تاثیر میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه (*Pistacia atlantica*) بر پایداری کره

مهسا نیکخواه[a]، ژاله خوشخو[b*]، سید ابراهیم حسینی[c]، پیمان مهستی شتربانی[c]، افشین آخوندزاده بستی[d]

[a] دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[d] استاد تمام گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۱/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۲۳
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1400.18.4.8.8

چکیده

مقدمه: پسته وحشی (بنه) به‌عنوان یکی از منابع گیاهی غنی از ترکیبات فنلی و توکوفرول، دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، درمانی و ضدمیکروبی قابل‌توجهی است. پوشش‌دهی به‌عنوان روش موثر برای بهبود پایداری و جلوگیری از طعم نامطلوب ترکیبات فنلی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد، بنابراین در این پژوهش تاثیر میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه، بر پایداری اکسایشی کره مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: لیپوزوم‌ها با استفاده از غلظت‌های لسیتین به کلسترول (۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰ و ۳۰-۳۰) تهیه شدند. به منظور تعیین خواص کاربردی میکرولیپوزوم‌ها آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، پایداری فیزیکی، پتانسیل زتا و فعالیت آنتی اکسیدانی بررسی گردید، سپس براساس نتایج، فرمولاسیون بهینه (تیمار M3) میکرولیپوزوم در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به هزار گرم خامه اضافه شدند و با آنتی اکسیدان BHTتوسط شاخص‌های عدد پراکسید، عدد اسیدی و پایداری اکسایشی به منظور بررسی پایداری کره طی دوره ۱۲۰ روزه نگهداری مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند و میانگین‌ها توسط نرم‌افزارMStatC و براساس آزمون دانکن در سطح ۵ ٪ مقایسه گردید.

یافته‌ها: اندازه ذرات لیپوزوم‌ها در محدودهٔ µm ۴-۹ بود. افزودن کلسترول اثر معنی‌داری بر اندازه ذرات داشت. افزودن کلسترول پتانسیل زتا نمونه‌ها را افزایش داد. در کل غلظت ۴۰ به ۲۰ میلی گرم لسیتین به کلسترول به عنوان غلظت بهینه در تولید میکرولیپوزوم‌ها شناخته شد و از آن در پایداری اکسایشی کره استفاده گردید. نتایج نشان داد که تیمارN400 (نمونه حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم میکرولیپوزوم‌حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه) بیشترین پایداری را دارا بود.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، با استفاده از ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه و ریزپوشانی آن‌ها به‌صورت میکرولیپوزوم می‌توان از آن در جلوگیری از فساد شیمیایی و افزایش ماندگاری و ویژگی‌های فراسودمند خامه و کره مشتق شده از آن بهره برد و گام مثبتی در جهت تولید محصولات عملگرا و ارتقاء سلامتی مصرف کنندگان برداشت.

واژه‌های کلیدی: *پایداری، ترکیبات فنلی، توکوفرول‌ها، روغن مغز بنه، کره، میکرولیپوزوم*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: zh_khoshkhoo@iau-tnb.ac.ir

مقدمه

امولسیون‌ها به دلیل ویژگی‌های فیزیکی قابل توجه، اهمیت بسیاری در صنایع غذایی دارند اما میزان قابل ملاحظه‌ای از کلسترول در برخی از آن‌ها مانند خامه و کره، یک عامل خطرزا در شیوع بیماری‌های قلبی عروقی است هم‌چنین در نتیجه اکسیداسیون کلسترول طی فرآیند یا نگهداری، ترکیباتی تولید می‌گردند که در گروه عوامل سرطانزا، موتاژنیک، سیتوتوکسیک، و آتروژنیک شناخته شده‌اند (Sadeghizadeh *et al.*, 2017). کره که در اثر زدن خامه به‌دست می‌آید دارای ارزش غذایی بالا است. اسیدهای چرب و کلسترول موجود در کره در اثر عواملی مانند هوا، نور و دما اکسید می‌شوند. اکسیداسیون از مهم‌ترین عوامل فساد کره می‌باشد. یکی از رایج‌ترین روش‌های کنترل اکسیداسیون استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است. امروزه استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی به علت سمی و سرطان‌زا بودن محدود شده است، بنابراین مطالعات برای استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی به عنوان جایگزینی برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Carabulut *et al.*, 2010). ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که از ویژگی‌های آنتی‌کسیدانی بالایی نیز برخوردارند و از فاکتورهای مهم برای ارزیابی کیفیت روغن‌ها و مواد خوراکی محسوب می‌گردند. بین پایداری اکسایشی و میزان ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن‌ها رابطه مستقیم وجود دارد. هم‌چنین این ترکیبات دارای نقش بیولوژیکی در بدن می‌باشند که با افزایش ظرفیت دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن انسان، مانع ایجاد بیماری‌های ناشی از تشکیل زیاد رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Tavakoli and Pazhouhanmehr, 2010).

توکوفرول‌ها یا ویتامین‌های گروه E، محلول در چربی هستند و اجزاء بسیار مهم بخش غیرصابونی روغن‌های گیاهی به شمار می‌آیند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز هستند. این ترکیبات به طور طبیعی در روغن‌های گیاهی وجود دارند. بیشترین فعالیت ویتامینی آن‌ها به نوع آلفا و سپس انواع بتا، گاما و دلتا تعلق دارد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها عکس این ترتیب می‌باشد. توکوفرول‌ها از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد، چربی‌ها و روغن‌ها را در برابر تخریب‌های اکسایشی محافظت می‌کنند و از این روی آن‌ها در سلامتی انسان نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Morello *et al.*, 2004).

ترکیبات فنلی و توکوفرولی استخراج شده از گیاهان دارویی از مهم‌ترین ترکیبات زیست فعال هستند که عمدتاً استفاده از آن‌ها به صورت آزاد در مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است. درون پوشانی ترکیبات زیست فعال در حامل‌های لیپیدی می‌تواند قابلیت زیستی و ماندگاری آن‌ها را افزایش دهد. لیپوزوم‌ها از مهم‌ترین حامل‌های لیپیدی هستند که برای ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال مورد استفاده قرار می‌گیرند (Feng and Bhandari, 2010). لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها (همانند لسیتین) بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای را ایجاد می‌کنند. این ترکیبات به دلیل خاصیت آمفی فیلیک توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب دوست، چربی دوست و آمفی فیل را دارند (Keller, 2001). علاوه بر مولکول‌های فسفولیپیدی یا لیپیدی، نانولیپوزوم ها ممکن است حاوی مولکول های دیگر مثل استرول‌ها در ساختار خود باشند. استرول‌ها یکی از اجزای مهم در ساختار غشاهای طبیعی هستند و وارد کردن آن‌ها در ساختار نانو لیپوزوم‌ها باعث تغییرات مهمی در خصوصیات آن‌ها می شود. کلسترول، استرولی است که به‌طور گسترده در ساختار وزیکول‌های لیپیدی استفاده می‌شود. کلسترول ساختار لایه‌ای ندارد اما می‌تواند در داخل غشاهای فسفولیپیدی در غلظت‌های بالا مثل نسبت‌های مولی ۱: ۱ یا حتی ۱ : ۲ کلسترول به فسفولیپید (لسیتین) گنجانده شود که توسط تعدیل کردن سیالیت دو لایه‌های لیپیدی باعث افزایش پایداری وزیکول‌های لیپیدی می‌شود (Mozafari, 2010). درون پوشانی ترکیبات فنولیک و توکوفرولی، به عنوان آنتی اکسیدان‌های طبیعی، یکی از راه‌های جلوگیری از اکسیداسیون و بهبود جذب آن‌ها در بدن است. لیپوزوم‌ها ذرات کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی هستند که به علت داشتن بخش‌های آب دوست و لیپیدی، در به دام انداختن، تحویل و آزادسازی ترکیبات آب دوست، چربی دوست و آمفی فیلیک (دو گانه دوست)، می‌توانند به کار گرفته شوند (Alexander *et al.*, 2012).

بنه (*Pistacia atlantica*) از خانواده آناکاردیاسه[1] از منابع گیاهی بومی ایران است که با بیش از ۴۰ میلیون اصله درخت، حدود ۱/۲۰۰/۰۰ هکتار از جنگل‌های زاگرس را شامل می‌شود. میزان روغن مغز بنه حدود ۵۶٪ است که در حدود ۳۰٪ دانه کامل را تشکیل می‌دهد. روغن مغز بنه به دلیل مقادیر زیاد ترکیبات فنلی و توکوفرولی از پایداری اکسایشی بالایی برخوردار است (Farhoosh and Sharif, 2009).

در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری در جهت استفاده از ترکیبات ریزپوشانی‌شده در صنعت غذا به منظور غنی سازی ترکیبات زیست فعال و تولید غذاهای فراسودمند انجام شده است. از جمله تحقیقات صورت گرفته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تولید نانولیپوزوم‌های حاوی D3 در لیپوزوم‌های برپایه لسیتین- کلسترول (Mohammadi *et al.*, 2014)، تولید لیپوزوم‌های حاوی ویتامین E و C به روش هیدارسیون لایه نازک (Marsanasco *et al.*, 2011).

پژوهش حاضر با هدف تهیه فرمولاسیون کره حاصل از خامه با میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات توکوفرولی و فنلی روغن مغز بنه (برای اولین بار در ایران و جهان) و ارزیابی ویژگی‌های شیمیایی و پایداری آن به منظور بهره‌وری هر چه بیشتر از مواهب خدادادی و فرصت‌های موجود برای تولید محصولات طبیعی و ارگانیک انجام می‌شود.

کاربرد ترکیبات فنلی در تولید مواد غذایی فراسودمند با محدودیت‌های عدیده‌ای به علت پایداری پایین، حلالیت نامناسب، دسترسی زیستی ضعیف، برهمکنش با سایر اجزای غذایی و ایجاد طعم گس مواجه است. پوشش دهی به‌عنوان روش موثر برای بهبود پایداری و جلوگیری از طعم نامطلوب ترکیبات فنلی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

- مواد اولیه

لسیتین (خلوص> ۹۹٪) از شرکت Lipoid (آلمان) تهیه گردید. کلسترول (درجه خلوص ۹۵٪)، استاندارد اسید گالیک، معرف فولین سیوکالتیو و سایر مواد شیمیایی از شرکت مواد شیمیایی مرک (آلمان) تهیه شدند. گونه گیاهی بنه مورد مطالعه از میوه درختان بنه از استان کرمان جمع‌آوری شد. بنه‌ها در سایه و با انجام عمل هوادهی خشک گردیدند و تا زمان آزمون در دمای ۵-۴ °C نگه داری شدند. خامه پاستوریزه و بدون مواد نگهدارنده از شرکت پگاه استان تهران تهیه گردید.

- استخراج روغن مغز بنه

پس از خشک کردن بنه، پریکارپ آن برداشته و مغزها در آسیاب پودر می‌شوند. استخراج روغن توسط حلال هگزان انجام شد و سپس حلال در خلأ در دما ۴۰ °C تبخیر گردید. روغن استخراجی تا هنگام انجام آزمایش‌ها در ظروف تیره تحت ازت و در فریزر نگهداری شد (Farhoosh and Sharif, 2009).

- اندازه‌گیری میزان ترکیبات فنلی کل

میزان ترکیبات فنلی کل[2] مطابق روش Capannesi و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد و نتایج بر حسب اسید گالیک بیان شدند. در این روش از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم گردید و جذب نمونه‌های روغن پس از آماده سازی، در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد.

- اندازه‌گیری میزان ترکیبات توکوفرولی کل

مقدار ترکیبات توکوفرولی کل[3] روغن مغز بنه به روش فرهوش و همکاران براساس آلفا- توکوفرول تعیین گردید. ابتدا منحنی کالیبراسیون رسم گردید و جذب نمونه‌های روغن پس از آماده‌سازی در ۵۲۰ نانومتر خوانده شد (Farhoosh *et al.*, 2011).

- تهیه میکرولیپوزوم

مواد حامل شامل لسیتین و کلسترول با نسبت‌های (۶۰ به۰، ۵۰ به۱۰، ۴۰ به۲۰و ۳۰ به۳۰ میلی‌گرم) توسط ۲۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر به مدت یک ساعت و در دمای ۵۵°C هیدراته شد. ۵ میلی لیتر ترکیبات فنلی و توکوفرولی در ۱۴ میلی‌لیتر پلی اتیلن گلیکول ۳ درصد حجمی در دمای ۵۵°C به مدت ۱۵ دقیقه حل شد. مخلوط حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی، لسیتین و کلسترول به بشر

[1] Anacardiaceae [2] Total phenolics content (TP) [3] Total tocopherols content (TT)

۳۰۰ میلی‌لیتری مقاوم به حرارت منتقل و ۱۴ میلی لیتر حلال پلی اتیلن گلیکول دیگر نیز به آن اضافه شد. توئین ۸۰ (سورفکتانت غیر یونی) به عنوان امولسیفایر استفاده شد. مخلوط مورد نظر با ۴۰ میلی لیتر آب مقطر به حجم رسانده شد و با دستگاه هم‌زن PER شرکت IKA آلمان با دور ۱۰۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۵۵ ^{o}C همزده شد. به منظور پایداری محلول لیپوزومی ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس در یخچال در دمای ۴ ^{o}C نگهداری شد (Mozafari, 2010; Mozafari *et al.*, 2011).

در مجموع ۴ تیمار، شامل موارد زیر تهیه و خصوصیات میکرو لیپوزوم‌ها تعیین شد.

M_1: لسیتین ۶۰ میلی گرم + کلسترول ۰ میلی گرم + ترکیبات فنلی و توکوفرول ۵ میلی گرم

M_2: لسیتین ۵۰ میلی گرم + کلسترول ۱۰ میلی گرم + ترکیبات فنلی و توکوفرول ۵ میلی گرم

M_3: لسیتین ۴۰ میلی گرم + کلسترول ۲۰ میلی گرم + ترکیبات فنلی و توکوفرول ۵ میلی گرم

M_4: لسیتین ۳۰ میلی گرم + کلسترول ۳۰ میلی گرم + ترکیبات فنلی و توکوفرول ۵ میلی گرم

- تعیین اندازه ذرات

قطر متوسط ذرات در دستگاه آنالیزکننده اندازه ذرات (SHIMADZO مدل SALD 2101، ساخت ژاپن) براساس روش تفرق نور لیزر(روش SLS[1]) اندازه‌گیری شد. متوسط اندازه ذرات براساس میانگین قطر حجمی گزارش گردید (Chanda *et al.*, 2011).

- بررسی پایداری فیزیکی میکروکپسول‌ها

بررسی پایداری فیزیکی سیستم‌های کلوئیدی طی مدت نگه‌داری آن‌ها، یکی از آزمون‌های مهم در رابطه با ویژگی این نوع سیستم‌ها می‌باشد. به‌منظور بررسی پایداری فیزیکی سیستم، محلول‌های لیپوزومی حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه در دما یخچال نگه‌داری گردیدند. اندازه ذرات برای ارزیابی پایداری فیزیکی نمونه‌ها در روزهای ۱، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ انجام شد(Chanda *et al.*, 2011).

- پتانسیل زتا

پتانسیل زتا لیپوزوم‌ها توسط دستگاه زتاسایزر (Malvern، انگلستان)در دمای ۴ ^{o}C، pH =۷/۲۵ و توان ۱۵۰ وات انجام شد (Fatouros and Antimisiaris, 2002).

- بررسی درصد مهار رادیکال‌های آزاد پلی‌فنلی و توکوفرولی با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH[2] انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی قبل و بعد از کپسولاسیون ارزیابی شد. ابتدا عصاره متانولی در سه رقت متوالی (۰/۵mg/mL، ۱ و ۱/۵) تهیه شد، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت های عصاره به ۳/۹ mL محلول متانولی ۰/۱ میلی مولار(DPPH) افزوده شد و جذب نوری نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری در دمای اتاق، در طول موج ۵۱۷ نانومتر، توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. جهت انجام محاسبات، جذب DPPH (۰/۰۰۴ ٪) نیز اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH توسط رابطه زیرمحاسبه شد که در آن A blank میزان جذب گروه کنترل و A sample میزان جذب نمونه‌ها و I درصد مهار رادیکال DPPH است (Delazar *et al.*, 2012):

$$I\% = \left(\frac{\text{A blank} - \text{A sample}}{\text{A blank}}\right) \times 100$$

جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی میکروکپسول‌ها، از تیمار بهینه باتوجه به آزمون‌های مذکور استفاده شد. برای اینکه عصاره استخراجی از میکروکپسول معادل میزان عصاره آزاد باشد به ترتیب ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم میکرو کپسول به ازای هر میلی‌لیتر محلول استخراجی توزین گردید و باقی مراحل همانند مراحل توضیح داده شده در مورد عصاره آزاد صورت گرفت.

- بررسی پایداری اکسایشی کره حاصل از خامه

پس از انتخاب میکروکپسول مناسب از مرحله اول، در این مرحله میکروکپسول‌های مذکور به نسبت‌های ۱۰۰ mg/mL ، ۲۰۰ و ۴۰۰ (به ترتیب نمونه‌های N_{100}،

[1] Static Light Scattering

[2] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

N_{200} و N_{400}) و همچنین آنتی اکسیدان BHT[1] با غلظت ۱۰۰ پی پی ام (T100) صورت گرفت. به خامه پاستوریزه تلقیح شدند. پس از تلقیح، خامه به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری و سپس به کره تبدیل گردید. جهت تهیه کره یک کیلوگرم خامه با ۲ کیلوگرم آب سرد مخلوط (در تیمارهای جداگانه مذکور) و داخل ظرف پلاستیکی در بسته با گنجایش ۱۰ کیلوگرم گردید. این ظرف حدود ۸-۱۰ دقیقه به طور متناوب حرکت داده شد و بدین ترتیب کره بدست آمد. سپس نمونه‌ها در ظروف ۱۰۰ گرمی پر و به‌وسیله دستگاه درب‌بندی تحت خلا بسته‌بندی و در یخچال(دمای ۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. نمونه به مدت ۴ ماه در دمای یخچال نگهداری و در فواصل زمانی یک ماه آزمون‌های پایداری روغن (رنسیمت)، اندیس اسیدی و اندیس پراکسید در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. (Manafi *et al.*, 2018).

- اندازه‌گیری عدد پراکسید

روش AOCS شماره cd8b-90 برای اندازه گیری پراکسید استفاده شد (AOAC, 2005).

- اندیس اسیدی

درصد اسید چرب آزاد با روش AOCS شماره ca5a-40 اندازه‌گیری و برحسب اسید اولئیک گزارش شد (AOAC, 200).

- پایداری اکسایشی

با استفاده از رنسیمت و براساس AOCS شماره CD12-57 در دمای ۱۵۰ °C اندازه‌گیری شد (Tabee *et al.*, 2008).

- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن با سطح احتمال خطای ۵٪ انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

یافته‌ها

- میزان ترکیبات فنلی و توکوفرولی

مقدار ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار ترکیبات فنلی ۱۰۳/۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم و میزان ترکیبات توکوفرولی روغن بنه ۸۱۷/۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌دست آمد.

جدول۱- مقدار ترکیبات فنلی و توکوفرولی کل موجود در روغن مغز بنه

Table 1. Amount of total phenolic and tocopherol compounds in coriander kernel oil

Type of compounds	Amount of compounds (mg / kg)
Phenolic compounds	103.47
Tocopherol compounds	817.92

- بررسی ویژگی‌های میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه

- اندازه و پایداری میکرولیپوزوم‌ها

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارها بر اندازه ذرات میکرولیپوزوم در جدول ۲ نشان داده شده است. بین اندازه نمونه‌های حاوی غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول تفاوت معنی‌داری در آزمون دانکن در سطح ۵٪ ($p<۰/۰۵$) وجود داشت. بیشترین اندازه لیپوزوم در تیمار M_1 (نسبت لسیتین به کلسترول ۶۰ به ۰) بود. در تمام موارد متوسط قطر حجمی ذرات در محدوده μm ۴-۱۰ بود. میکرولیپوزوم‌ها با نسبت لسیتین به کلسترول ۴۰ به ۲۰، اندازه کوچک‌تری نسبت به سایر لیپوزوم‌ها دارا بودند. با افزایش مقدار کلسترول اندازه ذرات میکرولیپوزومی کاهش یافت. اما در تیمار M_4 با نسبت برابر لسیتین - کلسترول، اندازه لیپوزوم افزایش یافت.

براساس نتایج آنالیز واریانس نیز اثر زمان نگهداری بر اندازه لیپوزوم‌ها اثر معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$). با گذشت زمان اندازه میکرولیپوزوم‌ها افزایش نشان داد. در تیمار M_1 بعد از گذشت ۶۰ روز بیش‌ترین افزایش اندازه مشاهده شد. تیمار M_3 کمترین افزایش اندازه را داشت و پس از گذشت ۶۰ روز تفاوت معنی‌دار در اندازه آن مشاهده نشد و کوچک‌ترین اندازه ذرات در تمامی زمان‌ها مربوط به تیمار

[1] Butylated hydroxytoluene

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارها بر اندازه ذرات (µm) و پایداری فیزیکی میکرولیپوزوم حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه طی مدت زمان نگهداری

Table 2. Particle size (µm) and physical stability of microliposomes containing phenolic and tocopherol compounds of coriander kernel oil during storage

Treatment	Storage time (day)			
	1	10	20	30
M_1	6.26^{Ca}	6.38^{Cb}	7.47^{Bab}	9.25^{Aa}
M_2	5.43^{Db}	6.59^{Cb}	7.05^{Bb}	7.45^{Ac}
M_3	4.29^{Bc}	4.78^{Ac}	4.88^{Ac}	5.09^{Ad}
M_4	6.24^{Da}	7.3^{Ca}	7.92^{Ba}	8.44^{Aa}

^{a,b,c} Different small letters in the same column, represents significant difference ($p< 0.05$).
^{A,B,C} Different small letters in the same row, represents significant difference ($p< 0.05$).

M_3 بوده است (p<۰/۰۵). اندازه ذرات تیمار M_4 نیز در فاصله زمانی ۱۰ تا ۳۰ روز تغییری نداشت.

براساس نتایج آنالیز واریانس نیز اثر زمان نگهداری بر اندازه لیپوزوم‌ها اثر معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). با گذشت زمان اندازه میکرولیپوزوم‌ها افزایش نشان داد. در تیمار M_1 بعد از گذشت ۶۰ روز بیشترین افزایش اندازه مشاهده شد. تیمار M_3 کمترین افزایش اندازه را داشت و پس از گذشت ۶۰ روز تفاوت معنی‌دار در اندازه آن مشاهده نشد و کوچکترین اندازه ذرات در تمامی زمان‌ها مربوط به تیمار M_3 بوده است (p<۰/۰۵). اندازه ذرات تیمار M_4 نیز در فاصله زمانی ۱۰ تا ۳۰ روز تغییری نداشت.

- پتاسیل زتا

نتایج پتانسیل زتا میکرولیپوزوم‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر تیمارها بر پتانسیل زتا معنی دار بود. بیشترین پتانسیل زتا مربوط به تیمار M_4 بود و از لحاظ آماری میان تیمار M_3 و M_4 تفاوت وجود نداشت. با افزایش میزان کلسترول پتانسیل زتا نمونه‌ها نیز افزایش یافت.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارها بر پتانسیل زتا میکرولیپوزوم حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز پسته وحشی(بنه)

Table 3. zeta potential of microliposomes containing phenolic and tocopherol compounds of wild pistachio kernel oil (coriander)

Treatment	zeta potential
M_1	-16.4^{c}
M_2	-24.77^{b}
M_3	-30.31^{a}
M_4	-32.39^{a}

^{a,b,c} Different small letters in the same column, represents significant difference ($p< 0.05$).

با توجه به اندازه ذرات کوچک‌تر، پایداری فیزیکی و پتانسیل زتا بالاتر در تیمار M_3 از این تیمار برای آزمون‌های بعدی استفاده شد.

- فعالیت آنتی اکسیدانی

به منظور بررسی خاصیت آنتی اکسیدنی از تیمار بهینه (M3) استفاده شد. جدول ۴ میزان مهار رادیکالDPPH در حضور غلظت‌های مختلف عصاره آزاد و ریزپوشانی شده، را نشان می‌دهد. با بررسی نتایج مشخص گردید که غلظت عصاره‌ها تأثیر معنی‌داری روی مهار رایکال آزاد DPPH داشتند و با افزایش غلظت درصد مهار رادیکال افزایش یافت. بیشترین درصد احیاکنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۱/۵mg/mL عصاره آزاد و میکرولیپوزوم مشاهده شد. در غلظت‌های برابر میکرولیپوزوم و عصاره آزاد تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد که این امر می‌تواند نشان دهنده آن باشد که درون پوشانی بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر معنی‌دار نداشت.

جدول ٤- تأثیر غلظت‌های مختلف میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی پسته وحشی(بنه) و عصاره کپسوله نشده آن بر میزان مهار رادیکال DPPH (٪)

Table 4. The effect of different concentrations of microliposomes containing phenolic and tocopherol compounds of wild pistachio (corm) and its unencapsulated extract on the rate of DPPH radical inhibition (%)

Treatment	Free extract	microliposomes
0.5%	24.6^{b}	22.2^{b}
1%	37.8^{c}	36.2^{c}
1.5%	58.2^{a}	57.5^{a}

- نتایج پایداری اکسایشی کره

- عدد اسیدی

در پایان ماه اول میان تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه و آنتی‌اکسیدان BHT اختلاف معنی‌دار نبود. تغییرات عدد اسیدی در تمام نمونه‌ها روند افزایشی داشت(شکل ۱). از لحاظ آماری در طول دوره نگهداری میان تیمارهای N_{100}،N_{200} اختلافی وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$). از میان غلظت‌های مختلف میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه تیمار N_{400} کمترین مقدار عدد اسیدی را داشت ($P< ۰/۰۵$). کمترین مقدار عدد اسیدی در نمونه T_{100} و بیشترین مقدار عدد اسیدی در نمونه شاهد مشاهده شد. در پایان ماه چهارم میان تیمار T_{100} وN_{400} تفاوت آماری وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$).

- شاخص پراکسید

تفاوت میان تیمارها در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. میان تیمار N400 و T100 در طی زمان نگهداری اختلاف معنی دار مشاهده نشد. با گذشت زمان عدد پراکسید نمونه‌ها افزایش داشت. بیشترین تغییرات در تیمار شاهد مشاهد شد.

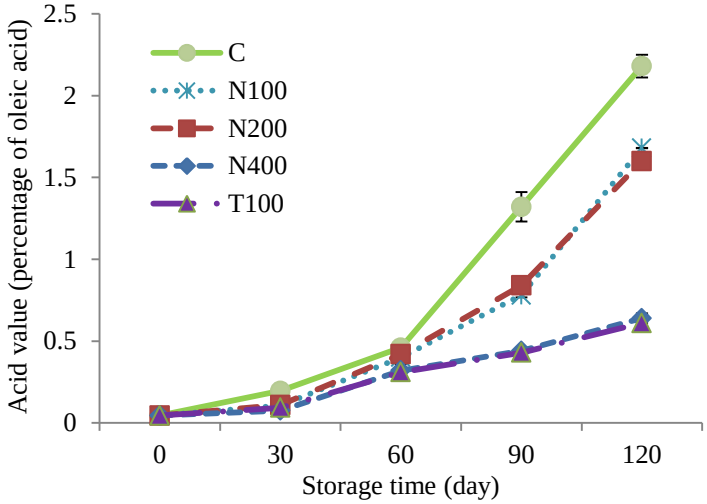

Figure 1. Comparison of the acid number of different butter treatments during storage

شکل ۱- مقایسه عدد اسیدی تیمارهای مختلف کره در طول نگهداری

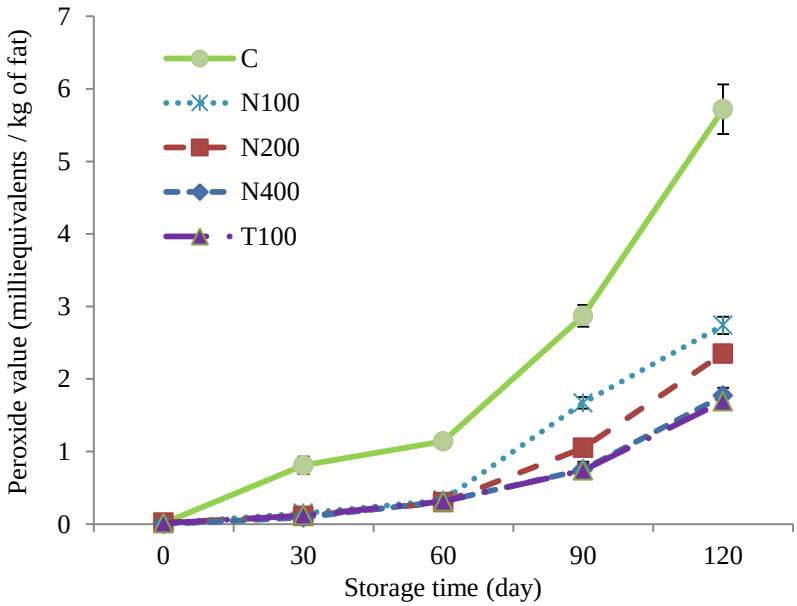

Figure 2. Comparison of the peroxide value of different butter treatments during storage

شکل ۲- مقایسه عدد پراکسید در تیمارهای مختلف کره در طول نگهداری

- آزمون رنسیمت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های شاخص پایداری اکسایشی نشان داد که، اثرات اصلی (غلظت‌های مختلف میکرولیپوزوم و زمان) و اثر متقابل زمان و غلظت بر روی پایداری اکسایشی معنی دار بود ($P< ۰/۰۵$). در شکل ۳ تغییرات شاخص پایداری اکسایشی تیمارها نشان داده است.

بحث

ترکیبات فنلی، آنتی‌کسیدان‌های طبیعی هستند. رابطه مستقیمی میان پایداری اکسایشی و ویژگی‌های حسی روغن‌ها و میزان ترکیبات فنولی وجود دارد. هم‌چنین این ترکیبات دارای نقش بیولوژیکی در بدن می‌باشند و مانع ایجاد بیماری‌های ناشی از تشکیل زیاد رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Tavakoli and Pazhouhanmehr, 2010). توکوفرول‌ها یا ویتامین‌های گروه E، محلول در چربی هستند و اجزاء بسیار مهم بخش صابونی‌ناشونده که از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد و سوق دادن واکنش‌های اکسایشی به مراحل پایانی، چربی‌ها و روغن‌ها را در برابر اکسایش محافظت می‌نمایند (Morello *et al.*, 2004).

در مطالعه حاضر مقدار ترکیبات فنلی ۱۰۳/۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم و میزان ترکیبات توکوفرولی روغن بنه ۸۱۷/۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌دست آمد. Tavakoli و Pazhouhanmehr (۲۰۱۰) مقدار ترکیبات فنلی روغن پوست بنه را ۸۱/۷۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم روغن و میزان ترکیبات توکوفرولی روغن پوست بنه ۶۴۹/۹۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم محاسبه گردید. همانطور که مشاهده می‌شود در مقدار ترکیبات فنلی روغن بنه در مطالعه حاضر با مطالعه مذکور تفاوت‌هایی وجود دارد، به طور کلی ترکیبات تشکیل دهنده روغن‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، رقم گیاه، سن گیاه در هنگام تهیه روغن، شرایط محیطی و فصلی، نوع کشت، زمان برداشت، روش خشک کردن و حلال استخراج و درنهایت تفاوت ژنتیکی گیاه می تواند تغییر کند (Burt, 2004).

- بررسی ویژگی‌های میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه

اندازه ذرات سیستم‌های کلوئیدی مانند لیپوزوم‌ها، اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات آن‌ها دارد. اندازه ذرات کوچک‌تر باعث به وجود آمدن سطح تماس بیشتر و در نتیجه کارآیی زیستی، شفافیت و حلالیت را بالاتر می‌شود (Wu *et al.*, 2011). نتایج نشان داد که برای سیستم لیپوزومی حامل ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه مقادیر بهینه ای از غلظت فسفولیپید به کلسترول وجود دارد

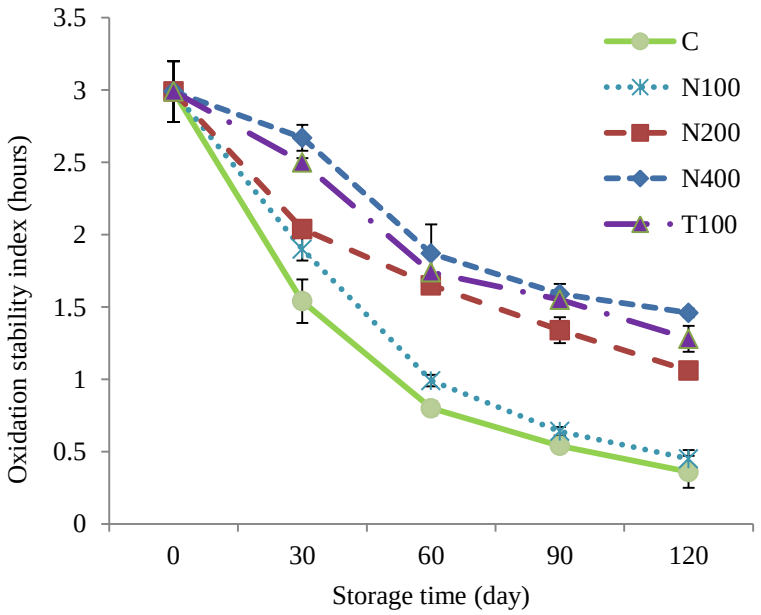

Figure 3. Comparison of the Oxidation stability index of different butter treatments during storage

شکل ۳- مقایسه شاخص پایداری اکسایشی در تیمارهای مختلف کره در طول نگهداری

که کمترین اندازه ذرات لیپوزومی را به دست می‌دهد و بیشتر یا کمتر از آن اندازه ذرات افزایش می‌یابد در مطالعه حاضر کمترین مقادیر انداز ذرات در تیمار M_3 مشاهده شد (جدول ۲). Lu و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند کمترین میزان اندازه ذرات در لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی فنلی چای در نسبت ۳:۱ لسیتین به کلسترول است. گزارش‌های متضادی در مورد اثر استرول‌ها بر اندازهٔ ذرات لیپوزومی منتشر شده که به نظر می‌رسد روش تهیه لیپوزوم در آن بسیار موثر بوده است. در تطابق با پژوهش جاری، Gopinath و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که افزایش غلظت کلسترول تا ۳۰ درصد باعث کاهش اندازه وزیکول‌های حاوی آزیدوتیمیدین می شود.

عدم تغییر پارامترهایی از قبیل اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، راندمان کپسولاسیون در یک دوره زمانی طولانی نشان دهنده پایداری لیپوزوم‌های تولیدی است. به منظور ارزیابی پایداری فیزیکی، قطر متوسط میکروذرات لیپوزومی بعد از ۱، ۱۰، ۳۰ و ۶۰ روز نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). با توجه به نتایج تیمار M_3 کمترین افزایش اندازه را داشت و در واقع بالاترین پایداری فیزیکی را دارا بود. انبوهش[1] ذرات طی زمان نگه‌داری باعث ناپایداری سیستم‌های کلوئیدی می‌شود. نیروهای جذبی بین ذرات باعث چسبیدن آن‌ها به هم و تشکیل ساختارهای بزرگ‌تر می‌شود. این فرآیند با وارد کردن نیروهای ملایم برگشت‌پذیر است. درصورت پیشرفت فرآیند انبوهش، لیپوزوم‌ها به هم متصل و لیپوزوم‌های بزرگ‌تر را ایجاد می‌نمایند (Shin *et al.*, 2013). کلسترول با قرارگرفتن در ساختار دولایه‌ای لیپیدها، باعث کاهش بی‌نظمی در ساختار و استحکام آن می‌شود (McClements and Li, 2012)Gibis. و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی فنلی عصاره دانه انگور از پایداری فیزیکی و اکسیداسیونی طولانی مدت (حدود ۱۵۰ روز) برخوردار بودند.

پتانسیل زتا میزان برهم کنش دافعه بین ذرات کلوئیدی را نشان می‌دهد و برای ارزیابی پایداری سوسپانسیون‌های استفاده می‌شود. در ذرات با پتانسیل زتای پایین، نیروی دافعه اندکی وجود دارد و ذرات در نهایت به هم پیوسته و موجب ناپایداری سیستم خواهند شد. به‌طور کل اگر پتانسیل زتای کل سیستم کلوئیدی از ۳۰mV± بالاتر باشد، ذرات از نظر نیروهای دافعه الکترواستاتیکی پایدار خواهد بود (Liu and Park, 2010). تمامی فرمولاسیون‌های لیپوزومی دارای پتانسیل زتا با بار منفی بودند. استفاده از کلسترول در ساختار میکرولیپوزوم‌ها باعث افزایش میزان پتانسیل زتای نمونه‌ها شد. به طوری که میزان آن از ۱۶/۴- در نمونه بدون کلسترول تا ۳۲/۳۹- در نمونه حاوی ۳۰mg افزایش یافت. بالاتر بودن میزان پتانسیل زتا، نشان از پایداری بالای نانوذرات دارد. طبق پژوهش های قبلی، با کاهش اندازه لیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا افزایش می‌یابد (Sebaaly *et al.*, 2016; Rasti *et al.*, 2012). که نتایج مشابهی نیز در این مطالعه مشاهده شد به طوریکه تیمار M_3 بالاترین پتانسیل زتا و پایداری فیزیکی و همچنین کمترین اندازه ذرات را دارا بود.

بار منفی ذرات در نتیجه تشکیل پیوند هیدروژنی میان گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول و گروه کولین در فسفاتیدیل کولین ایجاد می‌شود که در نتیجه این پیوند، گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا و گروه فسفاتیدیل با بار منفی به سطح غشا کشیده می‌شود و در نتیجه آن بار منفی ذرات و دافعه الکترواستاتیک بین آن ها افزایش می‌یابد (Gibis *et al.*, 2011). هم‌چنین ترکیبات پلی‌فنلی می‌تواند با اتصال به سیستم باعث افزایش بار منفی شوند بار منفی ترکیبات فنلی(۱۲ mV-) در اثر یونیزه شدن نسبی آن‌ها تحت pH سیستم اتفاق می‌افتد. علاوه بر این ترکیبات فنلی نه تنها می‌توانند در داخل لیپوزوم‌ها قرار بگیرند بلکه می‌توانند به سطح غشای لیپوزومی نیز جذب یا ملحق شوند (Gibis *et al.*, 2011). Malheiros و همکاران (۲۰۱۲) افزایش پتانسیل زتا از ۵۵- به ۶۴- را در لیپوزوم حاوی نایسین، در نتیجه افزودن کلسترول به سیستم گزارش دادند.

رادیکال‌های DPPH با ترکیبات توکوفرولی و فنلی روغن مغز بنه که دارای ویژگی مهار رادیکال آزاد هستند؛ واکنش داده و در نهایت مقدار DPPH را کاهش دادند. میان غلظت (ترکیبات فنلی و توکوفرولی پلی) و فعالیت ضد رادیکالی ارتباط مستقیم وجود دارد چرا که در غلظت‌های بالا افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیلی ترکیبات فنلی و توکوفرولی رخ می‌دهد که احتمال اهداء هیدروژن را به

[1] Flocculation

رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهار کنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Zhang *et al.*, 2009). میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ریزپوشانی شده نسبت به عصاره آزاد اندکی ضعیف‌تر است. ممکن است ترکیبات داخل لیپوزوم‌ها به جای قرار گرفتن در داخل کپسول، روی سطح کپسول قرار گرفته باشد که این امر اکسیداسیون این ترکیبات و کاهش جزیی آن‌ها را سبب خواهد شد. هم‌چنین این کاهش را می‌توان به عدم دسترسی ترکیبات ریزپوشانی شده به دلیل برهم‌کنش آن با اجزای دیواره نسبت داد اما این اختلاف معنی‌دار نبود (Rezai *et al.*, 2015). بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی آزاد و میکروکپسول‌های زیتون توسط González-Paredes و همکاران (۲۰۱۱) تفاوت معنی‌دار بین عصاره آزاد و میکروکپسول‌ها نشان نداد.

- نتایج پایداری اکسایشی کره حاصل از خامه

عدد اسیدی تیمارهای T_{100} وN_{400} در پایان ماه چهارم تفاوت آماری نداشتند (شکل ۱) که نشان می‌دهد میکرولیپوزوم حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی روغن مغز بنه می‌تواند در کنترل عدد اسیدی مانند آنتی اکسیدان مصنوعی موثر واقع شود. دلیل این امر، به عملکرد پلی‌فنول‌ها و ترکیبات توکوفرولی روغن مغز بنه در جلوگیری از تولید رادیکال آزاد از طریق دادن اتم هیدروژن به رادیکال آزاد نسبت داده می شود (Quiles *et al.*, 2002).

غلظت میکرولیپوزوم‌ها بر عدد پراکسید تاثیر مثبت داشت. اثر افزایش غلظت میکروکپسول‌ها در جلوگیری از تولید پراکسید و در نهایت پایداری کره معنی دار بود به طوری که تیمار N_{400} اثر ممانعت کنندگی بالاتری نسبت به سایر غلظت میکرولیپوزوم داشت. با گذشت زمان عدد پراکسید تیمارها افزایش یافت که این افزایش در مقدار پراکسید را می‌توان به تشکیل هیدروپراکسیدها یعنی محصولات اولیه اکسیداسیون نسبت داد (شکل ۲). با افزایش غلظت میکرولیپوزوم، عدد پراکسید کاهش یافت. این احتمال وجود دارد که میکرولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنلی و توکوفرولی هیدروپراکسیدها را به مواد غیررادیکالی تجزیه کرده باشد و بنابراین میزان هیدروپراکسیدها و در نهایت شاخص پراکسید را کاهش دهد. ضمن اینکه میزان رادیکال های آزاد نیز در این حالت کاهش می یابد (Pokorney *et al.*, 2001). Shahidi و همکاران (۱۹۹۸) عصاره رزماری را به کره اضافه کردند و به مدت ۳۸ روز در دمای ۶۰ °C آن را نگهداری کردند عدد پراکسید نمونه‌ها با گذشت زمان افزیش یافت.

با افزایش غلظت میکرولیپوزوم‌ها مقدار ترکیبات فنلی و توکوفرولی کره نیز افزایش یافت و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز بیشتر گردید. بنابراین بالاترین پایداری اکسایشی مربوط به نمونه‌ایی بود که بیشترین غلظت میکرولیپوزوم را دارا بود (تیمار N_{400}). نمونه شاهد کمترین پایداری را داشت.

نتیجه‌گیری

هدف از این تحقیق تولید میکرولیپوزم‌های حاوی ترکیبات فنولی و توکوفرولی روغن مغز بنه و بررسی ویژگی‌های آن جهت استفاده در کره به منظور بهبود پایداری اکسایشی آن و تولید محصول جدید با ویژگی‌های فراسومند بود. بدین منظور اثر غلظت لسیتین- کلسترول بر تولید و خصوصیات فیزیکوشیمایی میکیرولیپوزوم‌های روغن مغز بنه بررسی گردید و پس از انتخاب تیمار بهینه (نسبت لسیتین به کلسترول ۴۰ به ۲۰) با متوسط اندازه ذرات کوچکتر، پتانسیل زتا و پایداری فیزیکی بالاتر از این تیمار با نسبت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در پایداری کره استفاده شد و مقایسه پایداری اکسیدایتو نمونه‌ها با کره حاوی ۱۰۰ پی پی ام آنتی اکسیدان BHT طی مدت ۴ ماه هر ۳۰ روز مقایسه و اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تیمار حاوی بالاترین غلظت میکرولیپوزوم (نمونه حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم) بالاترین عملکرد را در نگهداری کره داشت و بنابر این به نظر می رسد این تیمار در کنترل پایداری اکسایشی کره حاصل از خامه مناسب باشد.

منابع

Alexander, M., Acero Lopez, A., Fang, Y. & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. Food Sci. Technol, 47, 427-436.

Association of Official Analytical Chemists. (AOAC) (2005). Official Methods

of Analysis of the AOAC (15 th Ed.) Arlinton, AOAC, USA, 10–12.

Burt, S. (2004). Essentialoils: their antibacterial propertied and potential application in foods-a review. Int. Food Microbiol, 94 (3), 223- 253.

Capannesi, C., Palchetti, I., Mascini, M. & Parenti, A. (2000). Electrochemicalsensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. Journal of Food Chemistry, 71, 553–562.

Carabulut, J., Alcaraz, M. & Benavente, O. (2010). Antioxidant and radioprotective effects of olive leaf extract. 951–958.

Chanda, H., Das, P., Chakraborty, H. & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 5, 2230-7885.

Delazar, A., Lotfipour, F. & Nazemiyeh, H. (2012). Antioxidant and Antimicrobial activity of Pedicularis sibthorpii Boiss. And Pedicularis wilhelmsiana Fisch ex. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2(1), 89-92.

Farhoosh, R. & Sharif, A. (2009). Bene hull oil as a highly stable and antioxidative vegetable oil. Eur J Lipid Sci Technol, 111, 1259-65.

Farhoosh, R., Tavassoli-Kafrani M. H. & Sharif, A. (2011). Antioxidant activity of sesame, rice bran and bene hull oils and their unsaponifiable matters. European Journal of Lipid Science and Technology, 113, 506-512.

Fatouros, D. G. & Antimisiaris, S. G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. Journal of colloid and interface science, 251(2), 271-277.

Feng, Z. & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols, a Review. Trends Food Science, 21(10), 510-523.

Gibis, M., Vogt, E. & Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. Food and Function, 3, 246 -254.

González-Paredes, A., Clarés-Naveros, B., RuizMartínez, M. A., Durbán-Fornieles, J. J., Ramos-Cormenzana, A. & Monteoliva-Sánchez, M. (2011). Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. Int. J. Pharm, 421(2), 321-31

Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B., Apte, S., Renuka, D. & Rambhau, D. (2004). Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. Int. J. Pharm., 271(1), 95-113.

Keller, B. C. (2001). Liposomes in nutrition. Trends. Food Sci. Tech., 12(1), 25-31.

Liu, N. & Park, H. J. (2010). Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loadedchitosan-coatednanoliposomes Colloids and Surfaces. B. Biointerfaces,76,16-19.

Lu, Q., Li, D. C. & Liang, J. G. (2011). Preparation of a Tea Polyphenol Nanoliposome System and Its Physicochemical Properties. J. Agric. Food Chem. 59, 13004–13011.

Malheiros, P. D. S., Sant Anna, V., Barbosa, M. D. S., Brandelli, A. & Franco, B. D. G. D. M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on Listeria monocytogenes growth in Minas technological approach. Biotechnol. Annu. Rev., 7, 59- 85.

Manafi, M., Haddad Khodaparast, M.H., Azadmard Damirchi, S., Valizadeh, H. & Tabatabaei, F. (2018). Preparation and some characteristics of Nano liposomes containing olive leaf extract. Iranian Journal of Food Science and Technology, 14(2), 155-163.

Marsanasco, M., Márquez, A. L., Wagner, J. R., Alonso, S. D. V. & Chiaramoni, N. S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. Food Research International., 44(9), 3039-3046.

McClements, D. J. & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. Advances in Colloid and Interface Science, 159, 213–228

Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezaei Mokarram, R. & Mohammadifar, M.A. (2014). Study of physical properties of vitamin D3- loaded nanoliposomes, prepared by thin layer hydration- sonication method. Iranian J. Nutr. Sci. Food Tech, 8(4), 175-188.

Morello, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J. & Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. Food Chem, 85, 357–364.

Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. Methods in molecular biology, Pp. Springer, 29-50.

Mozafari M. R., Khosravi-Darani K., Borazan G.G., Cui, J., Pardakhty A. & Yurdugul S. (2011). Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. International Journal of Food Properties, 11, 833-844.

Pokorney, J., Yanishheva, N. & Gordon, M. (2001). Antioxidant in food. CRC press.1st end,Newyork,U.S. A , 380.

Quiles, J., Ramırez-Tortosa, C., Alfonso Gomez, J., Huertas, J. & Mataix, J. (2002). Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. Food Chemistry, 76, 461–468.

Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R. & Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. Food Chemistry, 135(4), 2761-2770.

Rezai, S., Jafari, M., Khamiri, M. & Bayat H. (2015). Effect of solvent and method extraction on antioxidant activity walnut green husk extraction (shahmirzad). Food Technology & Nutrition, 12, 85-95

Sadeghizadeh yazdi, J., Mazaheri Tehrani, M., Habibi, M. & Razavi, S. (2017). Functional Properties and Sensory Evaluation of Cream Mixed Vegetable and Dairy; 15 (5), 180-191 [In persian].

Sebaaly, C., Greige-Gerges, H., Agusti, G., Fessi, H. & Charcosset, C. (2016). Large-scale preparation of clove essential oil and eugenol-loaded liposomes using a membrane contactor and a pilot plant. Journal of Liposome Research, 26(2), 126-38.

Shahidi, F., Zegarska, Z., Rafalowski, R., Amarowicz, R. & Karamac, M. (1998). Stabilization of butter with deodorized rosemary extract. Food Science and Technology, (206), 99–102.

Shin, G. H., Chung, S. K., Kim, J. T., Joung, H. & Park, H. J. (2013). Preparation of Chitosan-Coated Nanoliposomes for Improving the Mucoadhesive Property of Curcumin Using the Ethanol Injection Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 11119-11126.

Tabee, E., Azadmard-damirchi, S., Jagerstad, M. & Dutta, P.C. (2008). Effects of α-tocopherol on oxidative stability on phytosterol oxidation during heating on some regular and high oleic vegetable oils. Journal of American Oil Chemists Society, (85), 857–867.

Tavakoli, J. & Pazhouhanmehr, S. (2010). Fatty acid composition of oils from fruits of three Pistacia Species growing in Iran. Journal of Chemistry of Natural Compounds, 46, 623-624.

Wu, L., Zhang, J. & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticle. Advanced drug delivery reviews, 63(6), 456-469.

Zhang, Z., Liao, Li., L., Moore, J., Wu, T. & Wang. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels..(Juglans regia L.). Food Chemistry, 113, 160-5.

Effect of Microliposomes Containing Phenolic and Tocopherol Compounds of (*Pistacia atlantica*) Kernel Oil on the Butter Stability

M. Nikkhah[a], J. Khoshkho[b] *, S. E. Hoseini[c], P. Mahasti[c], A. Akhondzadeh[d]

[a] Ph D Student of the Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Associate Professor, Faculty of Food Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[d] Professor of the Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.

Received: 1 April 2020 Accepted: 13 September 2020

Abstract

Introduction: Wild pistachio (*pistacia atlantica*), as a plant source is rich in phenolic and tocopherol content that has significant antioxidant, therapeutic and antimicrobial effects. Encapsulation can be used as an effective method to improve the stability and prevent undesirable taste of phenolic compounds. Therefore in this study, the effect of micro liposomes containing phenolic and tocopherol compounds of *pistacia atlantica* (Beneh) oil on oxidative stability of butter was investigated.

Materials and Methods: Liposomes were prepared by the ratio of lecithin to cholesterol (0-60, 10-50, 20-40 and 30-30). In order to determine the functional properties of the micro liposomes, particle size, physical stability, zeta potential and antioxidant activity were determined. Based on the results, the best formulation of micro liposomes was added to 1000 g cream at the concentrations of 100, 200 and 400 mg and was compared with BHT. The stability of the cream was evaluated by peroxide value, acid value, and oxidative stability. All experiments were performed in a completely randomized design (CRD) and the means were compared by Mstatc software using Duncan's test at 5% level.

Results: The particle size of liposome was in the range of 4-9μm. The addition of cholesterol had a significant effect on particle size. The addition of cholesterol increased the zeta potential of the samples. The total concentration of 40 to 20 mg lecithin to cholesterol was identified as an optimal concentration in the production of micro liposomes and it was used in determination of oxidative stability of butter. The results showed that N_{400} (sample containing 400 mg / 1000g of phenolic and tocopherol compounds of *pistacia atlantica*) had the highest stability.

Conclusion: The results of this study showed that use of phenolic and tocopherol compounds of Beneh kernel oil, in form of microcapsules might be used to prevent chemical spoilage and also increase the shelf life and beneficial properties of cream and butter derived it, and it has taken a positive step towards producing functional products and promoting consumer health.

Keywords: *Butter, Beneh Kernel Oil, Micro Liposomes, Phenolic Compounds, Stability, Tocopherols.*

* Corresponding Author: zh_khoshkhoo@iau-tnb.ac.ir