

## درون پوشانی عصاره بابونه در نانو ذرات تهیه شده با روش رسوب با ضد حلال

لیلا باقری<sup>۱\*</sup>، محمد امین شامخی<sup>۲</sup> و مینا کارگزاری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

<sup>۲</sup>مربی گروه مهندسی پلیمر، واحد سروستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سروستان، ایران

<sup>۳</sup>استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱۸

### چکیده

**سابقه و هدف:** عصاره بابونه حاوی ترکیبات زیست فعالی مانند ترپنوئیدها، آلفا-بیس آبولول، کامازولین و ترکیبات پلی فنولی از جمله آپی جنین، کوئرستین و پاتولتین است که اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی، ضد تشنج، ضد حساسیت، ضد قارچ و تببری قابل توجهی دارند. البته افزودن ترکیب های زیست فعال مذکور به مواد غذایی مختلف ممکن است باعث کاهش کیفیت در محصول از جمله ایجاد طعم تلخ و گس و افزایش کدورت در نوشیدنی ها شود. این ترکیبات همچنین به عنوان سویسترای واکنش های قهوه ای شدن در تشکیل رنگ های نامطلوب در فرآورده های غذایی نقش دارند. از سوی دیگر در حین فرآوری و نیز در طول مدت انبارداری، ترکیبات زیست فعال تحت تأثیر عواملی مانند حرارت، نور و اکسیژن تجزیه می گردند. پس از مصرف نیز طی عبور از مجرای معده ای - روده ای بر اثر عواملی مانند pH اسیدی و آنزیم ها به آسانی تجزیه می شوند. نانو درون پوشانی ترکیبات زیست فعال رهیافت کارایی برای غلبه بر مشکلات مذکور بدون بروز تأثیر منفی بر ویژگی های ارگانولپتیکی و ظاهری محصول نهایی است. هدف از پژوهش حاضر درون پوشانی عصاره بابونه در نانو ذرات ایزوله پروتئین آب پنیر با استفاده از روش رسوب با ضدحلال جهت افزایش اثر سلامت بخش در نوشیدنی ها است.

**مواد و روش ها:** محلول پروتئین آب پنیر با حل کردن پودر پروتئین آب پنیر در آب دو بار تقطیر تهیه شد. حرارت دهی اولیه محلول تهیه شده در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. سپس پروتئین های آب پنیر با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز اتصالات عرضی تشکیل دادند. محلول پروتئین حاصله با اتانول خالص شارژ شد. در نهایت نانو ذرات با استفاده از سانتریفیوژ جمع آوری شدند.

**یافته ها:** بازده درون پوشانی برای نسبت ۱ به ۲۰ (وزنی/وزنی) عصاره به پروتئین، ۸۱ درصد بود. اندازه گیری قطر هیدرودینامیک ذرات با استفاده از دستگاه پراکنش دینامیکی نور نشان داد که توزیع اندازه ذرات نمونه های تولیدی به صورت دونمایی بود. بر اساس نتایج طیفسنجی مادون قرمز تبدیل فوریه عصاره بابونه و پروتئین های آب پنیر با تشکیل پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های هیدروفوب باهم واکنش داده اند. ایجاد اتصالات عرضی در پروتئین ها به روش آنزیمی نیز با استفاده از طیفسنجی مادون قرمز تأیید شد.

\*مستول مکاتبه: [leilabagheri@alumni.ut.ac.ir](mailto:leilabagheri@alumni.ut.ac.ir)

**نتیجه گیری:** بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام‌شده در محیط شبیه‌سازی شده معده‌ای-روده‌ای ساختار نانو ذرات طی اتصالات عرضی پروتئین‌های آب‌پنیر بهبود یافت. اتصالات عرضی پروتئین‌های آب‌پنیر سرعت رهایش عصاره بابونه درون‌پوشانی شده در نانو ذرات را در شرایط شبیه‌سازی شده معده کاهش داد.

**واژه‌های کلیدی:** ترسیب با ضد حلال، اتصال عرضی، عصاره بابونه، نانو ذرات پروتئین آب‌پنیر، رهایش هدفمند

یکی از راه‌های تولید غذاهای سلامت افزا، غنی‌سازی آن‌ها با ترکیبات زیست فعال است. در برخی موارد با غنی‌سازی محصولات غذایی با ترکیبات زیست فعال اثرات نامطلوب در طعم و بافت محصولات غذایی ایجاد می‌گردد. طعم گس پلی‌فنول‌ها که ناشی از واکنش تانن‌ها با پروتئین‌های بزاق است نیز کاربرد آن‌ها را محدود می‌سازد؛ بنابراین قبل از استفاده از پلی‌فنول‌ها در فرمولاسیون محصولات غذایی، ضروری است طعم نامطلوب آن‌ها پوشاننده شود (۷، ۱۷). واکنش پروتئین‌ها (پروتئین‌های غنی از پرولین) با پلی‌فنول‌ها باعث ایجاد کدورت و حالت ابری در نوشیدنی‌ها می‌گردد (۸، ۳۳). همچنین پلی‌فنول‌ها ممکن است موجب بدرنگ شدن فرآورده‌های غذایی گردند برای مثال با آهن، رنگ‌های سبز و آبی تولید می‌کنند (۲۱، ۲۷، ۳۵). تعدادی از پلی‌فنول‌ها، سوبسترای قهوه‌ای شدن آنزیمی هستند و می‌توانند از این طریق، باعث بدرنگ شدن فرآورده غذایی شوند. از سوی دیگر، مؤثر واقع شدن پلی‌فنول‌ها در پیشگیری از بیماری‌ها بستگی به میزان زیست‌دسترسی آن‌ها دارد (۹، ۳). قابلیت دسترسی زیستی تحت تأثیر عواملی مانند واکنش پلی‌فنول‌ها با سایر اجزاء تشکیل‌دهنده‌ی مواد غذایی و شرایط معده‌ای-روده‌ای (آنزیم‌ها، وجود دیگر مواد مغذی و pH)، ناکافی بودن زمان توقف در معده، قابلیت نفوذپذیری و یا حل‌پذیری ضعیف در درون معده کاهش می‌یابد (۲۸، ۱۰). از طرف دیگر، ترکیبات زیست فعال ناپایدار بوده و تحت تأثیر شرایط مختلف فراوری (دمای بالا، نور و اکسیژن) و pH اسیدی معده انسان، تجزیه می‌شوند.

درون‌پوشانی<sup>۵</sup> راهی برای غلبه بر ناپایداری‌های ترکیبات زیست فعال ناشی از شرایط فراوری است و امکان رهایش کنترل شده آن‌ها را در روده کوچک

گیاه بابونه (ماتریکاریا کامومیلا<sup>۱</sup>) از هزاران سال پیش تاکنون به‌عنوان داروی گیاهی در اروپا و آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. به علت مؤثر بودن این گیاه در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات دستگاه گوارش، فشارخون و نیز به‌عنوان داروی پیشگیری از پیری و مؤثر در پیشگیری از ابتلا به سرطان سینه مصرف آن به شکل دمنوش در سرتاسر دنیا رو به افزایش است (۱، ۲، ۳۴). اثرات سلامت بخش گیاه بابونه، به ترکیبات زیست‌فعال موجود در آن با اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی، مسکن، ضد تشنج، ضد حساسیت، ضد قارچ و تب‌بر نسبت داده می‌شود. دو دسته ترکیب زیست فعال در گیاه بابونه گزارش شده‌اند: یک دسته اسانس‌های روغنی شامل ترپنوئیدها<sup>۲</sup>، آلفا-بیس‌آبولول<sup>۳</sup> و کامازولین<sup>۴</sup> و دسته دیگر ترکیبات پلی‌فنولی شامل آپی‌جنین، کوئرستین و پاتولتین می‌باشد. ترکیبات پلی‌فنولی عصاره گیاه بابونه در خشتی کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن‌دار مؤثر می‌باشند (۳، ۴). یکی از فلاونوئیدهای بسیار مهم موجود در گیاه بابونه بانام آپی‌جنین از دسته فلاون‌ها (دارای پیوند دوگانه بین کربن شماره ۲ و ۳)، بازدارنده پروتئین‌کیناز بوده و مانع از پیشرفت تومور و تکثیر سلول‌های سرطانی سینه می‌شود (۴، ۲۴). عملکرد آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌ها به‌دلیل جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین، ممانعت از تجمع پلاکت‌های خونی و حفاظت سلول‌های قرمز خون است (۵). علاوه بر این، پلی‌فنول‌ها به‌عنوان عوامل شلاته‌کننده‌ی فلزات، ضد جهش ژنتیکی و ضدسرطان بوده و دارای خاصیت ضد میکروبی و ضدالتهابی نیز هستند (۶، ۲۶).

1. *Matricaria Chamomile*
2. Terpenoids
3.  $\alpha$ -bisabolol
4. Chamazulene

زیست فعال هر دو باید در حلال اول محلول و در حلال دوم نامحلول باشند. در روش رسوب با ضد حلال، هیچ یک از فرآیندهایی که به ساختار پروتئین آسیب می‌رسانند (آهنگ‌های برشی بالا<sup>۱۰</sup>، دماهای بالا و فراصوت<sup>۱۱</sup>) وجود ندارد، سورفاکتنت‌ها و حلال‌های سمی استفاده نشده و به دلیل نامحلول بودن ماده هدف در محیط بیرونی، راندمان محصورسازی<sup>۱۲</sup> در این روش نزدیک به ۱۰۰ درصد است (۱۷). کاستر و همکاران (۱۹۹۹) با ایجاد تغییراتی روش دومرحله‌ای ضد حلال را برای تولید نانو ذرات ژلاتین و پروتئین سرم انسانی ابداع کردند (۶). ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از روش رسوب با ضد حلال موفق به درون‌پوشانی روغن ماهی در نانو کپسول‌هایی از جنس زئین با قطر متوسط ۳۵۰-۴۵۰ نانومتر شدند (۳۷). زو و همکاران (۲۰۱۲) موفق به تولید نانو کپسول‌هایی از زئین حامل کران بری<sup>۱۳</sup> با قطر متوسط ۳۹۲-۴۴۷ نانومتر با روش موردنظر شدند (۳۸). وو و همکاران (۲۰۱۲) نیز با به‌کارگیری روش رسوب با ضد حلال ترکیب‌های تیمول و کارواکرول را در پروتئین زئین درون‌پوشانی نمودند (۳۶).

فرضیه ما بر این مبنا استوار است که با درون‌پوشانی عصاره‌ی بابونه در پروتئین‌های آب‌پنیر با روش رسوب با ضد حلال امکان تهیه نوشیدنی شفاف غنی شده از پلی‌فنول‌های پایدار فراهم می‌شود؛ بنابراین هدف از این پژوهش، افزایش پایداری نوشیدنی شفاف بر پایه عصاره بابونه (به‌عنوان مدلی از ترکیبات زیست فعال (پلی‌فنول‌ها) آب‌دوست) و پیشگیری از بروز کدورت در نوشیدنی شفاف اسیدی با استفاده از نانو درون‌پوشانی است.

فراهم می‌سازد. بنابراین دلایل ذکر شده، درون‌پوشانی عصاره بابونه به دلیل وجود مقادیر فراوان ترکیبات پلی‌فنولی امری ضروری به نظر می‌رسد. درون‌پوشانی به‌عنوان فناوری بسته‌بندی مواد جامد، مایع و گاز در پوشینه‌های کوچک و بی‌منفذ تعریف شده است؛ این پوشینه‌ها قادرند محتویاتشان را تحت شرایط معین، با یک آهنگ ثابت و کنترل‌شده رها سازند (۸، ۱۱). ترکیبات زیست فعال گیاه بابونه از دسته پلی‌فنول‌ها بوده که گروه بزرگی از ترکیبات سلامت بخش آب‌دوست را تشکیل می‌دهند. ترکیبات پلی‌فنولی با استفاده از روش‌هایی مانند ریز درون‌پوشانی با خشک‌کردن پاششی<sup>۱</sup>، پوشش دادن با بسترسیال<sup>۲</sup>، درون‌پوشانی با روزن‌رانی<sup>۳</sup>، کواسرواسیون<sup>۴</sup>، اسپری چیلینگ<sup>۵</sup>، واردکردن مولکول در بتاسیکلودکسترین<sup>۶</sup>، به دام انداختن در لیپوزوم<sup>۷</sup> و به دام انداختن در هیدرو ژل<sup>۸</sup> درون‌پوشانی شده‌اند (۱۲، ۱۴).

روش رسوب با ضد حلال<sup>۹</sup> از ریز درون‌پوشانی با کواسرواسیون نشأت می‌گیرد. مرحله اصلی در این روش افزودن یک عامل ضد حلال مانند نمک یا الکل به محلول پروتئین تا حد ایجاد کدورت در آن است. ضد حلال ساختار سوم پروتئین را تغییر می‌دهد و پروتئین به علت آبگیری توسط الکل یا نمک، در فاز جداگانه‌ای رسوب می‌کند (۱۶). از مزایای روش رسوب با ضد حلال می‌توان به سادگی، آسانی، سرعت و تک‌مرحله‌ای بودن آن اشاره داشت. در این روش، نانو ذرات به‌صورت لحظه‌ای تشکیل می‌شوند و فقط به دو حلال قابل اختلاط نیاز است. پلیمر و ماده

1. Spray-drying microencapsulation
2. Fluidized bed coating
3. Extrusion encapsulation
4. Coacervation
5. Spray chilling
6. Molecular inclusion using  $\beta$ -cyclodextrin
7. Liposome entrapment
8. Hydrogel entrapment
9. Antisolvent precipitation

10. Extended shearing rate
11. Sonication
12. Entrapment
13. Cranberry

## مواد و روش‌ها

**مواد اولیه:** برای تولید نانو ذرات از ایزوله پروتئین آب‌پنیر با خلوص ۹۰ درصد محصول شرکت آرلا کشور دانمارک استفاده شد. آنزیم‌های پپسین، تریپسین و ترانس گلوتامیناز از شرکت سیگما-آلدریچ کشور ایرلند و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک کشور آلمان خریداری شدند.

**تهیه عصاره‌ی هیدروالکلی بابونه:** بابونه رقم آلمانی از یکی از بازارهای محلی در شهر تهران خریداری شد. ۵۰۰ گرم از گل‌های تازه بابونه در درجه حرارت آزمایشگاه خشک و کاملاً خرد شد. سپس گل‌های خشک‌شده به یک ارلن مایر ۱۰۰۰ میلی‌لیتری حاوی آب: اتانول به نسبت ۱۰۰:۹۰۰ منتقل و به منظور عصاره‌گیری به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. عصاره تولید شده در حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک و به پودر تبدیل شد. ۵۰ گرم از پودر تولیدی در ۵۰ میلی‌لیتر روغن‌زیتون حل و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه<sup>۱</sup> قرار داده شد. در طول این مدت، مخلوط حاصل روزانه به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد. مخلوط در نهایت با استفاده از پارچه صافی (پارچه موسیلین) صاف گردید (۲۳، ۲۵).

**ایجاد اتصال عرضی<sup>۲</sup> پروتئین‌های آب‌پنیر به روش آنزیمی به منظور بهبود ویژگی‌های نانو ذرات ترسیب شده:** محلول پروتئین آب‌پنیر با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با انحلال پودر پروتئین آب‌پنیر در آب دوبار تقطیر حاوی سدیم آزید<sup>۳</sup> (۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و همزنی آن با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه در دمای محیط (۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد) طی مدت

دو ساعت تهیه شد. به منظور آبدار شدن کامل پروتئین، محلول تهیه‌شده به مدت یک شبانه‌روز در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول پروتئین در حمام آبی با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه پیش حرارت‌دهی شد و بلافاصله تا دمای محیط سرد گردید. pH محلول پروتئین پیش حرارت‌دهی شده، با استفاده از هیدروکسید سدیم دو مولار تا ۸ تنظیم شد زیرا فعالیت آنزیم ترانس گلوتامیناز به‌طور معنی‌داری در pH های بالاتر از ۸ و کمتر از ۵ کاهش می‌یابد (۳۸). سپس آنزیم ترانس گلوتامیناز (با نسبت ۵۰۰ میکرولیتر به سه گرم پروتئین) به محلول پروتئینی افزوده شد. محلول پروتئینی و آنزیم ترانس گلوتامیناز در یک ظرف در بسته بی‌منفذ حین همزنی با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.

**تهیه نانو ذرات و نانو کپسول از پروتئین‌های آب‌پنیر اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی:** نمونه شاهد (بدون اتصال عرضی) با تنظیم pH محلول پروتئین تا ۸ به کمک هیدروکسید سدیم دو مولار تهیه و در شرایط مشابه دو نمونه‌ی قبل به مدت ۱۵ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. تنظیم pH منجر به تشکیل ذرات کوچک‌تر شد. برای تهیه‌ی نانو ذرات از محلول‌های پروتئین اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی و نمونه شاهد، ضد حلال (اتانول خالص؛ ۳/۵ میلی‌لیتر به ازای هر میلی‌لیتر محلول پروتئین) با سرعت حجمی یک میلی‌لیتر در دقیقه با شدت همزنی ۵۰۰ دور بر دقیقه تا لحظه کدر شدن محلول‌های پروتئین به محلول‌های مذکور افزوده و مخلوط گردید. سپس سوسپانسیون نانو ذرات حاصله با سرعت ۱۸۰۰۰ برابر شتاب گرانش زمین<sup>۴</sup> به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. نانو ذرات به‌دست‌آمده با استفاده از خشک‌کن تحت خلأ

1. Incubator
2. Cross-linking
3. Sodium azide

4. 18000 g

اندازه‌ی ذرات هر نمونه از سه بار اندازه‌گیری در هر آنالیز به دست آمد. توزیع متوسط اندازه ذرات به صورت حجمی بیان شد.

**تعیین بازده تولید ذره و بازده درون پوشانی ذرات:**  
برای محاسبه بازده تولید ذره از وزن حبه‌های خشک ذرات و کپسول‌ها بر مبنای رابطه ۱ استفاده شد. بازده درون پوشانی به عنوان مقدار عصاره‌ی درون پوشانی شده در کپسول‌ها تعریف و بر اساس رابطه ۲ محاسبه شد.

وزن حبه ذرات خشک

وزن پروتئین آب پور و عصاره استفاده شده برای تولید ذرات

**بازده تولید ذره**

رابطه (۱)

بازده درون پوشانی =  $\frac{\text{وزن عصاره آزاد} - \text{وزن اولیه عصاره}}{\text{وزن اولیه عصاره}}$

پس از سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون ذرات، مقدار پلی فنول‌های محلول عصاره آبی و نانو ذرات در مایع شفاف روماندا<sup>۳</sup> به وسیله اسپکتروفوتومتری در طول موج ۷۶۰ نانومتر تعیین شد. منحنی کالیبراسیون جذب استاندارد نیز به ازای غلظت‌های مختلف ترسیم شد.

**ریز نگاره میکروسکوپ الکترونی:** شکل، مرفولوژی، یکپارچگی پوشش و توپوگرافی سطحی نانو ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی شد. برای تصویربرداری از نمونه‌ها، حدود یک میلی گرم از هر نمونه روی پایه‌های مخصوص میکروسکوپ با کمک چسب پلی کربنی قرار داده شده سپس نمونه‌ها با کمک دستگاه روکش دهنده طلا، طلا پوشی شدند. ضخامت روکش طلا حدود ۱۰۰ انگستریم بود.

**تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی:** اندازه و توپوگرافی نانو ذرات پروتئینی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ نیروی اتمی با شیوه ضربه زنی<sup>۴</sup> بررسی

در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به پودر تبدیل شدند و برای آزمون‌های موردنظر مورداستفاده قرار گرفتند. برای تهیه نانو کپسول حامل عصاره بایونه، تمام مراحل شبیه به تیمار اول بود با این تفاوت که پودر عصاره بایونه به عنوان یک مدل از ترکیبات زیست فعال آب دوست با نسبت وزنی ۰/۰۶ و ۰/۰۴۵ درصد (وزنی-وزنی) به فاز آب گونه شامل محلول پروتئینی (نسبت وزنی پودر عصاره بایونه به پروتئین ۱ به ۱۵ و ۱ به ۲۰) اضافه گردید.

**آنالیزهای شیمیایی**

**تعیین میزان ترکیبات فنولی کل در عصاره بایونه:**  
ترکیبات فنولی کل به روش فولین-سیوکالتو براساس روش اصلاح شده سینگلتون و روسی (۱۹۶۵) اندازه‌گیری شد (۳۲). در این روش ۳۰ میکرولیتر عصاره بازسازی شده با درصد ماده خشک ۰/۶ درصد با ۲/۳۷ میلی لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط و ۱۵۰ میکرو لیتر محلول فولین-سیوکالتو به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۸ دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند. سپس ۴۵۰ میکرو لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن‌ها اضافه و شدت جذب پس از ۷۰ دقیقه نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. نتایج بر اساس معادل میلی گرم اسید گالیک در لیتر عصاره بیان گردید. جهت رسم منحنی استاندارد در اندازه‌گیری فنول کل از اسید گالیک استفاده شد.

**آزمون تعیین اندازه ذرات<sup>۱</sup>:** اندازه نانو ذرات و شاخص بسپارش<sup>۲</sup> با روش پراکنش نور دینامیکی با استفاده از زتاسایزر مالورن تعیین شد. به این منظور، نانو ذرات به نسبت ۱:۲۰۰ (وزنی / حجمی) در ۱۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر پراکنده شدند. متوسط

3. Supernatant

4. Tapping

1. Dynamic Light Scattering

2. Polydispersity

غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر به لوله آزمایش محتوی اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال افزوده شد. هضم به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس هر نمونه‌ی هضم شده با سرعت ۱۰۰۰۰ برابر شتاب گرانش زمین به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رومانند دور ریخته شد و حبه‌های رسوب داده شده در ۱۰ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک ۲۰ درصد مجدداً پراکنده شدند. شدت جذب نانوذرات باز پراکنده شده در طول موج ۸۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد و برای تعیین میزان ذرات پایدار در برابر هضم معده‌ای در حضور آنزیم پپسین مورد استفاده قرار گرفت.

رهایش عصاره از ذرات پروتئین آب پنیتر اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی در محیط‌های شبیه سازی شده معده و روده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد بررسی شد. چهار محیط مورد بررسی شامل محلول نمکی بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۷/۴، محلول نمکی بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۲، محیط شبیه سازی شده معده با pH ۲ حاوی محلول آنزیم پپسین با غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر - اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال و محیط شبیه سازی شده روده با pH ۷/۴ حاوی محلول آنزیم تریپسین با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بودند. ۶۰ میلی گرم از هر نمونه ذرات تازه تهیه شده در ۳۰ میلی لیتر از هر چهار محیط حین همزنی با سرعت ۱۰ دور بر دقیقه حل شد. در فواصل زمانی مختلف از مرحله‌ی هضم، سه میلی لیتر از هر نمونه جهت سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه، ۵ دقیقه) نمونه برداری شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، مایع رومانند استفاده شد. شدت جذب عصاره درون پوشانی نشده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. میزان عصاره رهایش یافته به عنوان درصدی از عصاره درون پوشانی شده به دست آمده از بازده درون پوشانی گزارش می شود.

شد. تصاویر توپوگرافی در محدوده روبش ۵×۵ میکرومتر با وضوح تصاویر ۵۱۲ × ۵۱۲ پیکسل بود. گرماسنجی روبشی افتراقی<sup>۱</sup> (DSC): دو میلی گرم از هر نمونه به دقت توزین شد و در یک ظرف استاندارد آلومینیومی بدون تبادل حرارت با محیط بیرون، بر اساس برنامه دمایی صفر تا ۱۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد بر دقیقه و با عبور گاز نیتروژن با سرعت ۲۰ میلی لیتر بر ساعت پوشش شد. طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه<sup>۲</sup> (FTIR): طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه با استفاده از اسپکتروفتومتر مادون قرمز تبدیل فوریه (شرکت پرکین المر، مدل اسپکتروم وان، آمریکا) در گستره‌ی ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتیمتر انجام شد. برای این آزمون حدود دو میلی گرم نمونه نانو ذرات در یک هاون از جنس عقیق به صورت یک پودر نرم درآمده سپس حدود ۱۰ میلی گرم پودر بر مید پتاسیم به آن افزوده شد (۳۷). مخلوط کاملاً همگن به کمک یک قالب مخصوص و با فشار حدود ۱۰ تن به شکل یک قرص بسیار نازک شفاف درآورده شد. این قرص در محفظه دستگاه طیف سنج قرار داده شده و آنالیز داده‌های طیف مادون قرمز مربوط به نمونه انجام شد.

**پایداری نانوذرات پروتئینی در برابر هضم در محیط شبیه سازی شده:** اثر اتصال عرضی آنزیمی بر پایداری نانوذرات پروتئینی در محیط شبیه سازی شده معده در حضور آنزیم پپسین مطابق با روش کو و گاناسکاران (۲۰۰۶) بررسی شد (۱۸). ۱۲۰ میلی گرم از نانوذرات خشک شده تحت خلأ به لوله آزمایش منتقل، در ۱۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حل و با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ نرمال تا pH دو تنظیم شد. به منظور شروع هیدرولیز، محلول پپسین با

1. Differential Scanning Calorimetry (DSC)
2. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

## تجزیه و تحلیل آماری

تمامی تیمارها در سه تکرار انجام شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار برای سه تکرار گزارش شد. آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار آماری اس پی اس اس (نسخه ۱۶) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. میانگین‌ها در سطح احتمال خطای ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

میزان ترکیبات پلی فنولی عصاره‌ی بابونه: مقدار ماده جامد کل و ماده جامد محلول عصاره به ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۶ درصد بر اساس وزن خشک تعیین شد. مقدار ترکیبات فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب ۱۶۳۲ میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم وزن خشک و ۴۵/۱۵ میلی‌مولار ترولوکس در ۱۰۰ گرم وزن خشک بود.

اندازه و شاخص بسپارش ذرات تهیه‌شده از پروتئین‌های آب‌پنیر اتصال عرضی یافته آنزیمی: اندازه، شاخص بسپارش و بازده تولید نانوذرات پروتئین‌های آب‌پنیر اتصال عرضی یافته شده در جدول ۱ گزارش شده است. نتایج نشان داد تمام ذرات تولیدشده در مقیاس زیرمیکرونی بودند و توزیع اندازه ذرات به صورت دونمایی بود. اتصالات عرضی آنزیمی ایجادشده در مولکول‌های پروتئین اندازه ذره جمعیت اول ذرات را تقریباً به نصف کاهش داد (جدول ۱). علت این کاهش را می‌توان به ایجاد اتصالات عرضی بین مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر و به دنبال آن تشکیل پیوند درون‌مولکولی ایزو پپتیدی در بتالاکتوگلوبولین نسبت داد (۹، ۱۳). به علاوه، اتصالات عرضی مولکول‌های پروتئینی به روش آنزیمی کسر حجمی ذرات را افزایش، شاخص بسپارش را کاهش و ذرات یکنواخت‌تری ایجاد کرد. با درون‌پوشانی عصاره اندازه ذرات هر دو جمعیت افزایش یافت.

جدول ۱- اندازه و شاخص بسپارش نانوذرات از پروتئین‌های اتصال عرضی یافته آنزیمی و نانوذرات بارگیری شده با عصاره بابونه

Table 1- Size and polydispersity of WPI nanoparticles and commomile extract-loaded nanocapsules

| بسپارش<br>Polydispersity | جمعیت دوم (زیر میکرونی)<br>(درصد حجمی) | جمعیت اول (نانومتر)<br>(درصد حجمی)    | نمونه<br>Samples  |
|--------------------------|--|---------------------------------------|---|
|                          | Population II (nm) (%)                 | Population I (nm) (%)                 |   |
| 0.426±0.027 <sup>b</sup> | 334±15.2 <sup>c</sup><br>35.6±0.4      | 150 ± 10.2 <sup>a</sup><br>64.4 ± 1.3 | ذرات تهیه‌شده از پروتئین شاهد<br>Particles from non-cross-linked proteins   |
| 0.339±0.014 <sup>c</sup> | 359±4.7 <sup>b</sup><br>27.5±0.8       | 81 ± 2.3 <sup>c</sup><br>72.5 ± 0.6   | ذرات تهیه‌شده از پروتئین اتصال عرضی یافته آنزیمی<br>Particles from enzymatically cross-linked proteins  |
| 0.289±0.012 <sup>a</sup> | 388±2.5 <sup>a</sup><br>18.5±0.8       | 92±7.3 <sup>b</sup><br>81.5±0.4       | ذرات بارگیری شده با عصاره بابونه تهیه‌شده از پروتئین اتصال عرضی یافته آنزیمی با نسبت ۱:۲۰<br>Commomile extract loaded-particles from enzymatically cross-linked proteins (1:20) |

اعداد جدول به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار هستند. اعداد دارای حروف مشترک در ستون با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ( $p > 0.05$ ).

Values are given as mean  $\pm$  standard deviation. In each column, values with the same letters are not significantly different ( $p < 0.05$ )

بودند. این امر می‌تواند به دلیل نقش ترکیبات فنولی و سایر مولکول‌های موجود در عصاره به‌عنوان کانون‌هایی برای جاگیری و آرایش منظم‌تر پروتئین‌ها

درون‌پوشانی عصاره بابونه منجر به تولید ذرات همگن‌تر و کوچک‌تر شد؛ به عبارت دیگر نانو کپسول‌ها در مقایسه با نانوذرات از یکنواختی بیشتری برخوردار



درهم‌تنیده شده‌ای از مولکول‌های پروتئین به‌وسیله عوامل اتصال‌دهنده‌ی عرضی، میزان از دست رفتن آن‌ها در مایع رو شناور کاهش و بازده تولید افزایش یافت. لانگر و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از روش رسوب با ضد حلال، نانو ذراتی با بازده تولید ۶۵-۹۵ درصد از پروتئین آلبومین سرم انسانی تهیه کردند (۲۰). زو و همکاران (۲۰۱۲) نیز با استفاده از همین روش به نانوذرات پروتئین زئین با بازده تولید ۷۶ درصد دست یافتند (۳۸).

در اطراف آن‌ها باشد. همچنین امکان دارد مواد هسته با پروتئین‌های ماتریکس و دیواره‌ی کپسول برهمکنش‌های واندروالسی، هیدروژنی و آب‌گریز داده باشند (۲).

بازده تولید ذره و بازده درون پوشانی نانو کپسول حامل عصاره بابونه تهیه شده از پروتئین‌های آب پنیرو اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی: اتصال عرضی مولکول‌های پروتئین به روش آنزیمی بازده تولید نانوذرات را افزایش داد (جدول ۲). با تشکیل شبکه

جدول ۲- بازده تولید ذره و بازده درون پوشانی نانو کپسول حاوی عصاره‌ی بابونه

Table 2- Particle yield and encapsulation efficiency of whey protein isolate (WPI) particles and commomile extract-loaded nanocapsules

| بازده درون پوشانی (%)<br>Encapsulation efficiency (%) | بازده تولید ذره (%)<br>Particle yield (%) | نسبت عصاره به پروتئین<br>Extract to WPI ratio | نمونه<br>Sample  |
|---|---|---|--|
| -   | 78.4 ± 1.6 <sup>d</sup>                   | -   | ذرات تهیه شده از پروتئین شاهد<br>Particles from non-cross-linked proteins  |
| -   | 86.4 ± 2.7 <sup>c</sup>                   | -   | ذرات تهیه شده از پروتئین اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی<br>Particles from enzymatically cross-linked proteins   |
| 81.3 ± 2.3 <sup>a</sup>                               | 93.2 ± 1.5 <sup>a</sup>                   | 1:20  | ذرات بارگیری شده با عصاره بابونه تهیه شده از پروتئین اتصال عرضی یافته آنزیمی<br>Cammomile extract loaded-particles from enzymatically cross-linked proteins (1:20)   |
| 74.2 ± 1.3 <sup>b</sup>                               | 89.2 ± 1.1 <sup>b</sup>                   | 1:15  | ذرات بارگیری شده با عصاره بابونه تهیه شده از پروتئین اتصال عرضی یافته‌ی آنزیمی<br>Cammomile extract loaded-particles from enzymatically cross-linked proteins (1:15) |

اعداد جدول به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. اعداد دارای حروف مشترک در ستون با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند (p>۰/۰۵).

Values are given as mean ± standard deviation. In each column, values with the same letters are not significantly different (p<0.05)

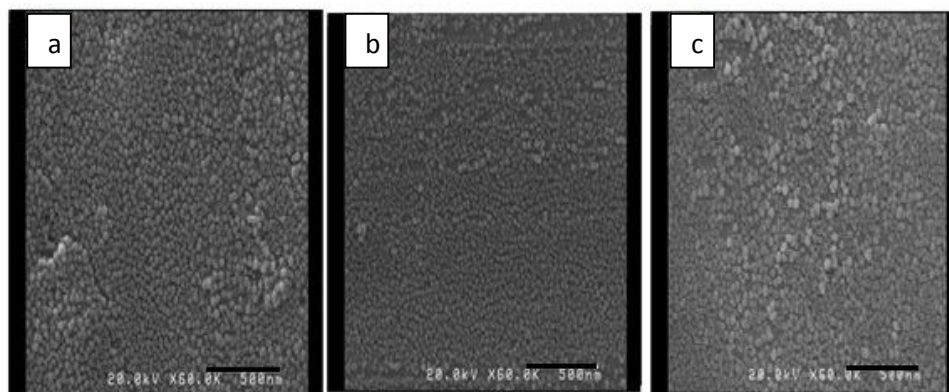
تولید ذره و بازده درون پوشانی کاهش یافت (جدول ۲). با افزایش غلظت عصاره در نانو کپسول‌ها، برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و پروتئین-پلی فنول

افزودن عصاره به نانوذرات، بازده تولید ذره را در مقایسه با نمونه فاقد عصاره افزایش داد (جدول ۲) ولی با افزایش غلظت عصاره در نانو کپسول‌ها، بازده

سطحی ذرات تولیدی نداشت. ردی و یانگ (۲۰۰۹) در تصویر فیلم تهیه شده از نشاسته پس از ایجاد اتصالات عرضی، تفاوتی مشاهده نمودند (۲۹). میانگین اندازه تصاویر میکروسکوپی نانوذرات حاصل از ترسیب مولکول‌های پروتئین بدون اتصال عرضی، نانوذرات حاصل از ترسیب مولکول‌های پروتئین اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی و نانوذرات شبکه اتصال عرضی یافته پروتئین به روش آنزیمی حامل عصاره به ترتیب  $36/7 \pm 8/1$  نانومتر (شکل ۱-ب) و  $39/4 \pm 2/6$  نانومتر (شکل ۱-الف)، گزارش شده در تفرق دینامیکی نور و ریزنگاره میکروسکوپ الکترونی به دلیل تفاوت در روش بررسی ذرات به حالت دیسپرسیون (در دستگاه پراکندگی نور دینامیکی) و لایه خشک شده (در میکروسکوپ الکترونی روبشی) است (۲۹، ۳۰).

تضعیف شده؛ این امر منجر به ورود و هدر رفت مقدار بیشتری عصاره و پروتئین به مایع شفاف روشنوار به جای درون پوشانی و شرکت در تشکیل ذره شده است. این مشاهده با نتایج زو و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی داشت (۳۸). در سایر ماتریکس‌های پلیمری نیز افزایش بیش از حد غلظت مواد هسته منجر به کاهش بازده درون پوشانی شده است (۲۲). بازده درون پوشانی پلی فنول‌ها در پروتئین در پژوهش حاضر بیش از ۷۴ درصد بود که نشانگر کارآمد بودن روش رسوب با ضدحلال است (جدول ۲). بازده درون پوشانی عنصر روی در نانوذرات تهیه شده از ترسیب پروتئین آب پنیر بیش از ۸۰ درصد گزارش شد (۱۵).

**مرفولوژی نانوذرات:** براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات دارای ساختار کروی بودند (شکل ۱). تشکیل شبکه گسترده پروتئینی به روش آنزیمی و درون پوشانی عصاره، تأثیری بر مرفولوژی



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات تهیه شده از رسوب دادن مولکول‌های پروتئین آب پنیر بدون اتصال عرضی (a)، اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی (b) و نانوذرات تهیه شده از رسوب دادن مولکول‌های پروتئین آب پنیر اتصال عرضی یافته آنزیمی حامل عصاره بایونه (c)

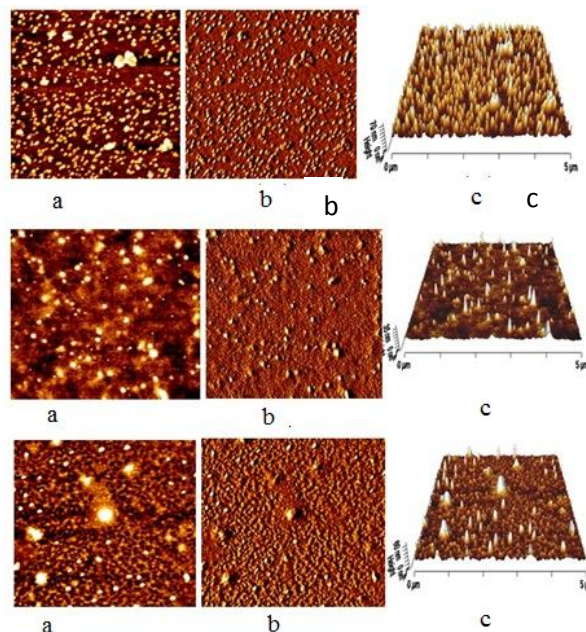
Figure 1- Scanning electron microscopic images (SEM) of whey protein isolate (WPI) particles obtained through desolvation of non-cross-linked (a) enzymatically-cross-linked (b), and commomile extract-loaded enzymatically cross-linked (c) whey proteins

نانو ذرات تهیه شده از ترسیب مولکول‌های پروتئین اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی و نانو ذرات شبکه اتصال عرضی یافته پروتئین به روش آنزیمی

**توپوگرافی نانوذرات:** توپوگرافی دوبعدی سیگنال خطا و توپوگرافی سه بعدی نانوذرات تهیه شده از ترسیب مولکول‌های پروتئین بدون اتصالات عرضی،

درون مولکولی و بین مولکولی تشکیل شده به وسیله آنزیم در میان مولکول‌های پروتئین نسبت داده شد که به تولید ذرات با ساختمان فشرده منجر شده است.

حامل عصاره در شکل ۲ نشان داده شده است. ارتفاع نانو ذرات پروتئین اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی کمترین مقدار بود. علت آن به اتصالات عرضی

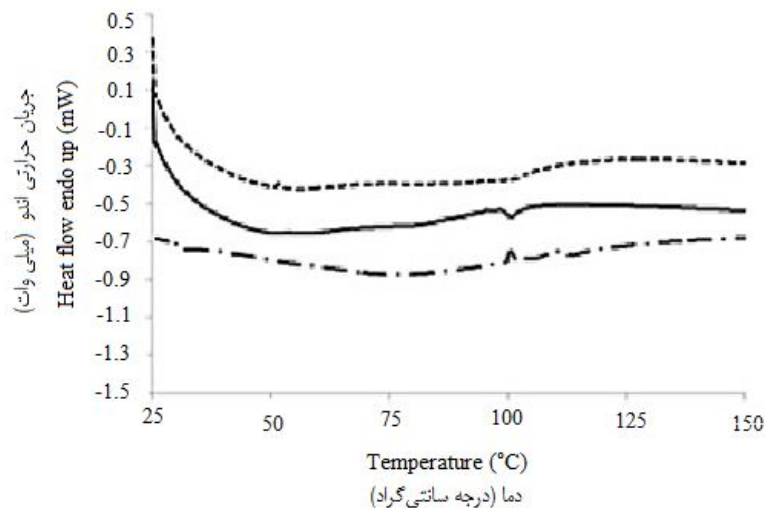


شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ نیروی اتمی توپوگرافی دوبعدی (a)، سیگنال خطا (b) و توپوگرافی سه‌بعدی (c) از نانوذرات تهیه شده از رسوب دادن مولکول‌های پروتئین آب پنیر بدون اتصال عرضی (بالا)، پروتئین آب پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی (وسط) و نانوذرات پروتئین آب پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی حامل عصاره بابونه (پایین)

Figure 2- Atomic force microscopy (AFM) images of a) 2D topography, b) error signal image, c) 3D topography of WPI particles obtained through desolvation of non-cross-linked (upper panel), enzymatically cross-linked (middle panel), and commomile extract-loaded enzymatically cross-linked (lower panel) whey proteins

طول حرارت‌دهی به دلیل پیش‌تیمار حرارتی اعمال شده بر پروتئین‌ها در تولید نانوذرات فاقد اتصال عرضی و واسرشتگی کامل پروتئین‌های سرمی است. ایجاد اتصال عرضی در مولکول‌های پروتئین به روش آنزیمی و درون‌پوشانی عصاره بابونه بر مقاومت حرارتی نانوذرات تولیدی بی‌تأثیر بود (شکل ۳).

گرماسنجی روبشی افتراقی: نمودار گرماسنجی روبشی افتراقی نانو ذرات حاصل از ترسیب مولکول‌های پروتئین بدون اتصال عرضی، اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی و نانوذرات شبکه اتصال عرضی یافته پروتئین به روش آنزیمی حامل عصاره در شکل ۳ مشاهده شده است. عدم حضور پیک در

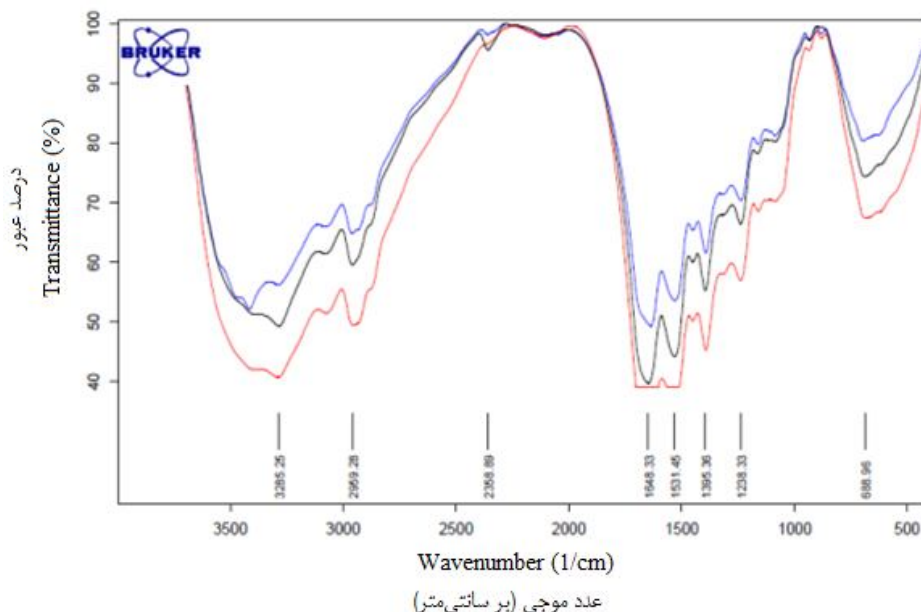


شکل ۳- نمودار گرماسنجی رویشی برای نانوذرات تهیه شده از ترسیب مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر بدون اتصال عرضی (خط-نقطه)، پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی (خط پیوسته) و نانوذرات پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی حامل عصاره بابونه (نقطه‌چین)

Figure 3- DSC thermograms of WPI particles obtained through desolvation of non-cross-linked ( — \* ), enzymatically cross-linked ( — ), and commomile extract-loaded-enzymatically cross-linked ( — ) whey proteins

در پروتئین‌های بکر و شکل‌گیری ساختمان بتای درون‌مولکولی بین توده‌های پروتئینی شد (۹). پیک مشاهده شده در عدد موجی ۳۳۰۰ بر سانتی‌متر در طیف مادون قرمز تبدیل فوریه تمام نانو ذرات مربوط به ارتعاشات کششی هیدروکسیل است. پیک ظاهر شده در ۲۹۶۰ بر سانتی‌متر طیف مادون قرمز تبدیل فوریه تمام نانوذرات تهیه شده از پروتئین فاقد اتصال عرضی و پیک مشابه ظاهر شده در ۲۹۵۸ بر سانتی‌متر ذرات پروتئینی اتصال عرضی یافته منسوب به کشش کربن-هیدروژن است. مقایسه طیف‌های نانوذرات تهیه شده از مولکول‌های پروتئینی با/ بدون اتصال عرضی (شکل ۴) نشان داد در شدت پیک آمید نوع اول تغییر ایجاد نشده است. این موضوع ثابت می‌کند هرچند زنجیره‌ی جانبی اسید آمینه گلوتامین که با لیزین در اثر ایجاد اتصالات عرضی به روش آنزیمی واکنش می‌دهد تغییر می‌کند، ایجاد اتصالات عرضی به روش آنزیمی بر کشش کربونیل بی‌اثر است (۹).

طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه: طیف‌سنجی ذرات تهیه شده از پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته و شاهد (بدون اتصال عرضی) در شکل ۴ نشان داده شده است. پیک‌های موجود در اعداد موجی ۱۶۵۱، ۱۵۲۸، ۱۴۵۰ و ۱۴۰۰ بر سانتی‌متر به ترتیب مربوط به آمید نوع اول، آمید نوع دوم، خمش‌های C-N و کشش‌های C-H است. باند آمید نوع اول منسوب به کشش C=O در ساختار آلفاهلیکس ساختمان ثانویه‌ی آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین است (۱۹، ۳۱). باند آمید نوع دوم مربوط به کشش C-N و خمش C-N-H است (۳۰). پیک مشاهده شده در ۶۷۲ بر سانتی‌متر مربوط به خمش N-H باند آمید نوع اول در ساختار آلفاهلیکس ساختمان ثانویه آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین است. ظهور پیک‌هایی در اعداد موجی ۱۲۳۹ یا ۱۲۴۰ بر سانتی‌متر منسوب به صفحات بتای ساختمان ثانویه پروتئین‌ها است (۳۰). پیش‌حرارت‌دهی پروتئین‌ها قبل از مرحله‌ی ترسیب منتج به از هم‌گسیختگی ساختمان بتا

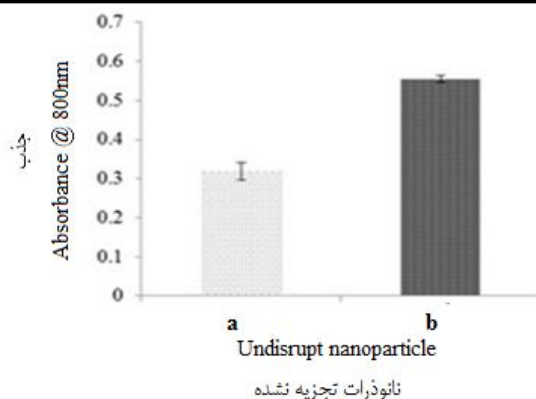


شکل ۴- نمودار طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه برای ذرات تولیدشده از ترسیب مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر بدون اتصال عرضی (آبی)، ذرات تولیدشده از ترسیب پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیم (سیاه) ذرات تولیدشده از ترسیب پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیم حامل عصاره بابونه (قرمز)

Figure 4- FTIR spectra of WPI particles obtained through desolvation of non-cross-linked (blue line), enzymatically cross-linked (black line) and commomile extract-loaded enzymatically cross-linked (red line) whey proteins

و به‌واسطه پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش‌های آب‌گریز در پروتئین درون‌پوشانی شده است (۱۶).  
 پایداری ذرات در شرایط شبیه‌سازی شده معده‌ای-  
 روده‌ای: نانوذرات در محیط شبیه‌سازی‌شده معده در حضور آنزیم پپسین به مدت یک ساعت مرحله هضم را طی کردند. در مقایسه با نانوذرات پروتئینی ترسیبی بدون اتصال عرضی، ایجاد اتصال عرضی به روش آنزیمی در مولکول‌های پروتئین موجب افزایش پایداری در برابر تجزیه‌ی پپسینی گردید زیرا آنزیم پپسین به‌سختی قادر به نفوذ به درون این ساختار فشرده تشکیل‌شده در اثر ایجاد اتصالات عرضی است. گاناسکاران و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی پیرامون نانوذرات بتالاکتوگلوبولین ترسیبی با استون گزارش کردند ایجاد اتصالات عرضی در نانوذرات به‌وسیله‌ی گلوکارآلدئید میزان هضم پپسینی را کاهش داد (۱۶).

در نمودار طیف‌سنجی نانوذرات حاصل از مولکول‌های پروتئین اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی و بدون اتصال عرضی، پیک‌های ظاهرشده در دامنه‌ی ۱۶۵۱-۱۵۲۸ بر سانتی‌متر دارای کمترین شدت هستند. کاهش شدت پیک‌ها نشانگر کاهش ساختار آلفاهلیکس در پروتئین در نتیجه دامیداسیون باقیمانده‌های گلوتامینیل است (۳۴). به‌طور کلی ایجاد اتصال عرضی آنزیمی در مولکول‌های پروتئینی، برهمکنش‌های آب‌گریز را تغییر داده؛ در حالی که ساختار آلفاهلیکس پروتئین بدون تغییر باقی‌مانده است. هیچ پیوند جدیدی در اثر درون‌پوشانی عصاره در درون پپتیدهای اتصال عرضی یافته شناسایی نشد. این امر نشانگر آن است که عصاره به‌صورت کاملاً فیزیکی و بدون تشکیل پیوند کووالانسی بین هسته و ماتریکس درون‌پوشانی شده است. گاناسکاران و همکاران (۲۰۰۷) گزارش دادند کافئین به‌طور فیزیکی



شکل ۵- تخریب و تجزیه نانوذرات تهیه شده از ترسیب مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر بدون اتصال عرضی (a)، ترسیب مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی (b) در حضور پپسین و pH=۲

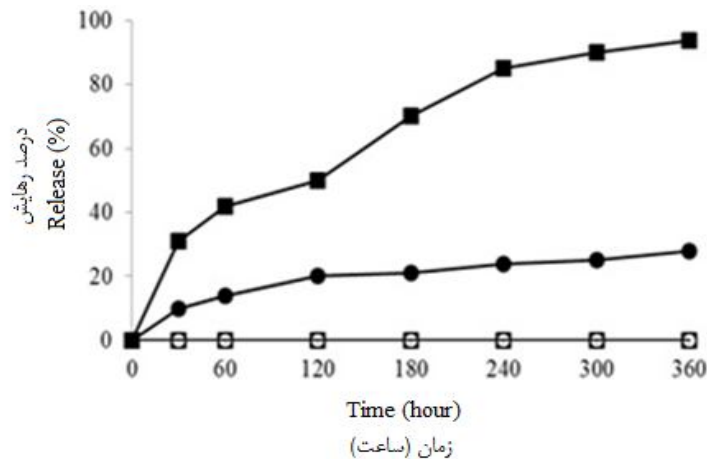
Figure 5- Degradation of WPI particles obtained through desolvation of non-cross-linked (⋯) and enzymatically cross-linked (■) whey proteins with pepsin at pH 2.0.

آهستگی رهائش یافت؛ به طوری که کمتر از ۲۰ درصد از عصاره درون پوشانی شده در طی ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری رهائش یافت. این زمان برای عبور غذا از معده به روده کوچک کافی است (۱۶). حتی پس از ۶ ساعت هضم پپسینی، تنها ۲۸ درصد از کل عصاره درون پوشانی شده رهائش یافت. از طرفی در شرایط شبیه‌سازی شده روده در حضور تریپسین در طی زمان، عصاره به طور یکنواخت رهائش یافت؛ به طوری که ۹۳ درصد از عصاره درون پوشانی شده در طی ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری رهائش یافت. تضاد بارزی بین سرعت تجزیه ماتریکس پروتئینی و رهائش عصاره در طی زمان مشاهده شد.

در این پژوهش علیرغم تجزیه ۷۰ درصد از ذرات در شرایط شبیه‌سازی شده معده در حضور پپسین پس از ۶ ساعت هضم پپسینی، تنها ۲۸ درصد از کل عصاره درون پوشانی شده رهائش یافت. رهائش عصاره در شرایط شبیه‌سازی شده روده در حضور تریپسین بسیار سریع‌تر از سرعت تجزیه ماتریکس پروتئینی بود.

رهائش عصاره در شرایط شبیه‌سازی شده معده‌ای - روده‌ای: پروفایل رهائش عصاره از ذرات ترسیبی مولکول‌های پروتئین اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی در طی زمان در شرایط شبیه‌سازی شده معده بدون حضور/ حضور پپسین و نیز شرایط شبیه‌سازی شده روده بدون حضور/ حضور تریپسین در شکل ۶ آورده شده است. عصاره درون پوشانی شده در ذرات تهیه شده از پپتیدهای اتصال عرضی یافته، در طی ۶ ساعت گرمخانه‌گذاری در محیط‌های اسیدی و خنثی (بدون حضور آنزیم‌های هضم‌کننده) در pH ۲ و ۷/۴ رهائش نداشت که این امر دلالت بر حفظ یکپارچگی ذرات طی زمان در این محیط دارد. گاناسکاران و همکاران (۲۰۰۷) در پژوهشی پیرامون بیدلت‌های ژل تهیه شده از سرم لاکتوآلبومین به روش ایجاد اتصالات عرضی با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز گزارش دادند اتصال عرضی بیدلت‌ها به وسیله آنزیم میزان رهائش کافئین را در شرایط شبیه‌سازی شده معده کاهش داد (۱۶).

در شرایط شبیه‌سازی شده معده در حضور پپسین، عصاره از ذرات پروتئینی اتصال عرضی یافته به



شکل ۶- رهائش عصاره از ذرات تولیدشده از ترسیب مولکول‌های پروتئین آب‌پنیر اتصال عرضی یافته به روش آنزیمی در طی زمان در شرایط شبیه‌سازی شده معده بدون حضور پپسین (دایره توخالی)، در شرایط شبیه‌سازی شده معده با حضور پپسین (دایره توپر)، در شرایط شبیه‌سازی شده روده بدون حضور تریپسین (مربع توخالی)، در شرایط شبیه‌سازی شده روده با حضور تریپسین (مربع توپر)

Figure 6- In-vitro release profile of extract from particles prepared from enzymatically cross-linked proteins in the simulated gastric fluid without pepsin (open circle), simulated gastric fluid with pepsin (solid circle), simulated intestinal fluid without trypsin (open square) and simulated intestinal fluid with trypsin (solid square)

امر منجر به افزایش کاربرد آن‌ها به‌عنوان حامل‌های پروتئینی برای درون‌پوشانی ترکیبات زیست‌فعال شد. به‌دلیل پایداری نانوذرات تهیه‌شده از پروتئین اتصال عرضی یافته آنزیمی پیشنهاد می‌شود از این نانوذرات در فرمولاسیون نوشیدنی‌های شفاف غنی‌شده با پروتئین استفاده شود.

### نتیجه‌گیری کلی

پروتئین‌ها پیش از مرحله رسوب‌دهی با ضد حلال با روش آنزیمی اتصال عرضی یافتند. سپس از طریق ترسیب پروتئین اتصال عرضی یافته آنزیمی نانوذرات تهیه شدند. پایداری نانو ذرات تهیه شده از پروتئین اتصال عرضی یافته در برابر هضم در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش افزایش یافت و این

### منابع

1. Babenko, N.O., and Shakhova, O.H. 2005. Age-dependent effects of flavonoids on secretory function of the rat liver. *Fiziolohichniy Zhurnal*. 51: 65-69.
2. Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., and Nagai, T. 1999. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 25: 471-476.
3. Bell, L.N. 2001. Stability testing of nutraceuticals and functional foods, P501-516, In: R.E.C. Wildman (ed.), *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, CRC Press, New York, USA.
4. Chevalier, A. 1996. *The encyclopedia of medicinal plant*. London, Pp: 54-61.
5. Cheyner, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81: 223-229.
6. Coester, C., Langer, K., von Briesen, H. and Kreuter, J. 1999. Gelatin nanoparticles by two step desolvation-A new preparation method, surface modification and cell uptake. *Journal of Microencapsulation*. 17: 2.187-193.

7. Damodaran, S., and Agyare, K.K. 2013. Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloid*. 30: 12-18.
8. Desai, K.G.H., and Park, H.J. 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23: 1361-1394.
9. Eissa, A.S., Puhl, C., Kadla, J.F., and Khan, S.A. 2006. Enzymatic cross-linking of  $\beta$ -lactoglobulin: Conformational properties using FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules*. 7: 6.1707-1713.
10. Fang, Z., and Bhandari, B. 2010. Encapsulation of polyphenols-a review. *Trends in Food Science and Technology*. 21: 510-523.
11. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., and Benita, S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*. 55: 1-4.
12. Gan, C.H.Y., Cheng, L.H., Phuah, E.T., Chin, P.N., Alkarkhi, A.F.M., and Easa, A.M. 2009. Combined cross-linking treatment of bovine serum albumin gel beadlets for controlled-delivery of caffeine. *Food Hydrocolloid*. 23: 1398-1405.
13. Gauche, C., Barreto, P.L.M., and Bordignon-Luiz, M.T. 2010. Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: Implications for functionality in processed dairy foods. *LWT-Food Science and Technology*. 43: 214-219.
14. Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alii, I., and Mulligan, C. 1999. Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 50: 3.213-224.
15. Gülseren, I., Fang, Y., and Corredig, M. 2012. Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol. *Food Chemistry*. 135: 770-774.
16. Gunasekaran, S., Ko, S., and Xiao, L. 2007. Used of whey protein for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*. 83: 31-40.
17. Haslam, E., and Lilley, T.H. 1988. Natural astringency in foodstuffs and molecular interpretation. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 27: 1-40.
18. Ko, S., and Gunasekaran, S. 2006. Preparation of sub-100-nm  $\beta$ -lactoglobulin (BLG) nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*. 23: 8.887-898.
19. Kretschmer, C.B. 1957. Infrared spectroscopy and optical rotatory dispersion of zein, wheat gluten and gliadin. *The Journal of Physical Chemistry A*. 61: 12.1627-1631.
20. Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Briesen, H.V., and Schubert, D. 2003. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 257: 169-180.
21. Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S., and Gu, L. 2011. Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55: 7.1096-1103.
22. Liu, N., and Park, H.J. 2009. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *Journal of Microencapsulation*. 26: 235-242.
23. Lin, W., Coombes, A., Davies, M., Davis, S., and Illum, L. 1993. Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *Journal of Drug Targeting*. 1: 3.1237-1243.24. Lindenmerer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C., and Lu, H. 2001. *Nutrition and Cancer*. 39: 1.139-147.
25. Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Diognes, A.G.C., de Mello, J.C.P., and Nakamura, C.V. 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) amazonensis and Trypanosomacruzi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. 41: 1.85-94.
26. Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M., and Komaitis, M. 2005. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*. 16: 319-323.
27. Remondetto, G.E., Beyssac, E., and Subirade, M. 2004. Iron availability from whey protein hydrogels: an in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 8137-8143.



28. Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Cara, R., Weill, R., and Boccio, J. 2002. Fortification strategies to combat zinc and iron deficiency. *Nutrition Reviews*. 60: 2.52-58.
29. Reddy, N., and Yang, Y. 2009. Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*. 118: 702-711.
30. Seo, J.A., Hédoux, A., Guinet, Y., Paccou, L., Affouard, F., Lerbret, A., and Descamps, M. 2010. Thermal denaturation of beta-lactoglobulin and stabilization mechanism by trehalose analyzed from Raman spectroscopy investigations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114: 19.6675-6684.
31. Sessa, D.J., Mohamed, A., and Byars, J.A. 2008. Chemistry and physical properties of melt-processed and solution-cross-linked corn zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 16.7067-7075.
32. Singleton, V.L., and Rossi, J.A. Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and viticulture*. 16: 144-158.
33. Siebert, K.J., Troukhanova, N.V., and Lynn, P.Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agri. Food Chemistry*. 44: 80-85.
34. Tyler, V.E. 1993. In: George, F (ed.), *The honest herbal*, Stickley Company, Philadelphia, USA.
35. Wang, R., Tian, Zh., and Chen, L. 2011. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmacy*. 406: 153-162.
36. Wu, Y., Luo, Y., and Wang, Q. 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquid-liquid dispersion method. *LWT-Food Science and Technology*. 48: 283-290.
37. Zhong, Q., Tian, H., and Zivanovic, S. 2009. Encapsulation fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. *Journal of Food Processing and Preservation*. 33: 255-270.
38. Zou, T., Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S., and Gu, L. 2012. Nanoparticles Fabrication, characterization, and cytotoxicity evaluation of cranberry procyanidins-zein. *Food Hydrocolloid*. 27: 293-300.

## Encapsulation of Chamomile Extract in Nanoparticles Prepared via Anti-solvent Precipitation Technique

L. Bagheri<sup>1\*</sup>, M.A. Shamekhi<sup>2</sup> and M. Kargozari<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology,  
Sarvestan Branch, Islamic Azad University, Sarvestan, Iran

<sup>2</sup>Lecturer, Department of Polymer Engineering, Sarvestan Branch, Islamic Azad University,  
Sarvestan, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology,  
North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 2015/03/18; Accepted: 2015/10/10

### Abstract

**Background and objectives:** Chamomile extract contains bioactive materials such as Terpenoids,  $\alpha$ -bisabolol and Chamazulene and polyphenolic compounds including apigenin, quercetin and patuletin which have considerable antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticonvulsant, anti-allergic, antifungal and anti-pyretic activities. However, incorporation of these active compounds into foods may cause quality defects including astringent taste and increased haze in beverages. They also act as substrates for browning reactions resulting in undesirable color changes in food products. As well, bioactive substances may undergo degradation by exposure to heating, light and oxygen during food processing operations and storage or in the gastrointestinal tract (acidic pH and enzymes). Nanoencapsulation of bioactive molecules is an efficient strategy to overcome these problems without any adverse effect on sensory characteristics and appearance of the final product. In the present research, it is aimed to encapsulate the chamomile extract into nanoparticles obtained from whey protein isolate (WPI) via anti solvent precipitation technique to be used for enhancing health-promoting effects of beverages.

**Materials and methods:** Whey protein solution was prepared by dissolving whey powder in bi-distilled water. The solution was preheated in a water bath at 80 °C for 15 min. Then, whey proteins were inter-connected by using transglutaminase. The cross-linked protein solution was charged with absolute ethanol. Finally, nanoparticles were collected using centrifugation.

**Results:** An encapsulation efficiency of ~81% was obtained in 1:20 mass ratio of extract-to-WPI. Light scattering measurement of hydrodynamic size of particles showed a bimodal pattern for all particles. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy suggested that extract and whey proteins interacted via hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Enzymatically cross-linking of proteins was revealed by FTIR spectroscopy.

**Conclusion:** According to *in-vitro* tests carried out at a simulated gastro-intestinal media, it was observed that nano-particle structure was improved by crosslinking in whey proteins. Cross-linking of whey proteins slowed down the release rate of entrapped extract from particles in the simulated gastric fluid.

**Keywords:** Antisolvent precipitation, Cross-linking, chamomile extract, whey protein nanoparticles, Target release

---

\* Corresponding author: Leilabagheri@alumni.ut.ac.ir