): 180-185.
- [15] Al-Farsi, M. A., & Lee, C. Y. (2011). Usage of date (*Phoenix dactylifera* L.) seeds in human health and animal feed. In *Nuts and seeds in health and disease prevention* (pp. 447-452). Academic Press.
- [16] Radfar, R., Farhoodi, M., Ghasemi, I., Khaneghah, A. M., Shahraz, F., & Hosseini, H. (2019). Assessment of phenolic contents and antioxidant and antibacterial activities of extracts from four varieties of Iranian date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) seeds. *Applied food biotechnology*, 6(3): 173-184.
- [17] Jivan, M. J., Yarmand, M., & Madadlou, A. (2014). Short communication Encapsulation of date palm pit extract via particulation of starch nanocrystals in a microemulsion. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 920-923.
- [18] Sadeghi, S., Madadlou, A., & Yarmand, M. (2014). Microemulsification-cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract. *Food Hydrocolloids*, 35: 590-596.
- [19] Calliari, C. M., Campardelli, R., Pettinato, M., & Perego, P. (2020). Encapsulation of *hibiscus sabdariffa* extract into zein nanoparticles. *Chemical Engineering and Technology*, 43(10): 2062-2072.
- [20] Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science and technology*, 45(7): 1386-1394.
- [21] Esmaeilzadeh 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 and Nutrition*, 10(2): 525-535.
- [22] Najafi, Z., Cetinkaya, T., Bildik, F., Altay, F., & Yeşilçubuk, N. Ş. (2022). Nanoencapsulation of saffron (*Crocus sativus* L.) extract in zein nanofibers and their application for the preservation of sea bass fillets. *LWT*, 163: 113588.
- [23] Zheng, H., Wang, J., Zhang, Y., Xv, Q., Zeng, Q., & Wang, J. (2022). Preparation and characterization of carvacrol-loaded caseinate/zein-composite nanoparticles using the anti-solvent precipitation method. *Nanomaterials*, 12(13): 2189.
- [24] Dehghanian, F., Kalantaripour, T. P., Esmaeilpour, K., Elyasi, L., Oloumi, H., Pour, F. M., & Asadi-Shekaari, M. (2017). Date seed extract

ameliorates β -amyloid-induced impairments in hippocampus of male rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89: 221-226.

[25] Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., & Al-Rawahy, F. (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food chemistry*, 104(3): 943-947.

[26] Fuad, F. M., & Nadzir, M. M. (2023). Ultrasound-assisted extraction of asiaticoside from *Centella asiatica* using betaine-based natural deep eutectic solvent. *Industrial Crops and Products*, 192: 116069.

[27] Zheng, B., Yuan, Y., Xiang, J., Jin, W., Johnson, J. B., Li, Z., ... & Luo, D. (2022). Green extraction of phenolic compounds from foxtail millet bran by ultrasonic-assisted deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivities. *Lwt*, 154: 112740.

[28] Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 64: 105021.

[29] Tsiaka, T., Lantzouraki, D. Z., Polychronaki, G., Sotiroidis, G., Kritsi, E., Sinanoglou, V. J., ... & Zoumpoulakis, P. (2023). Optimization of Ultrasound-and Microwave-Assisted Extraction for the Determination of Phenolic Compounds in Peach Byproducts Using Experimental Design and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, 28(2): 518.

[30] Babiker, E. E., Atasoy, G., Özcan, M. M., Juhaimi, F. A., Ghafoor, K., Ahmed, I. A. M., & Almusallam, I. A. (2020). Bioactive compounds, minerals, fatty acids, color, and sensory profile of roasted date (*Phoenix dactylifera* L.) seed. *Journal of food processing and preservation*, 44(7): e14495.

[31] Afshari, K., Javanmard Dakheli, M., Ramezan, Y., Bassiri, A., & Ahmadi Chenarbon, H. (2023). Physicochemical and control releasing properties of date pit (*Phoenix dactylifera* L.) phenolic compounds microencapsulated through fluidized-bed method. *Food Science & Nutrition*, 11(3): 1367-1382.

[32] Alem, C., Ennassir, J., Benlyas, M., Mbark, A. N., & Zegzouti, Y. F. (2017). Phytochemical compositions and antioxidant capacity of three date (*Phoenix dactylifera* L.) seeds varieties grown in the South East Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16(4): 350-357.

[33] Irawan, C., Sukiman, M., Putri, I. D., Utami, A., Dewanta, A., & Noviyanti, A. (2022). Optimization of the Ultrasound Assisted Extraction of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. Fruit Peel and its Antioxidant and Anti-Gout Potential. *Pharmacognosy Journal*, 14(2): 397-405.

[34] Djaoudene, O., López, V., Cásedas, G., Les, F., Schisano, C., Bey, M. B., & Tenore, G. C. (2019). *Phoenix dactylifera* L. seeds: A by-product as a source of bioactive compounds with antioxidant and enzyme inhibitory properties. *Food and function*, 10(8): 4953-4965.

[35] Ghafoor, K., Sarker, M. Z. I., Al-Juhaimi, F. Y., Babiker, E. E., Alkaltham, M. S., & Almubarak, A. K. (2022). Extraction and evaluation of bioactive compounds from date (*Phoenix dactylifera*) seed using supercritical and subcritical CO₂ techniques. *Foods*, 11(12): 1806.

[36] López de Dicastillo, C., Velásquez, E., Rojas, A., Garrido, L., Moreno, M. C., Guarda, A., & Galotto, M. J. (2023). Developing Core/Shell Capsules Based on Hydroxypropyl Methylcellulose and Gelatin through Electrodynamics Atomization for Betalain Encapsulation. *Polymers*, 15(2): 361.

[37] Sassi, C. B., Marcet, I., Rendueles, M., Díaz, M., & Fattouch, S. (2020). Egg yolk protein as a novel wall material used together with gum Arabic to encapsulate polyphenols extracted from *Phoenix dactylifera* L pits. *LWT*, 131: 109778.

[38] Liu, Y., Liang, Q., Liu, X., Raza, H., Ma, H., & Ren, X. (2022). Treatment with ultrasound improves the encapsulation efficiency of resveratrol in zein-gum Arabic complex coacervates. *Lwt*, 153: 112331.

[39] Inam, W., Bhadane, R., Akpolat, R. N., Taiseer, R. A., Filippov, S. K., Salo-Ahen, O. M., ... & Zhang, H. (2022). Interactions between polymeric nanoparticles and different buffers as investigated by zeta potential measurements and molecular dynamics simulations. *View*, 3(4): 20210009.

[40] Campardelli, R., Oleandro, E., & Reverchon, E. (2016). Supercritical assisted injection in a liquid antisolvent for PLGA and PLA microparticle production. *Powder Technology*, 287: 12-19.

[41] Zou, T., Li, Z., Percival, S. S., Bonard, S., & Gu, L. (2012). Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein nanoparticles. *Food hydrocolloids*, 27(2): 293-300.

[42] Luque-Alcaraz, A. G., Velazquez-Antillón, M., Hernández-Téllez, C. N., Graciano-Verdugo, A. Z., García-Flores, N., Iriqui-Razcón, J. L., ... & Hernández-Abril, P. A. (2022). Antioxidant Effect of Nanoparticles Composed of Zein and Orange (*Citrus*

sinensis) Extract Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction. *Materials*, 15(14): 4838.

[43] Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J., and Stolnik, S. (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Molecular pharmaceutics*, 11(12): 4363-4373.

[44] Brotons-Canto, A., Gonzalez-Navarro, C. J., Gurrea, J., González-Ferrero, C., and Irache, J. M. (2020). Zein nanoparticles improve the oral bioavailability of resveratrol in humans. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57: 101704.

[45] González-Cruz, E. M., Andrade González, I., Prieto, C., Lagarón, J. M., Calderón Santoyo, M., & Ragazzo Sánchez, J. A. (2022). Nanoencapsulation of Polyphenolic-Rich Extract from Biloxi Blueberries (*Vaccinium Corymbosum* L.) by Electrospraying using Zein as Encapsulating Material. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(1): 1-14.

[46] Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M., & Mousavi, M. E. (2013). Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. *Food Research International*, 51(2): 866-871.

[47] Zheng, H., Wang, J., You, F., Zhou, M., & Shi, S. (2022). Fabrication, Characterization, and Antimicrobial Activity of Carvacrol-Loaded Zein Nanoparticles Using the pH-Driven Method. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16): 9227.

[48] Zhang, S., & Han, Y. (2018). Preparation, characterisation and antioxidant activities of rutin-loaded zein-sodium caseinate nanoparticles. *PloS one*, 13(3): e0194951.

[49] Zhong, Q., & Jin, M. (2009). Zein nanoparticles produced by liquid-liquid dispersion. *Food Hydrocolloids*, 23(8): 2380-2387.



Scientific Research

Application of antisolvent precipitation method for encapsulation of date seed extracts of Rabbi variety in zein ptotein biopolymer

Abdolvahed Safarzaei¹, Reza Esmaeilzadeh Kenari^{*2}, Reza Farahmandfar^{3*}, Ahmad Mehravaran⁴, Hamed Fanaei⁵

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran

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

3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran

4- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Iran

5- Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Iran

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antioxidant properties of date seed methanolic extracts of Rabbi variety and evaluating the physicochemical properties of zein nanoparticles loaded with these extracts. Ultrasonic treatment was used to extract methanolic extract from date seed powder and antisolvent precipitation method was used to encapsulate date seed methanolic extracts in amounts of 0.05, 0.1, 0.15 and 0.2 g in zein biopolymer carrier. In this study, the total phenolic content (TPC) and half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of date seed extracts of Rabbi variety in 45 min, the temperature of 50°C of ultrasonic bath and 70% methanol solvent concentration were obtained respectively 369.47 mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight and 5.08 µg/ml. By increasing the ratio of encapsulated extract in zein carrier from 0.1 to 0.4, the encapsulation efficiency from 85.90 to 95.19% and the size of zein particles loaded with methanolic extracts from 129.95 to 183.30 nm increased and the zeta potential of nanoparticles decreased from +19.15 to +14.48 mV. The size and zeta potential of extract-free zein particles were determined 109.30 nm and +21.96 mV, respectively. The results of ATR-FTIR analysis indicated that with increase the ratio of methanolic extract encapsulated in the zein carrier, the stretching peak of O–H...O bond changed and increased from 3292.85 to 3294.85 cm⁻¹. In Investigating the FE-SEM images, extract-free zein nanoparticles and zein nanoparticles loaded with date seed extracts had semi-spherical morphology. Overall, the hydrophobic nature of zein carrier caused it to bind with the phenolics of Rabbi date seed extract through non-covalent, van der Waals, hydrogen, and hydrophobic interactions. Therefore, it can be used as a strong carrier for the encapsulation of date seed extracts

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/9/27

Accepted: 2023/11/4

Keywords:

Ultrasound,
Rabbi date seed,
Zein carrier,
Nanoencapsulation,
antisolvent precipitation

DOI: 10.22034/FSC.T.20.145.188

*Corresponding Author E-Mail:

r.farahmandfar@sanru.ac.ir

reza_kenari@yahoo.com