

مقاله پژوهشی

الکترو ریزپوشانی لیکوپن در ساختار میکروالیاف پروتئینی: بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و زیست‌دسترسی

اسماعیل چهارپاشلو^۱، محبت محبی^{۲*}، بهروز قرآنی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۶، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۶/۱۰/۲۶، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۷

چکیده

لیکوپن، رنگ‌دانه کاروتنوئیدی چربی‌دوست دارای خواص سلامتی‌بخش ویژه‌ای است، به این دلیل بسیاری از محققین، آن را به‌عنوان یک ماده ارزشمند می‌شناسند. پایداری بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال به‌علت فرایندهای گوناگون فیزیکوشیمیایی و فیزیولوژی محدود می‌شود، به‌همین منظور استفاده از روش‌های مختلف ریزپوشانی جهت آزاد شدن کنترل‌شده و افزایش میزان پایداری ترکیبات زیست‌فعال، امری ضروری می‌باشد. در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف محلول زئین به میزان ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ w/v٪، بر تولید الیاف زئین با استفاده از روش الکتروریسی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه از غلظت بهینه جهت ریزپوشانی لیکوپن در دو سطح ۰/۰۷۵ w/w٪ و ۰/۰۵٪ استفاده و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی الیاف زئین حاوی لیکوپن مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین پروفایل رهایش لیکوپن در سه فاز دستگاه گوارش انسان؛ دهان، معده و روده کوچک، بررسی شد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد الیاف یکنواخت، همگن و بدون مهره برای زئین حاصل گردیده است. راندمان ریزپوشانی لیکوپن در دو نمونه بین ۰/۷۸۸-۰/۸۵۶۸٪ متغیر بوده است. نتایج حاصل از آزمون FTIR حاکی از آن است که ریزپوشانی به‌صورت موفقیت‌آمیز صورت گرفته و از نوع فیزیکی می‌باشد. علاوه بر این رهایش کنترل‌شده و پایدار از لیکوپن در دستگاه گوارش مشاهده شده که این سبب افزایش در زیست‌دسترسی آن شده است. ریزپوشانی با استفاده از الیاف الکتروریسی شده زئین، پتانسیل بالایی به‌عنوان یک سیستم رسانش هدفمند مناسب برای لیکوپن دارد. از این‌رو استفاده از این روش برای ریزپوشانی لیکوپن در صنعت غذا توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: الکترو ریزپوشانی، الکتروریسی، زیست‌دسترسی، زئین، لیکوپن.

۱. مقدمه

فرایند الکترورسی فرایندی ساده و یک مرحله‌ای برای تولید الیاف است که در آن از حرارت استفاده نمی‌شود. مبنای الکترورسی، استفاده از نیروی کششی میدان الکتریکی بین قطره معلق محلول یا مذاب در نوک سوزن و صفحه جمع‌کننده است. زمانی که شدت میدان الکتریکی بر کشش سطحی محلول پلیمری غلبه کند، جریان جت گونه‌ای از سطح قطره خارج شده و به سمت صفحه هدف حرکت می‌کند و الیاف به صورت لایه‌ای بی‌بافت شکل می‌گیرند [۲]. الکترورسی از طیف گسترده‌ای از مواد پلیمری زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر نظیر پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها، به‌عنوان مواد دیواره برای ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال استفاده می‌کنند. ترکیبات پروتئینی متداول که به‌عنوان دیواره جهت ریزپوشانی به روش الکترورسی به کار می‌روند شامل ایزوله پروتئین آب‌پنیر [۵]، کنسانتره پروتئین آب‌پنیر [۶]، ایزوله پروتئین سویا [۷]، آلبومین تخم‌مرغ [۸]، کلاژن [۹]، ژلاتین [۱۰]، زئین [۱۱] و کازئین [۱۲] هستند. مزایای استفاده از تکنیک‌های الکترورسی، ریزپوشانی با کارایی بالا، رهايش ثابت و پایدار مواد ریزپوشانی شده، پایداری مناسب در برابر حرارت، نور و در نتیجه افزایش زمان نگهداری و هم‌چنین حفاظت مواد فعال زیستی از تخریب شیمیایی می‌باشد [۲]. اما همانند هر تکنیک تازه ظهور در یک حوزه علمی، استفاده صنعتی از این روش نیازمند اصلاح فرایند و تطبیق آن با نیازهای تولید است. هم‌چنین محدودیت در انتخاب نوع حلال از جمله چالش‌های مرتبط با استفاده از این تکنیک می‌باشد.

لیکوپن رنگ‌دانه کاروتنوئیدی چربی‌دوستی است که تنها در گیاهان یافت می‌شود. این رنگ‌دانه دارای خواص سلامتی بخش ویژه‌ای از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی است، به‌همین دلیل بسیاری از محققین، آن را به‌عنوان یک ماده ارزشمند می‌شناسند. لیکوپن از لحاظ ساختاری، یک هیدروکربن چربی‌دوست غیراشباع است، به‌همین دلیل در سامانه‌های آبدار به شکل کریستال رسوب می‌کند. شواهد به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که لیکوپن ممکن است باعث تحریک سیستم ایمنی گردد [۱۳].

یکی از نکات مهمی که در ریزپوشانی باید مدنظر قرار گیرد، زیست‌دسترسی مواد و ترکیبات فعال زیستی می‌باشد. در اوایل سال ۲۰۰۰ این واژه توسط دانشمندان مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفت و برای هر مولکول زیست‌فعالی که در شکل قابل جذب خود در شرایط معده، از غذا آزاد می‌شود به‌کاربرده شد [۱۴].

ریزپوشانی تکنیکی جهت حفاظت از اجزا و ترکیبات حساس در برابر عوامل فیزیکیوشیمیایی سخت محیطی می‌باشد. با استفاده از این روش، ضمن جلوگیری از هدر رفتن ترکیبات فرار و حساس، رهايش کنترل شده‌ای برای آن‌ها می‌توان ایجاد نمود. بنابراین ترکیبات زیست‌فعالی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها و هم‌چنین ترکیبات مولد طعم و بو می‌توانند با استفاده از این روش به شکل پایدارتری تبدیل شوند [۱].

تکنیک‌های مختلفی اعم از میکرو و نانو کپسولاسیون، به‌عنوان مثال خشک‌کردن پاششی، خشک‌کردن انجمادی، روش‌های اکستروژن، پوشش‌دهی بسترسایال، امولسیون‌سازی، کوآسرواسیون (روش توده‌ای) و نانو ترسیب، برای حفاظت ترکیبات زیست‌فعال وجود دارند که هر یک از آن‌ها دارای محاسن و معایبی هستند. با این حال، برخی از این روش‌ها نیاز به حرارت داشته و یا مواد آلی حداقل در یکی از مراحل تولید آن‌ها وجود دارند که این امر منجر به تخریب مواد مغذی حساس ریزپوشانی شده می‌گردند. این در حالی است که هم‌چنان مشکلات مرتبط با سمیت ناشی از عوامل باقی‌مانده مواد آلی وجود دارد. خشک‌کردن پاششی یکی از معمول‌ترین روش‌ها برای ریزپوشانی می‌باشد. هزینه پایین و سادگی نسبی این روش، مهم‌ترین دلیل برای کاربرد گسترده این روش در صنعت است. با این حال، استفاده از خشک‌کردن پاششی برای ترکیبات زیست‌فعال، به‌دلیل اعمال دمای بالا طی خشک‌کردن و ثبات و پایداری پایین حین انبارمانی محصول نهایی از نظر تجاری هنوز توسعه نیافته است. اصلی‌ترین عامل محدودکننده این روش شمار محدود مواد دیواره است که الزاما باید در آب حلالیت خوبی داشته باشند. عیب دیگر این روش این است که پودر میکروکپسول‌های حاصل بسیار ریز بوده و نیازمند فرایند بعدی هم‌چون اگلومریزاسیون می‌باشد [۲]. خشک‌کردن انجمادی نیز یکی از کم‌ضررترین و معمول‌ترین روش‌ها برای خشک‌کردن ترکیبات زیست‌فعال و پروبیوتیک‌ها است. با این حال این روش نیز فرایندی بسیار گران است [۳]. نیاز به انرژی بالا و زمان طولانی فرایند از معایب اصلی خشک‌کردن انجمادی می‌باشد. علاوه بر این، در طول فرایند، مانعی با ساختار متخلخل بین عامل فعال و محیط احاطه‌کننده آن شکل می‌گیرد که تخلخل بالای این محیط، حفاظت ضعیفی را بر روی ترکیب ریزپوشانی شده اعمال می‌کند [۴].

شد. نتایج این پژوهش نشان داد اسید گالیک پس از ریزپوشانی توسط نانوالیاف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را حفظ کرده است [۲۱]. در رابطه با اطلاعات پیشین در مورد الکتروریزپوشانی ترکیبات فعال زیستی مقالاتی در منابع وجود دارند که نتایج آرایه شده توسط آن‌ها نشان می‌دهد این پروتئین می‌تواند با استفاده از محلول اسید استیک الکتروریسی شده و الیاف یکنواخت، همگن و عاری از مهره^۱ ایجاد نماید [۱۸، ۱۹]. اما در رابطه با الکتروریزپوشانی ترکیبات فعال زیستی و بررسی خصوصیات زیست‌دسترسی آن‌ها گزارشی در منابع وجود ندارد و به همین دلیل انجام تحقیقات بیش‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از این تحقیق، الکتروریزپوشانی لیکوپن در الیاف پروتئینی زئین به‌عنوان حامل می‌باشد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی الیاف زئین حاوی لیکوپن بررسی شده و برای نخستین بار، زیست‌دسترسی لیکوپن الکتروریزپوشانی شده مورد مطالعه قرار گرفته است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه مواد اولیه

پودر زئین با شماره کاتالوگ Z3625 از شرکت سیگما آلدریج اسپانیا، اسید استیک گلاسیال با خلوص ۹۹/۹۵٪ از شرکت سام‌چون کره جنوبی، لیکوپن با درصد خلوص ۹۰٪ از شرکت پاب‌چم ایالات‌متحده آمریکا، پپسین، شیره پانکراس و لیباز از شرکت سولاریو چین خریداری شد. نمک‌های صفاوی از شرکت سیگما آلدریج اسپانیا با خلوص آزمایشگاهی تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نظیر سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، اوره، بی‌کربنات سدیم، هگزان و اسید کلریدریک نیز از شرکت مرک آلمان با خلوص آزمایشگاهی خریداری گردیدند.

۲.۲. تهیه محلول پلیمری

غلظت‌های مختلف w/v ۳۵٪، ۳۰٪، ۲۵٪، ۲۰٪، ۱۵٪، از طریق حل کردن پودر زئین در اسید استیک گلاسیال در دمای اتاق °C ۲۵ توسط همزن مغناطیسی با سرعت rpm ۴۰۰ به مدت min ۲۰ تهیه گردید. هدف از تهیه چند غلظت، به‌دست آوردن

به‌طور کلی زیست‌دسترسی به‌عنوان قسمتی از یک ترکیب که از ساختار غذایی در شرایط گوارشی آزاد شده و در نهایت برای جذب در روده قابل دسترس است، تعریف می‌شود [۱۵]. زیست‌دسترسی بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال چربی‌دوست به علت فرایندهای گوناگون فیزیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از جمله آزاد شدن محدود از ساختار غذا یا دارو، حلالیت کم در شیره معده و روده و نفوذپذیری پایین در سلول‌های بافت پوششی محدود می‌شود [۱۴]. به‌همین دلیل استفاده از بیوپلیمرها و روش‌های مختلف ریزپوشانی برای آزاد شدن کنترل‌شده و هم‌چنین افزایش سطح زیست‌دسترسی ترکیبات زیست‌فعال امری ضروری می‌باشد.

زئین از جمله پرولامین‌ها با وزن مولکولی حدود ۴۰ KDa می‌باشد. زئین به چهار گروه، α -زئین، β -زئین، γ -زئین و δ -زئین تقسیم می‌شود. زئین دارای خصوصیات آمفی‌فیلیک می‌باشد. اما بیش‌تر رفتار پروتئین آب‌گریز از خود نشان می‌دهد. بنابراین در اسید استیک گلاسیال، اتانول، استون و استیل استون محلول است، اما در آب حل نمی‌شود. از لحاظ ساختاری در زئین نسبت اسیدهای آمینه آب‌گریز غیر قطبی به اسیدهای آمینه آب‌دوست قطبی بیش‌تر است. متوسط آب‌گریزی زئین حدود ۵۰ بار بیش‌تر از آلبومین، فیبرینوژن و غیره می‌باشد [۱۶]. زئین دارای پایداری حرارتی بالا و ممانعت‌کنندگی نسبت به اکسیژن و مواد فرار (عطر و طعم) می‌باشد [۱۷]. هم‌چنین به دلیل داشتن اسیدهای آمینه غیر قطبی مثل لوسین، آلانین و پرولین در آب نامحلول است [۱۶]. زئین قابلیت ریسیده شدن توسط فرایند الکتروریسی را دارا بوده و الیاف حاصل از آن دارای پایداری حرارتی بالاتری نسبت به فیلم‌های زئینی می‌باشد [۱۷].

یائو و همکاران تولید نانوالیاف زئین توسط فرایند الکتروریسی و ایجاد اتصالات عرضی جهت بهبود خصوصیات فیزیکی آن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد مورفولوژی نانوالیاف وابسته به غلظت زئین می‌باشد. شرایط بهینه محلول برای تولید نانوالیاف زئین، نسبت w/v ۳۰٪ زئین بود که منجر به تولید نانوالیاف دارای قطر ۵۰۰ nm و عاری از مهره شد. هم‌چنین این محققین نشان دادند که استفاده از هگزامتیلن دیازوسیانات موجب افزایش چشم‌گیر استحکام نانوالیاف زئین می‌گردد [۲۰]. هم‌چنین نئو و همکاران اسید گالیک را در غلظت‌های مختلف w/v ۲۰٪، ۱۰٪، ۵٪ درون نانوالیاف زئین بارگذاری نمودند. قطر نانوالیاف تولید شده بین ۳۲۷-۳۸۷ nm اندازه‌گیری

پلاتین با محلول بسیار رقیق شده از مخلوط اسید کرومیک تمیز شد و کاملاً با آب مقطر شسته شد و سپس با استفاده از قسمت اکسیژن شعله سوزانده شد. غلظت‌های مختلف از محلول‌های زئین و اسید استیک گلاسیال به مقدار ۲۵ ml نمونه تهیه شد. حلقه از لودر آویزان و حدود ۵ mm از سطح مایع پایین آمد. حلقه از سطح کشیده و کشش سطحی در دمای ۲۵ °C ثبت شد [۲۳].

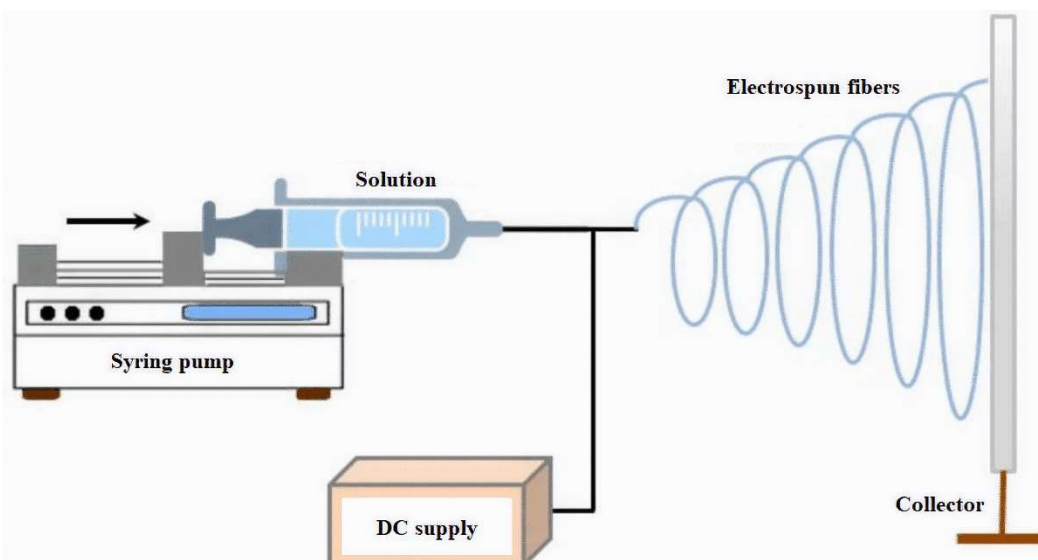
۴.۲. فرایند الکترورسی

در این پژوهش از دستگاه الکترورسی دو محوره مجهز به یک منبع تغذیه با ولتاژ بالا در دامنه ۰-۳۵ kV ساخت شرکت نانو ساختار آسیا، ایران استفاده شد. قطب مثبت منبع تغذیه دستگاه به یک سوزن فولادی ضدزنگ با شماره 18G و قطب منفی به صفحه جمع‌کننده متصل بود. محلول پلیمری درون یک سرنگ با حجم ۱۰ ml وارد و از طریق یک لوله باریک توسط یک پمپ دارای کنترل دیجیتالی به سوزن منتقل شد. الکترورسی محلول زئین حاوی لیکوپن با نرخ تغذیه ۰/۵ ml/h، فاصله نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده ۱۵۰ mm و اعمال ولتاژ ۲۵ kV انجام شد. الیاف بر روی صفحه جمع‌کننده به ابعاد ۵×۵ cm² تشکیل شدند [۱۹].

دامنه غلظتی مناسب برای تولید نانو الیاف زئین در مراحل بعدی الکترورسی بود. محلول حاصل به مدت ۲۴ h در دمای اتاق به منظور خروج حباب‌های هوا و ایجاد پیوندهای بین مولکولی نگهداری شد [۲۲]. برای تهیه مخلوط زئین و لیکوپن جهت انجام فرایند الکترورسی پوشانی، مقدار مشخصی از پودر لیکوپن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۷۵ w/w به محلول پلیمری زئین با غلظت ۰/۳۰ w/v اضافه شد. این غلظت از زئین به این دلیل انتخاب گردید که نتایج حاصل از پیش تیمارها نشان داد نمونه مطلوب الیاف با مورفولوژی یکنواخت، همگن و عاری از مهره و دارای کم‌ترین میزان قطر می‌باشد.

۳.۲. بررسی خصوصیات محلول

جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته محلول‌های پلیمری در غلظت‌های متفاوت از ویسکومتر چرخشی بروکفیلد مدل DVIII Ultra ساخت کشور انگلستان استفاده شد. اندازه‌گیری در دمای ۲۵ °C و با اسپیندل مدل SC4-31 در محدوده برشی ۱-۸۰ s⁻¹ انجام گرفت [۱۷]. همچنین جهت اندازه‌گیری کشش سطحی محلول‌های پلیمری طبق روش حلقه با استفاده از دستگاه کشش‌سنج Kruss K20 ساخت کشور آلمان صورت گرفت. دقت اندازه‌گیری در ۱/۰ ± mNm⁻¹ بود. قبل از اندازه‌گیری، حلقه



شکل (۱) تصویری شماتیک از فرایند الکترورسی

Fig. 1. Schematic diagram of electrospinning process

$$(۱) \quad \text{میزان لیکوپن اندازه گیری شده} \times 100 = \frac{\text{میزان کل لیکوپن}}{\text{راندمان ریزپوشانی}} \%$$

۸.۲. بررسی رهایش و زیست‌دسترسی لیکوپن در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

۱.۸.۲. تهیه محلول‌های موردنیاز

جهت تهیه محلول شبیه‌سازی شده بزاق (SSF)، از ۰/۵۱۲ g/L سدیم کلرید، ۳/۸۵۶ g/L پتاسیم کلرید، ۲/۶۰۸ g/L دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/۸ g/L اوره، ۲/۵۱۲ g/L بی‌کربنات سدیم و ۰/۶ g/L آنزیم آلفا آمیلاز طبق روش ون‌روث و روزن استفاده شد. ترکیبات فوق با استفاده از آب دیونیزه به حجم رسانیده و pH محلول حاصله بر روی ۶/۸ تنظیم گردید [۲۹].

برای تهیه محلول شبیه‌سازی شده معده (SGF)، ۲g کلرورسدیم و ۷ ml اسیدکلریدریک ۳۷٪ با استفاده از آب دیونیزه به حجم ۱ L رسانده شد، سپس به میزان ۳/۲ mg/ml پپسین به محلول اضافه و pH محلول در ۲/۵ تنظیم شد [۳۰].

محلول شبیه‌سازی شده روده (SIF) با استفاده از مخلوط کردن محلول‌های ۰/۲۵M کلرور کلسیم (CaCl₂) و ۳/۷۵M سدیم کلرید (NaCl) تهیه و pH بر روی ۷ تنظیم گردید [۳۰]. نمک‌های صفراوی با غلظت ۴۶/۸۷ mg/ml و محلول لیپاز با غلظت ۲۴mg/ml و محلول پانکراس با غلظت ۱۶/۲۵mg/ml تهیه و pH آن‌ها بر روی ۷ تنظیم شد [۳۱، ۳۲].

۲.۸.۲. نحوه اعمال شرایط شبیه‌سازی شده هضم دستگاه گوارش

شبیه‌سازی شرایط گوارش در سه فاز دهانی، معده‌ای و روده‌ای برای هضم نمونه‌های الیاف زئین حاوی لیکوپن مورداستفاده قرار گرفت. قبل از انجام آزمایش تمام محلول‌های تهیه‌شده به دمای ۳۷ °C رسانده شدند.

فاز دهان: ۰/۲۵g از الیاف حاوی لیکوپن با ۲۰ ml از محلول شبیه‌سازی شده بزاق (SSF) ترکیب‌شده، pH به ۶/۸ رسانده شد و در نهایت برای شبیه‌سازی شرایط دهان به مدت ۱۰ min در حمام آب مجهز به سیستم تکان‌دهنده Memmert Waterbath WNB 14 ساخت کشور آلمان تحت شرایط دمایی ۳۷ °C و سرعت برشی ۱۰۰rpm قرار داده شد [۳۰]. جهت اندازه‌گیری میزان رهایش در فاصله زمانی ۲min نمونه‌برداری به میزان ۱ ml صورت گرفت.

فاز معده: ۲۰ ml از مخلوط حاصل از فاز دهانی به همراه الیاف

۵.۲. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی الیاف الکترونیسی شده پس از پوشش دهی با طلا در خلأ، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی Hitachi S-4100 ساخت کشور ژاپن در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۲۵۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. تمام بررسی‌ها در ولتاژ ۲۰ kV انجام گرفت. میانگین قطر الیاف، با استفاده از نرم‌افزار Image J. V1.48 از روی تصاویر به‌دست آمده با اندازه‌گیری ۱۰۰ عدد لیف به صورت تصادفی از هر تصویر، تعیین شد [۲۴-۲۶].

۶.۲. طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR)

به‌منظور بررسی تغییرات شیمیایی و برهم‌کنش‌های احتمالی بین الیاف زئین و لیکوپن طی تولید، از طیف‌سنجی انتقال فوریه مادون قرمز Avatar 370 FT-IR, Thermo Nicolet ساخت کشور آمریکا استفاده شد. این آزمون به روش قرص بروماید پتاسیم در دمای ۲۵ °C و در دامنه فرکانسی ۴۰۰-۴۰۰۰ cm⁻¹ انجام شد. علت استفاده از بروماید پتاسیم نیز به عدم جذب آن در ناحیه مادون قرمز مربوط می‌شود [۲۷].

۷.۲. تعیین راندمان ریزپوشانی لیکوپن (EE%)

راندمان بارگذاری از طریق اندازه‌گیری میزان لیکوپن آزاد میکروالیاف تعیین شد. اندازه‌گیری میزان لیکوپن، به روش لیو و وو با کمی اصلاحات صورت گرفت [۲۸]. بدین منظور ۰/۲۵g از الیاف زئین حاوی لیکوپن با ۱۰ ml هگزان، حاوی ۰/۰۵٪ BHT به‌عنوان حلال لیکوپن به مدت ۲ min مخلوط شد. پس‌از آن، مخلوط حاصل با استفاده از سانتریفیوژ ERMLE, Z36H ساخت کشور آلمان با سرعت ۱۶۹۰ rpm به مدت ۵ min دو فاز گردید. فاز رویی (حاوی لیکوپن در هگزان) جداسازی و میزان لیکوپن موجود در آن به روش اسپکتروسکوپی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر WPA, S2000 UV/Vis ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری شد. طول موج انتخابی برای قرائت جذب لیکوپن در هگزان ۴۷۲nm بود، به این دلیل که بزرگ‌ترین پیک جذب لیکوپن در هگزان در این طول موج می‌باشد. از هگزان به‌عنوان جذب شاهد استفاده شد. مقدار لیکوپن با استفاده از منحنی کالیبراسیون لیکوپن محاسبه گردید. سپس راندمان ریزپوشانی طبق رابطه (۱) به دست آمد.

(۱cm) و gsample، وزن نمونه (g) می‌باشد [۳۱].
در این آزمون، از یک نمونه تولیدی (به صورت پیوسته) به ترتیب برای آزمون رهائش در فازهای سه‌گانه دستگاه گوارش استفاده گردید تا شبیه‌سازی دقیقاً مطابق دستگاه گوارش صورت گیرد. لازم به ذکر است که کلیه آزمون‌ها در دو تکرار صورت پذیرفت.

۴.۸.۲. اندازه‌گیری میزان زیست‌دسترسی لیکوپن

برای اندازه‌گیری میزان زیست‌دسترسی طبق روش ژانگ و همکاران، مخلوط حاصل از اتمام فاز روده سانتریفوژ (۴۸۱۸ rpm) به مدت (۴۰min) و لایه بالایی (میسل) که لیکوپن در آن حل شده بود، جمع‌آوری گردید. غلظت لیکوپن موجود در لیاف زئین و میسل حاصل از فاز روده با استفاده از روش استخراج سانتریفوژی تعیین گردید [۳۰]. به این صورت که ۰/۲۵ g از میسل و لیاف زئین حاوی لیکوپن به ۱۰ ml هگزان حاوی ۰/۰۵٪ BHT در لوله آزمایش ۱۵ ml اضافه شد. لوله آزمایش دو بار به مدت ۱۰ S و رتکس و بعد از آن سانتریفوژ (۱۶۹۰ rpm) به مدت ۱۵ min) گردید. ۲ ml آب دیونیزه اضافه و ۵ min در دمای ۲۵ °C نگاه‌داری شد تا جدا شدن فاز رخ دهد. سپس لایه بالایی جمع‌آوری و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۲ nm قرائت گردید. از هگزان به‌عنوان جذب شاهد استفاده شد. غلظت لیکوپن در هر نمونه با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید [۳۱]. زیست‌دسترسی لیکوپن با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$(۳) \quad \text{زیست‌دسترسی} = \frac{\text{غلظت لیکوپن در میسل}}{\text{غلظت لیکوپن در لیاف زئین}} \times 100$$

۸.۳. طرح آماری

برای انجام آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات به‌دست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (حداقل سه تکرار برای هر آزمایش)، پس از آنالیز واریانس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح (P<0.05) استفاده گردید. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS. V22 صورت گرفت.

با ۲۰ ml محلول شبیه‌سازی‌شده معده (SGF) ترکیب و pH به ۲/۵ رسانده شد. مخلوط به مدت ۲h در حمام آب مجهز به سیستم تکان‌دهنده تحت شرایط دمایی ۳۷ °C و سرعت برشی ۱۰۰ rpm قرار گرفت [۳۰]. هم‌چنین جهت تعیین میزان رهائش در معده در فواصل زمانی گوناگون ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۲۰ min، ۲ نمونه‌گیری به مقدار ۱ ml انجام پذیرفت.

فاز روده: ۳۰ ml از مخلوط فاز معده به همراه لیاف به بشر شیشه‌ای ۱۰۰ ml انتقال و در حمام آب با دمای ۳۷ °C مجهز به سیستم تکان‌دهنده قرار داده شد. pH مخلوط به ۷ رسانده و ۱/۵ ml از محلول شبیه‌سازی‌شده روده (SIF) به آن اضافه گردید. در ادامه، ۳/۵ ml محلول نمک‌های صفراوی اضافه شد. pH مخلوط به ۷ برگردانده، ۲/۵ ml محلول لیپاز و ۳ ml محلول پانکراس اضافه گردید و به مدت ۲h در حمام آب مجهز به سیستم تکان‌دهنده تحت شرایط دمایی ۳۷ °C و سرعت برشی ۱۰۰ rpm نگاه‌داری شد [۳۰، ۳۲]. هم‌چنین جهت تعیین میزان رهائش در روده همانند معده نمونه‌گیری انجام پذیرفت. در این مدت با استفاده از محلول سود ۰/۱N و محلول اسیدکلریدریک ۰/۱ N، pH مخلوط تنظیم می‌گردید.

۳.۸.۲. اندازه‌گیری میزان لیکوپن

به‌منظور تعیین میزان لیکوپن به نمونه برداشته‌شده از محلول فازهای سه‌گانه دستگاه گوارش، جهت قرائت جذب، مقدار ۱۰ ml هگزان، حاوی ۰/۰۵٪ BHT، به‌عنوان حلال لیکوپن افزوده و طی ۲ min مخلوط گردید. پس از آن، مخلوط حاصل با سرعت ۱۶۹۰ rpm و به مدت ۵ min سانتریفوژ و سپس به مدت ۵ min در دمای ۲۵ °C قرار گرفت تا کاملاً دو فاز شود [۳۳]. میزان جذب لایه‌ی بالایی در طول موج ۴۷۲ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و از هگزان به‌عنوان جذب شاهد استفاده شد. محتوای لیکوپن با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$(۲) \quad \text{مقدار لیکوپن} \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{\text{Abs}_{472} \times M_w \times \text{Volhexane} \times 100}{\epsilon \times L \times g_{\text{sample}}}$$

در رابطه فوق Abs₄₇₂ مقدار جذب قرائت‌شده لایه بالایی در طول موج ۴۷۲ nm؛ M_w وزن مولکولی لیکوپن (۵۳۶/۹ g/mol)؛ Volhexane حجم هگزان مصرفی (ml)؛ ε، ضریب خاموشی لیکوپن در هگزان (۱۰^۴ (M/cm)⁻¹)؛ L، طول کووت

۳. نتایج و بحث

۱.۳. بررسی خصوصیات مورفولوژی و قطر الیاف

با افزایش غلظت زئین ویسکوزیته از $38/530$ به $705/280$ mPa.s افزایش یافت (جدول ۱) و فرایند از حالت پاشش الکتریکی به الکترورسی تبدیل شد که در شکل (۲) قابل مشاهده می‌باشد. این نتایج با مطالعات انجام شده توسط دیگر محققین مطابقت دارد [۲۰، ۲۲، ۳۴]. در ویسکوزیته های کم همانند غلظت‌های $15-20$ w/v به‌طور معمول الیاف قرار گرفته بر روی صفحه جمع‌کننده، دارای مهره هستند اما متناسب با افزایش ویسکوزیته شکل مهره‌ها تغییر می‌کند به طوری که از حالت کروی شکل به دوکی شکل تبدیل شده و در نهایت به شکل الیاف یکنواخت درمی‌آیند [۲۰، ۳۵]. در ویسکوزیته کم، مقدار مولکول‌های آزاد حلال بیش‌تر بوده و میزان درهم‌آمیختگی زنجیره‌ها کم‌تر است، بنابراین در نهایت مهره‌ها و الیاف دارای مهره تشکیل می‌شوند. ویسکوزیته‌های بالاتر نظیر غلظت‌های $30-35$ w/v موجب می‌شود که میزان درهم‌آمیختگی زنجیره‌های پلیمری در محلول و برهمکنش میان مولکول‌های پلیمر و حلال بیش‌تر گردد. در این حالت، زمانی که محلول تحت تأثیر بارهای الکتریکی کشیده می‌شود، مولکول‌های حلال تمایل به پخش شدن در میان مولکول‌های درهم‌رفته پلیمر را دارند، در نتیجه گرایش مولکول‌های حلال به گرد هم آمدن کاهش یافته و الیاف پیوسته و یکنواخت تشکیل خواهد شد [۱۸، ۳۵]. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت پلیمر، قطر الیاف از 249 به 1231 nm افزایش یافته است، این

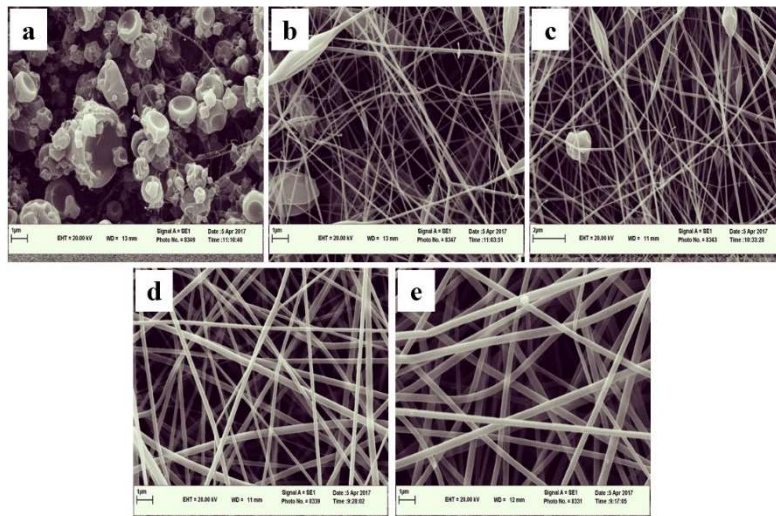
نتایج توسط سایر محققین نیز گزارش گردیده است [۲۰، ۲۴، ۲۵]. علت افزایش قطر الیاف، افزایش ویسکوزیته تحت تأثیر غلظت بالای پلیمر و در نتیجه مقاومت بالاتر جت تشکیل شده در برابر باریک شدن می‌باشد [۲۴، ۳۷-۳۵].

شروع الکترورسی به محلول باردار شده‌ای نیاز دارد تا بتواند بر کشش سطحی آن غلبه کند. با توجه به جدول (۱)، کشش سطحی محلول زئین با افزایش غلظت پلیمر از $27/236$ به $28/314$ mN/m افزایش یافته است. زمانی که جریان به سمت صفحه جمع‌کننده حرکت می‌کند، کشش سطحی ممکن است باعث تشکیل مهره‌ها در طول جت شود. در یک جت محلول، وقتی غلظت مولکول‌های آزاد حلال زیاد باشد (ویسکوزیته کم)، مولکول‌های محلول بیش‌تر تمایل دارند تا دورهم جمع شوند و یک شکل کروی (در اثر کشش سطحی) را به وجود آورند. در گرانیوی بالا که اثر متقابل بیش‌تری بین مولکول‌های حلال و زنجیره‌های پلیمری وجود دارد، کشش سطحی مولکول‌های حلال کاهش یافته و در نتیجه تمایل مولکول‌های حلال برای اینکه تحت تأثیر کشش سطحی تجمع پیدا کنند کاهش می‌یابد. همین امر منجر به تولید الیافی بدون مهره خواهد شد [۲۰، ۳۸]. در پایان می‌توان گفت از بین غلظت‌های مختلف، محلول زئین با غلظت 30 درصد وزنی/حجمی به‌عنوان غلظت بهینه می‌باشد زیرا الیاف حاصل از آن، از لحاظ مورفولوژی به‌صورت صاف، یکنواخت، همگن و عاری از مهره بوده و هم‌چنین دارای کم‌ترین میزان قطر می‌باشد. به‌همین سبب از این غلظت جهت ادامه کار و انجام فرایند ریزپوشانی استفاده گردید.

جدول (۱) ویسکوزیته، کشش سطحی و میانگین قطر الیاف الکترورسی شده زئین در غلظت‌های مختلف زئین و تحت شرایط الکترورسی: ولتاژ 20 kV، نرخ تغذیه 0.5 ml/hr و 150 mm فاصله بین نوک سوزن و صفحه جمع‌کننده.

Table 1. Viscosity, surface tension and mean fiber diameter of electrospun zein polymer at different concentrations, the operating voltage was 20 kV, flow rate 0.5 ml/hr and tip-to-collector distance 150 mm.

کشش سطحی Surface Tension (mN/m)	ویسکوزیته ظاهری Apparent Viscosity (mPa.s)	قطر الیاف Fiber Diameter (nm)	غلظت پلیمر Polymer Concentration (%w/v)	پلیمر Polymer
27.236±0.0072	38.530±14.73	عدم تشکیل الیاف No Fiber Formation	15	زئین Zein
27.447±0.0095	88.746±13.87	249±87	20	زئین Zein
27.802±0.0108	185.072±15.43	395±94	25	زئین Zein
28.153±0.0098	347.733±17.33	673±133	30	زئین Zein
28.314±0.0045	705.280±18.53	1231±287	35	زئین Zein



شکل (۲) تصاویر SEM در بزرگنمایی ۲۵۰۰۰ از الیاف زئین تحت شرایط ولتاژ ۲۰ kV، نرخ تغذیه ۰/۵ ml/hr و فاصله نوک سوزن تا صفحه جمع‌کننده

۱۵۰mm در غلظت‌های مختلف: (a) ۱۵w/v، (b) ۲۰w/v، (c) ۲۵w/v، (d) ۳۰w/v، (e) ۳۵w/v.

Fig. 2. Selected SEM images (Mag.2500X) of Zein fibres produced at different concentrations of a) 15%w/v, b) 20%w/v, c) 25%w/v, d) 30%w/v, e) 35%w/v, the operating voltage was 20 kV, flow rate 0.5 ml/hr and tip-to-collector distance 150 mm

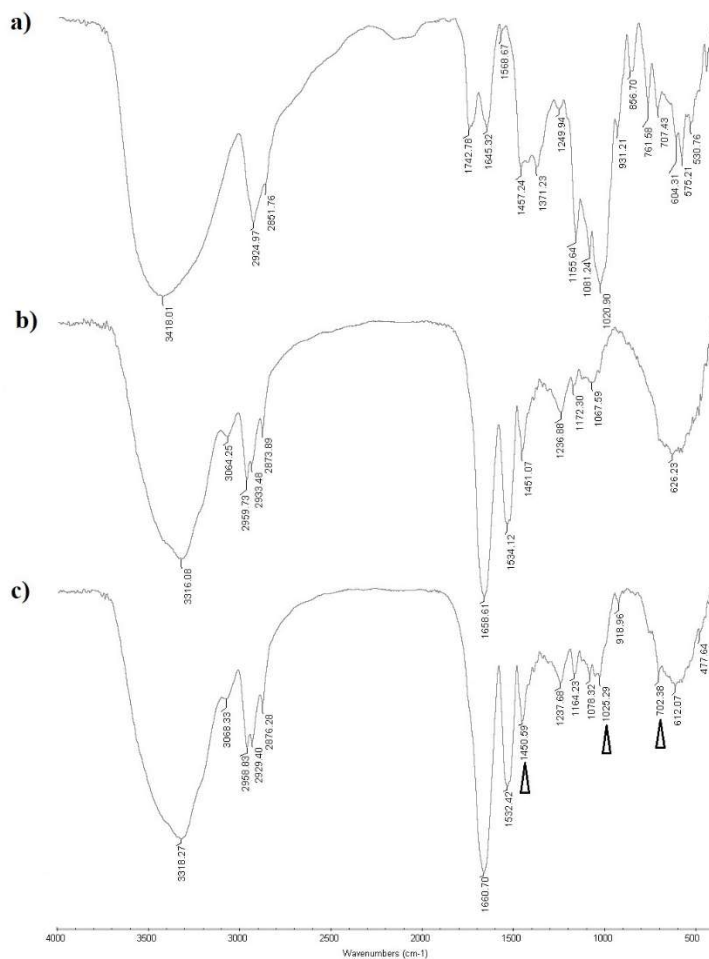
۱۵۶۸ cm^{-1} ، ارتعاش کششی C-C در 1020cm^{-1} [۴۰] و خمشی CH_2 در 707cm^{-1} [۲۷] از پیک‌های شاخص لیکوپن می‌باشد. هم‌چنین در شکل (۳c) نمودار مربوط به الیاف زئین حاوی لیکوپن می‌باشد که برای هر دو نمونه الیاف زئین حاوی ۰/۰۵ w/w لیکوپن و الیاف زئین حاوی ۰/۰۷۵ w/w لیکوپن تقریباً یکسان بوده است. پیک‌های 702cm^{-1} (خمشی CH_2)، 1025cm^{-1} (کششی C-C) و 1450cm^{-1} (خمشی CH_2) مربوط به لیکوپن بوده و هم‌چنین سایر پیک‌های موجود مربوط به پیک‌های شاخص زئین می‌باشد که حاکی از وجود لیکوپن در الیاف زئین می‌باشد. در پایان با توجه به تجزیه و تحلیل نمودارهای FTIR می‌توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی با استفاده از الیاف زئین به صورت فیزیکی بوده است.

۳.۳. راندمان ریزپوشانی لیکوپن

راندمان ریزپوشانی لیکوپن در الیاف زئین حاوی غلظت‌های اولیه متفاوت لیکوپن در شکل (۴) مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد با افزایش غلظت لیکوپن از ۰/۰۵ به ۰/۰۷۵ w/w، راندمان ریزپوشانی از ۸۵/۶۸ به ۸۸/۰۷٪ به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافته است. در نمونه با مقدار ولتاژ ثابت با افزایش غلظت لیکوپن در محلول اولیه، راندمان ریزپوشانی افزایش یافته به این علت که در ولتاژ ثابت مقدار محلول کشیده شده در

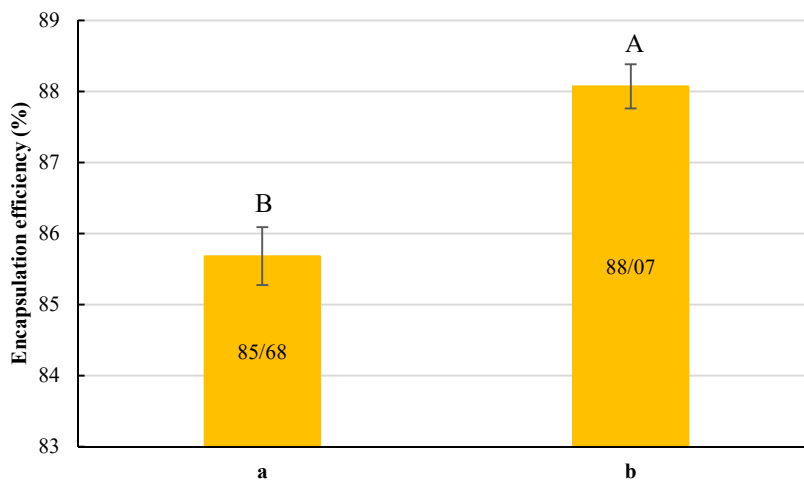
۲.۳. طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR)

در تحقیق حاضر برای اثبات برهم‌کنش مناسب میان لیکوپن و زئین از FTIR استفاده شد. در شکل (۳) نتایج به‌دست آمده از طیف FTIR برای لیکوپن، زئین و الیاف زئین حاوی لیکوپن را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۳b) مشاهده می‌کنید، پیک‌های شاخص زئین به ترتیب از فرکانس زیاد به سمت کم به‌صورت پیک پهن در 3316cm^{-1} مربوط به نوارهای کششی پیوند N-H، نوارهای جذبی کششی C-H آلیفاتیک در محدوده 3064 ، 2959 ، 2933 و 2873cm^{-1} ، نوارهای جذبی کششی کربونیل آمیدی (پیک آمید ۱) در 1658cm^{-1} و نوار جذبی کششی (پیک آمید ۲) در 1534cm^{-1} ظاهر شد. پیک آمید ۱ مربوط به نوارهای ارتعاشی کششی گروه کربونیل (C=O) است و پیک آمید ۲ مربوط به ارتعاشات خمشی جفت شده با ارتعاشات کششی C-N زنجیره پپتیدی می‌باشد که گاهی اوقات نیز خود را به‌صورت یک شانه در کنار آن نشان می‌دهد [۱۸، ۲۶]. در شکل (۳a) نیز نمودار مربوط به لیکوپن را ملاحظه می‌کنید که در آن پیک‌های 2924 و 2851cm^{-1} به ترتیب برای ارتعاشات کششی متقارن و غیر متقارن CH_2 و CH_3 می‌باشد و هم‌چنین ارتعاشات خمشی CH_2 در 1457cm^{-1} و CH_3 در 1371cm^{-1} [۳۹]، $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}$ در 575cm^{-1} خمشی CH ترانس و خارج صفحه‌ای (OOP) در 931cm^{-1} ، باند کششی C=C در 1645cm^{-1} و



شکل (۳) نمودار طیف FTIR نمونه‌های مختلف: (a) لیکوپن (b) زئین (c) الیاف زئین حاوی لیکوپن

Fig. 3. FTIR spectra of a) Lycopene, b) Zein, c) Electrospun Zein/Lycopene fibres



شکل (۴) نمودار راندمان بارگذاری لیکوپن در نمونه‌های مختلف: (a) الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت ۳۰w/v حاوی ۰/۰۵ w/w لیکوپن

(b) الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت ۳۰ w/v حاوی ۰/۰۷۵ w/w لیکوپن.

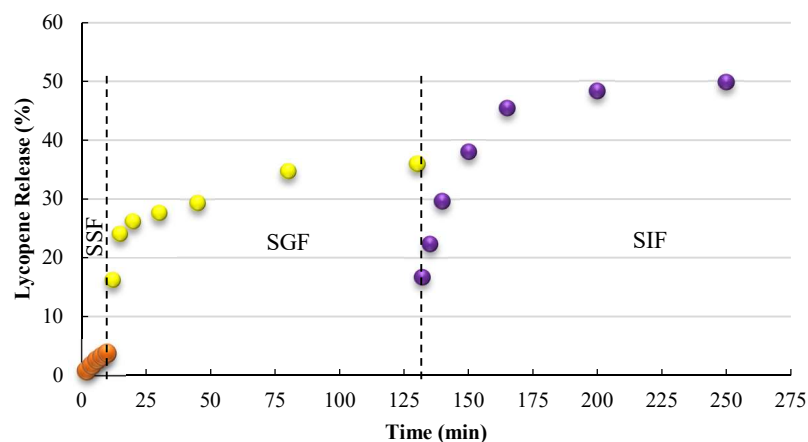
Fig. 4. Loading efficiency of Lycopene at different samples: a) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.05% w/w Lycopene, b) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.075% w/w Lycopene

۴.۳. رهائش لیکوپن در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه

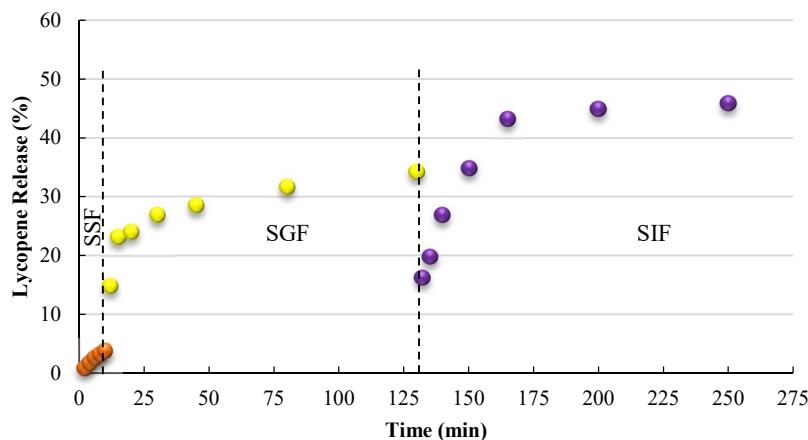
گوارش

شکل (۵) پروفایل رهائش از دو نمونه الیاف زئین حاوی لیکوپن را در سه فاز دستگاه گوارش دهان، معده و روده کوچک را نشان می‌دهد. محور افقی نمودار نشان دهنده زمان گوارش در فازهای سه‌گانه می‌باشد. برای نشان دادن پروفایل رهائش در دستگاه گوارش از نمودارهای مجزا استفاده نشده و پروفایل رهائش آن‌ها در یک نمودار، در بازه زمانی مربوط به هر یک از فازها نشان داده شده است (شکل ۵). این امر موجب شده در مرز فازهای معده و روده، مقدار رهائش در زمان شروع فاز روده‌ای کم‌تر از مقدار

نوک سوزن یکسان بوده از این رو محلول با غلظت لیکوپن بیش‌تر باعث افزایش راندمان ریزپوشانی می‌شود [۲،۴۱]. پرز ماسیا و همکاران، لیکوپن را در غلظت‌های مختلف در نانو ذرات دکستران ریزپوشانی نمودند و حداکثر راندمان ریزپوشانی معادل با ۵۷/۵٪ به‌دست آوردند. همچنین آن‌ها لیکوپن را در نانو ذرات ایزوله پروتئین آب پنیر ریزپوشانی کردند که حداکثر راندمان ریزپوشانی برابر ۷۵/۲٪ به‌دست آمد [۴۲]. بنابراین طبق نتایج حاصل می‌توان نتیجه گرفت که این سامانه می‌تواند به‌عنوان یک روش نوین جهت ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال با کارایی بالا مورد استفاده قرار گیرد.



(a)



(b)

شکل (۵) پروفایل رهائش لیکوپن در سه فاز دستگاه گوارش (فاز دهان (SSF)، فاز معده (SGF) و فاز روده (SIF)) در نمونه‌های مختلف: (a) الیاف حاصل از

محلول زئین با غلظت ۳۰ w/v حاوی ۰/۰۵٪ لیکوپن (b) الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت ۳۰ w/v حاوی ۰/۰۷۵٪ لیکوپن

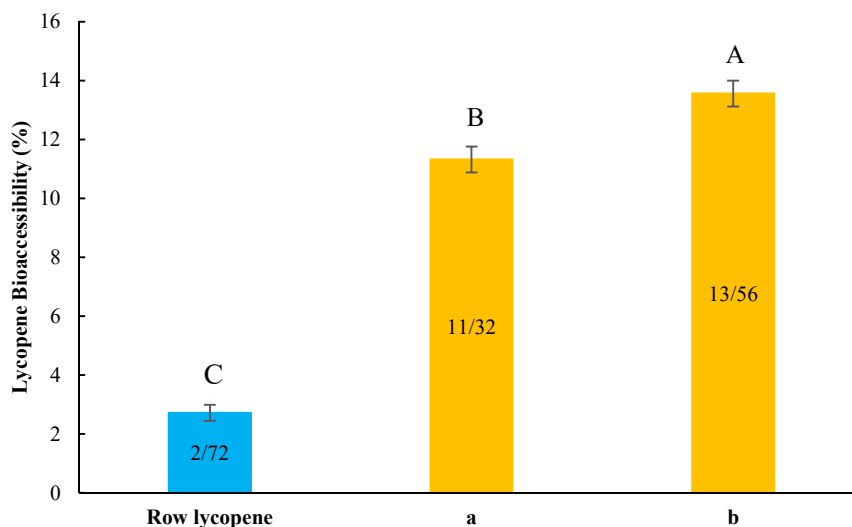
Fig. 5. Lycopene release profile of different samples in three phases of gastrointestinal tract (GI tract) : Mouth (SSF), Stomach (SGF) and Small intestine (SIF): (a) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.05% w/w Lycopene (b) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.075% w/w Lycopene

می‌یابد که ممکن است به دلیل گسترش و در معرض قرار گرفتن گروه‌های هیدروفیل از قسمت‌های داخلی پروتئین‌ها باشد [۴۵]. این امر سبب شده تا بیش‌ترین رهایش لیکوپن در فاز روده دیده شود و از آن جایی که محل جذب لیکوپن در روده کوچک است [۴۷] می‌توان گفت هدف از این پژوهش برآورده شده است.

۵.۳. زیست‌دسترسی لیکوپن در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش

زیست‌دسترسی کلی ترکیبات زیست‌فعال چربی‌دوست به پارامترهای مختلفی نظیر رهایش، جذب، پخش، متابولیسم و فرایندهای دفع بستگی دارد [۴۷]. در این بین رهایش و جذب، جزء پارامترهای حیاتی و اصلی می‌باشند. با توجه به شکل‌های ۵ و ۶، هرچه میزان رهایش روده کوچک بیش‌تر بوده، مقدار زیست‌دسترسی لیکوپن نیز افزایش پیدا کرده است. به طوری که مقدار زیست‌دسترسی برای نمونه الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت 0.30 w/v حاوی 0.075 w/w لیکوپن برابر با $0.13/56$ و برای نمونه الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت 0.30 w/v حاوی 0.05 w/w لیکوپن معادل $0.11/32$ می‌باشد. طبق نتایج به دست آمده، زیست‌دسترسی دو نمونه نسبت به لیکوپن خام دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($p < 0.05$). مقادیر زیست‌دسترسی برای لیکوپن در این بررسی در مقایسه با دیگر پژوهش‌های صورت گرفته توسط سالویا-تروچیلو و همکاران و آنسی و همکاران که از حامل‌های لیپیدی جهت ریزپوشانی لیکوپن استفاده کرده‌اند، بیش‌تر بوده است [۳۰، ۴۸]. در این رابطه می‌توان چنین عنوان کرد که مدت زمان هضم در معده برای مواد غذایی با محتوای لیپیدی، بیش‌تر از مواد غذایی با محتوای پروتئینی است [۴۹]؛ بنابراین هنگامی که از حامل‌های لیپیدی استفاده می‌شود میزان آسیب وارده به لیکوپن و هم‌چنین رهایش آن نسبت به زمانی که از حامل‌های پروتئینی استفاده می‌شود، طی هضم در معده بیش‌تر است. جذب لیکوپن در روده کوچک به دو روش ممکن است صورت گیرد؛ در فاز روده هنگامی که لیکوپن از الیاف زئین آزاد شده در مخلوط میسل‌های درون مایع روده‌ای (قبل از این که در دسترس جذب قرار گیرند) حل می‌شود. مخلوط میسل‌ها توسط نمک‌های صفراوی و لیپو-پروتئین‌های ترشح شده از بدن جمع‌آوری می‌شوند و در ادامه، مخلوط میسل‌ها قادرند لیکوپن حل شده را از طریق لایه مخاطی

رهایش در زمان پایان فاز معده باشد. به عبارت دیگر، فرایند رهایش در هر مرحله به صورت مجزا از مرحله دیگر بوده (به دلیل بررسی از نوع رهایش لحظه‌ای) و به همین دلیل، مقدار رهایش مشاهده شده بر روی نمودار در فاز روده، کم‌تر از مقدار محاسبه شده در انتهای فاز معده می‌باشد. مکانیسم عمده آزادسازی طی فرایند رهایش از الیاف زئین، مکانیسم نشت ماده ریزپوشانی شده (لیکوپن) از میان حفرات و منافذ الیاف زئین می‌باشد [۲۴، ۴۳]. از آن جا که رهایش سریع اولیه (که تحت عنوان رهایش انفجاری شناخته می‌شود) به ویژگی‌های سطح و پوسته لایه‌ها بستگی دارد، استفاده از الیاف زئین باعث کاهش سرعت انتشار لیکوپن شده است. همان‌طور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود به دلیل یکسان بودن شرایط فرایند الکترورسی الیاف زئین برای دو نمونه، مکانیسم رهایش برای دو نمونه یکسان بوده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود برای هر دو نمونه الیاف زئین حاوی 0.05 w/w لیکوپن و الیاف زئین حاوی 0.075 w/w لیکوپن، میزان رهایش در دهان بسیار کم بوده است. دلیل این امر، مقاومت ساختار پروتئینی الیاف زئین در برابر تغییرات یونی و آنزیم آلفا-آمیلاز فاز دهان و از سوی دیگر، مدت‌زمان کوتاه حضور الیاف زئین در فاز دهان می‌باشد. هم‌چنین در فاز معده pH و آنزیم پپسین موجود در شیره معده از عوامل مهم در رهایش لیکوپن از الیاف زئین است؛ به طوری که پروتئین‌ها تحت شرایط اسیدی و هم‌زمان هیدرولیز آنزیمی، تجزیه شده و بنابراین برخی از مناطق هیدروفوب تحت اثر آنزیم پپسین، باعث تشکیل نقاط هیدروفیل می‌شوند [۴۴]. علت این پدیده هم تخریب زیر-مجموعه‌های گلیسینین نظیر آلفا-گلیسینین و بتا-گلیسینین توسط آنزیم پپسین می‌باشد که با گذشت زمان مقدار این تخریب نیز بیش‌تر شده [۴۵] و در نتیجه باعث حل شدن زئین در شیره معده و کاهش مقاومت ساختار می‌گردد. نتایج رهایش لیکوپن از الیاف زئین در شکل (۵) نیز گویای این پدیده می‌باشد. در فاز نهایی (فاز روده کوچک) در طی زمان میزان حلالیت الیاف زئین هیدرولیز شده، افزایش می‌یابد که این پدیده ناشی از تجزیه گلیسینین توسط آنزیم پپسین در فاز قبلی و آزاد شدن پپتیدها با وزن مولکولی پایین است. در نتیجه، این عمل باعث ایجاد نقاط هیدروفیل در سطح پروتئین شده که منجر به انعطاف‌پذیری و بهبود حلالیت ساختار می‌گردد [۴۶]. از سوی دیگر، در pH های بالاتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها میزان حلالیت آن‌ها افزایش



شکل (۶) نمودار زیست‌دسترسی لیکوپن در نمونه‌های مختلف (a) الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت ۳۰ w/v حاوی ۰/۰۵ w/v لیکوپن (b) الیاف حاصل از محلول زئین با غلظت ۳۰ w/v حاوی ۰/۰۷۵ w/v لیکوپن

Fig. 6. Bioaccessibility graph of Lycopene at different samples: a) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.05% w/w Lycopene, b) Zein fibres at a polymer concentration of 30%w/v contain 0.075% w/w Lycopene

۴. نتیجه‌گیری

الیاف الکترورسی شده زئین به‌عنوان روشی نوین جهت ایجاد رهایش کنترل‌شده و محافظت شده لیکوپن توسعه داده شد. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روشی (SEM) جهت بررسی تولید الیاف زئین به‌صورت یکنواخت و بدون مهره بکار رفت. نتایج حاصل از آزمون FTIR نشان داد که تمامی اجزای الیاف زئین حاوی لیکوپن در حین فرایند الکترورسی ساختار خود را حفظ کرده و دچار تغییرات شیمیایی نشده است. پروفایل رهایش حاصل از دو نمونه الیاف زئین حاوی لیکوپن، رفتار تقریباً یکسانی نشان داد زیرا لایه حفاظتی زئین برای هر دو نمونه یکی بوده و در نتیجه باعث رهایش کنترل شده گردیده است. استفاده از این روش باعث رهایش لیکوپن در نقطه اثر مد نظر (روده کوچک) گردیده که افزایش مقدار زیست‌دسترسی لیکوپن را به‌دنبال داشته است. الکترورسی‌پوشانی با استفاده از الیاف الکترورسی شده زئین پتانسیل بالایی برای به خدمت گرفتن به‌عنوان یک سیستم تحویل مناسب برای ترکیبات زیست‌فعال دارد. از این رو استفاده از این روش برای ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال و دارویی در صنعت غذا و دارو توصیه می‌شود.

و قسمت‌های اپیکال سلول‌های پوششی روده انتقال دهند [۴۷]. سپس لیکوپن می‌تواند از طریق مکانیسم انتقال فعال یا غیرفعال وارد سلول‌های پوششی شود [۵۰]. از آنجایی که به‌طور معمول فرایند انتقال لیکوپن از فاز روده به پلاسما توسط لیپوپروتئین‌ها صورت می‌گیرد [۵۱، ۵۲]؛ می‌توان گفت قسمت عمده از جذب لیکوپن بدین صورت انجام می‌گیرد. علاوه بر این، هنگامی که الیاف زئین وارد روده کوچک می‌شوند بخش بزرگی از هضم پروتئین‌ها در این مکان صورت می‌گیرد؛ در این قسمت شیره پانکراس که شامل آنزیم‌های کیموتریپسین و تریپسین است، پروتئین‌ها را به قسمت‌های کوچک‌تری تبدیل می‌کند [۴۹]. این عمل باعث می‌شود که مولکول‌های لیکوپن درون ذرات کلوئیدی حاصل از تجزیه پروتئین‌ها به دام افتاده و به صورت مستقیم توسط سلول‌های پوششی جذب شوند [۴۷]. به‌طور کل، استفاده از این روش ریزپوشانی و هم‌چنین بیوپلیمر زئین که جزء ترکیبات مجاز در صنعت غذا می‌باشد، در مقایسه با سایر سامانه‌ها مقدار زیست‌دسترسی بالایی را برای لیکوپن از خود نشان داده است که این امر، بیانگر توانایی این سیستم در زمینه ریزپوشانی می‌باشد.

منابع

- 6(10), 3218–3227.
- [15] Kabak, B., Ozbey, F. (2012). Assessment of the bioaccessibility of aflatoxins from various food matrices using an in vitro digestion model, and the efficacy of probiotic bacteria in reducing bioaccessibility. *J Food Compos Anal.*, 27(1), 21–31.
- [16] Tiwari, S. K., & Venkatraman, S. S. (2012). Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Mater. Sci. Eng. C.*, 32(5), 1037–1042.
- [17] Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Ocio, M. J., Lagaron, J. M. (2010). Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrospayed zein prolamine. *J Food Sci.*, 75(6), 69–79.
- [18] Li, Y., Lim, L.T., Kakuda, Y. (2009). Electrospun Zein Fibers as Carriers to Stabilize (-)-Epigallocatechin Gallate. *J Food Sci.*, 74(3), C233–C240.
- [19] Miri, M. A., Movaffagh, J., Najafi, M. B. H., Najafi, M. N., Ghorani, B., Koocheki, A. (2016). Optimization of electrospinning process of zein using central composite design. *Fiber Polym.*, 17(5), 769–777.
- [20] Yao, C., Li, X., Song, T. (2007). Electrospinning and crosslinking of zein nanofiber mats. *J Appl Polym Sci.*, 103(1), 380–385.
- [21] Neo, Y. P., Ray, S., Jin, J., Gizdavic-Nikolaidis, M., Nieuwoudt, M. K., Liu, D., Quek, S. Y. (2013). Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein–gallic acid system. *Food Chem.*, 136(2), 1013–1021.
- [22] Selling, G. W., Biswas, A., Patel, A., Walls, D. J., Dunlap, C., Wei, Y. (2007). Impact of Solvent on Electrospinning of Zein and Analysis of Resulting Fibers. *Macromol Chem Phys.*, 208(9), 1002–1010.
- [23] Mehta, S. K., Bhawna, Bhasin, K. K., Kumar, A. (2009). Solubilization and conformational behavior of Zein in aqueous solution of dodecyltrimethylammonium bromide (DDAB). *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.*, 346(1), 195–201.
- [24] Neo, Y. P. (2014). Electrospinning as a Novel Encapsulation Method for Food Applications. *Ph.D. Thesis*, University of Auckland, New Zealand.
- [25] Torres-Giner, S., Gimenez, E., Lagaron, J. M. (2008). Characterization of the morphology and thermal properties of Zein Prolamine nanostructures obtained by electrospinning. *Food Hydrocoll.*, 22(4), 601–614.
- [26] Ghorani, B., Russell, S. J., Goswami, P. (2013). Controlled morphology and mechanical characterisation of electrospun cellulose acetate fibre webs. *Int J Polym Sci*, 1-12.
- [27] Pop, R. M., Buzoianu, A. D., Rati, I. V., Socaciu, C. (2014). Untargeted metabolomics for sea buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* ssp. *carpatica*) berries and leaves: Fourier transform infrared spectroscopy as a rapid approach for evaluation and discrimination. *Not Bot*
- [1] Noshad, M., Mohebbi, M., Koocheki, A., Shahidi, F. (2015). Microencapsulation of vanillin by spraydrying using soy protein isolate–maltodextrin as wall material. *Flavour Fragr. J.*, 30(5), 387–391.
- [2] Ghorani, B., Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocoll.*, 51, 227–240.
- [3] Manojlović, V., Nedović, V., Kailasapathy, K., Zuidam, N. (2011). Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. in: Zuidam, N., Nedović, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Springer., New York, pp 269–302.
- [4] Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.*, 1, 1806–1815.
- [5] López-Rubio, A., Sanchez, E., Wilkanowicz, S., Sanz, Y., Lagaron, J. M. (2012). Electrospinning as a useful technique for the encapsulation of living bifidobacteria in food hydrocolloids. *Food Hydrocoll.*, 28(1), 159–167.
- [6] López-Rubio, A., Lagaron, J. M. (2012). Whey protein capsules obtained through electrospaying for the encapsulation of bioactives. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, 13, 200–206.
- [7] Xu, X., Jiang, L., Zhou, Z., Wu, X., Wang, Y. (2012). Preparation and properties of electrospun soy protein isolate/polyethylene oxide nanofiber membranes. *ACS Appl Mater Interfaces.*, 4(8), 4331–4337.
- [8] Wongsasulak, S., Patapeejumrswong, M., Weiss, J., Supaphol, P., Yoovidhya, T. (2010). Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends. *J Food Eng.*, 98(3), 370–376.
- [9] Bürck, J., Heissler, S., Geckle, U., Ardakani, M. F., Schneider, R., Ulrich, A. S., Kazanci, M. (2013). Resemblance of electrospun collagen nanofibers to their native structure. *J Am Chem Soc Langmuir.*, 29(5), 1562–1572.
- [10] Songchotikunpan, P., Tattiyakul, J., Supaphol, P. (2008). Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *Int J Biol Macromol.*, 42(3), 247–255.
- [11] Brahatheeswaran, D., Mathew, A., Aswathy, R. G., Nagaoka, Y., Venugopal, K., Yoshida, Y., Sakthikumar, D. (2012). Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. *Biomed Mater.*, 7(4), 45001.
- [12] Nieuwland, M., Geerdink, P., Brier, P., Eijnden, P. Van Den, Henket, J. T. M. M., Langelaan, M. L. P., Martin, A. H. (2013). Food-grade electrospinning of proteins. *Innov Food Sci Emerg Technol.*, 20, 269–275.
- [13] Kun, Y., Lule, U. S., Xiao-Lin, D. (2006). Lycopene: Its properties and relationship to human health. *Food Rev Int.*, 22(4), 309–333.
- [14] Marze, S. (2015). Bioaccessibility of lipophilic micro-constituents from a lipid emulsion. *Food Funct.*,

- electrospinning of polyamide-6. *Eur Polym J.*, 44,3067-3079.
- [42] Pérez-Masiá, R., Lagaron, J. M., Lopez-Rubio, A. (2015). Morphology and Stability of Edible Lycopene-Containing Micro- and Nanocapsules Produced Through Electrospinning and Spray Drying. *Food Bioprocess Tech.*, 8(2), 459-470.
- [43] Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT - Food Sci Tech.*, 44(10), 1977-1985.
- [44] Molina, E., Papadopoulou, A., Ledward, D. A. (2001). Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocoll.*, 15(3), 263-269.
- [45] Cui, C., Zhao, M., Yuan, B., Zhang, Y., Ren, J. (2013). Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates. *J Food Sci.*, 78(12), 1871-1877.
- [46] Kong, X., Zhou, H., Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.*, 102(3), 759-763.
- [47] McClements, D. J., Xiao, H. (2014). Excipient foods: designing food matrices that improve the oral bioavailability of pharmaceuticals and nutraceuticals. *Food Funct.*, 5(7), 1320-1333.
- [48] Anese, M., Mirolo, G., Beraldo, P., Lippe, G. (2013). Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Chem.*, 136(2), 458-463.
- [49] Zimmerman, M., Snow, B. (2012). *An Introduction to Nutrition*. 1st ed., The Creative Commons, USA, pp 296-299.
- [50] Singh, H., Ye, A., Horne, D. (2009). Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res.*, 48(2), 92-100.
- [51] Krinsky, N I., Cornwell, D G. Oncley, J. L. (1958). The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Arch Biochem Biophys.*, 73(1), 233-246.
- [52] Parker, R. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.*, 10, 542-51.
- Hort Agrobot Cluj.*, 42(2), 545-550.
- [28] Liu, D., Liu, Z., Wang, L., Zhang, C., Zhang, N. (2011). Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids Surf. B.*, 85(2), 262-269.
- [29] Van Ruth, S. M., Roozen, J. P. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chem.*, 71, 339-345.
- [30] Zhang, R., Zhang, Z., Zou, L., Xiao, H., Zhang, G., Decker, E. A., McClements, D. J. (2016). Enhancement of carotenoid bioaccessibility from carrots using excipient emulsions: influence of particle size of digestible lipid droplets. *Food Funct.*, 7(1), 93-103.
- [31] Salvia-Trujillo, L., McClements, D. J. (2016). Enhancement of lycopene bioaccessibility from tomato juice using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size. *Food Chem.*, 210, 295-304.
- [32] Miekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124.
- [33] Fish, W. W., Perkins-Veazie, P., Collins, J. K. (2002). A Quantitative Assay for Lycopene That Utilizes Reduced Volumes of Organic Solvents. *J. Food Compos Anal.*, 15(3), 309-317.
- [34] Miyoshi, T., Toyohara, K., & Minematsu, H. (2005). Preparation of ultrafine fibrous zein membranes via electrospinning. *Polym Int.*, 54(8), 1187-1190.
- [35] Ramakrishna, S. (2005). *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, 1st ed., World Scientific, Singapore.
- [36] Nezarati, R. M., Eifert, M. B., Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng Part C Methods.*, 19(10), 810-819.
- [37] Mit-uppatham, C., Nithitanakul, M., Supaphol, P. (2004). Ultrathin electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol Chem Phys.*, 205(17), 2327-2338.
- [38] Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H., Koombhongse, S. (2000). Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J Appl Phys.*, 87(9), 4531-4547.
- [39] De Nardo, T., Shiroma-Kian, C., Halim, Y., Francis, D., Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Rapid and simultaneous determination of lycopene and β -carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *J Agr Food Chem.*, 57(4), 1105-1112.
- [40] Wilkerson, E. D., Anthon, G. E., Barrett, D. M., Sayajon, G. F. G., Santos, A. M., Rodriguez-saona, L. E. (2015). Rapid Assessment of Quality Parameters in Processing Tomatoes Using Hand-Held and Benchtop Infrared Spectrometers and Multivariate Analysis. *J Agric Food Chem.*, 61(9), 2088-95.
- [41] Heikkila, P., Harlin, A. (2008). Parameter study of

Research Article

**Electro-Encapsulation of Lycopene in Protein Microfiber Structure:
Physicochemical and Bioaccessibility Characteristics**

Esmael Charpashlo¹, Mohebbat Mohebbi^{2*}, Behrouz Ghorani³

1. M.Sc. student, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

Abstract

Lycopene is a carotenoid pigment with some special health attributes, which have attracted many researchers' attention as a valuable ingredient. The stability of many bioactive compounds is limited due to various physicochemical and physiological processes. For this purpose, the application of different encapsulation methods for controlled release and improved stability of bioactive compounds is of great importance. In this study, the effect of various solution concentrations (15, 20, 25, 30 and 35 %w/v) on the production of zein fibers was studied. The optimized concentration was then, applied for the encapsulation process of lycopene at two levels (0.05, 0.075 %w/w). The physical and chemical properties of lycopene-containing zein fibers and the profile of lycopene release in three phases of gastrointestinal (GI) tract (mouth, stomach and small intestine) were investigated. The results of scanning electron microscopy (SEM) showed that uniform, homogeneous and bead-free fibers were obtained at the optimum conditions. The lycopene loading efficiency was measured between 85.68-88.07%. The results of FTIR test indicate that the physical entrapment of lycopene in zein microfibers was successfully occurred. In addition, controlled and stable release of lycopene in the GI simulated system which shows its appropriate bioaccessibility was observed. Encapsulation using zein electrospun microfiber has the potential to serve as a targeted delivery system for lycopene. The use of this method is therefore, recommended for the encapsulation of lycopene in the food industry.

Keywords: Electro-Encapsulation, Electrospinning, Bioaccessibility, Zein, Lycopene.

* Corresponding author: m-mohebbi@um.ac.ir