

بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته ترکیبات زیست فعال انار و اسید لینولئیک کانژوگه به روش سطح پاسخ

مرتضی جمشید عینی^a، حمید توکلی پور^{b*}، رضوان موسوی نادوشن^c، محسن مختاریان^d

^a دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^b استاد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^c دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^d دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۵/۰۸

۷۹

چکیده

مقدمه: به دلیل حساسیت بسیاری از ترکیبات زیست فعال زیستی ادغام آن‌ها در ماتریس غذایی مشکل است. همچنین این ترکیبات در دستگاه گوارش تجزیه می‌شوند و به روده نمی‌رسند تا جذب شوند. بنابراین این مطالعه با هدف بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینولئیک کانژوگه) به روش سطح پاسخ انجام شد.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج تانن به کمک امواج فراصوت، کیتوزوم‌های حاوی هسته‌های زیستی (تانن - اسید لینولئیک کانژوگه) به روش حرارتی تولید شدند. شرایط بهینه استخراج به روش سطح پاسخ با مدل باکس - بنکن بهینه‌یابی شد. غلظت ترکیبات زیست فعال (۱۰۰ تا ۳۰۰ ppm)، غلظت کیتوزان (۰/۱ تا ۰/۳ w/v) و دامنه امواج فراصوت (۵۰ تا ۹۰٪) به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. کیتوزوم بهینه بر اساس کمینه اندازه ذرات، بیشینه راندمان ریزدرون پوشانی و بیشینه پتانسیل زتا انتخاب شد.

یافته‌ها: طی بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینولئیک کانژوگه) نانوکیتوزوم‌ها اندازه ذرات ۱۲۶/۲۵ nm، کارایی کپسولاسیون ۸۴/۹۹ درصد و پتانسیل زتا ۳۷/۷۰ بود. سازگاری موفقیت آمیز بین کیتوزان و ترکیبات زیست فعال قابل استخراج از انار در بررسی XRD قابل اثبات است. ذرات تقریباً کروی کیتوزان با اندازه ۷۷/۶۶ و ۷۹/۹۰ nm با یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع نرمال اندازه ذرات را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاضر نشان داد که پلیمرهای زیستی نقش کلیدی در پایداری ساختار غشای لیپوزومی و انتشار پایدار مولکول‌های به دام افتاده توسط یک مانع فضایی بر روی سطح دارند. این یک سکوی بالقوه برای طراحی مناسب حامل‌ها برای مواد مغذی یا نگهدارنده‌ها به منظور افزایش ماندگاری و ایمنی ماتریس‌های غذایی فراهم خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: اسید لینولئیک کانژوگه، تانن، عصاره پوست انار، فراصوت، کیتوزوم

مقدمه

ترکیبات زیست فعال طبیعی به دلیل پتانسیل عملکردی، کاربردهای فوق العاده‌ای در زمینه صنایع غذایی به دست آورده‌اند. اگرچه، ناپایداری و فراهمی زیستی ضعیف آنها به شکل ذاتی، عملکرد زیستی آنها را محدود کرده است. از این رو، ریزدرون پوشانی^۱ آنها از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Joy et al., 2023). ریزدرون پوشانی به عنوان روشی برای به دام انداختن موقت یک ترکیب زیست فعال در یک ماده پوسته‌ساز به منظور جلوگیری از دست دادن خواص عملکردی و تخریب زودرس توصیف شده است. ریزدرون پوشانی لیپوزومی نوعی از نانوذرات هستند که به دلیل توانایی آنها در حمل ترکیبات آبدوست و آبگریز مورد توجه محققان قرار گرفته است. ماهیت دوگانه دوست^۲ لیپوزوم‌ها به طور گسترده برای محصور کردن مواد مختلف دارویی فعال مورد بررسی قرار گرفته است، در حالی که ریزدرون پوشانی لیپوزومی برای کاربردهای غذایی کم است (Rudzińska et al., 2024). بنابراین، به عنوان یک راهکار امیدوارکننده برای از بین بردن معایب موجود، ادغام لیپوزوم‌ها با پلیمرهای زیستی به عنوان رویکرد جدید مورد بررسی قرار گرفته است. کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر طبیعی جهت پوشش لیپوزوم‌ها، عملکرد زیستی آنها را از نظر پایداری و سینتیک رهاسازی تعدیل می‌کند. بنابراین لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان (کیتوزوم‌ها) به عنوان یک حامل کارآمد برای انتقال موثر زیست فعال‌های بالقوه به مکان‌های مورد نظر باقی می‌مانند (Dutta et al., 2023).

اسید لینولئیک کانزوگه (CLA)^۳ خانواده‌ای از اسیدهای چرب غیراشباع چندانگانه است که به مخلوطی از ایزومرهای موضعی و هندسی اسید لینولئیک با پیوندهای دوگانه مزدوج اطلاق می‌شود که می‌تواند در هر موقعیتی از زنجیره کربنی، معمولاً بین ۸ تا ۱۳، و در یک پیکربندی سیس یا ترانس قرار گیرد. رایج‌ترین ایزومرها cis-9، cis-11، trans-10 و cis-12 هستند که به طور طبیعی در محصولات لبنی (شیر، پنیر و ماست) و گوشت نشخوارکنندگان (گوشت گاو و بره) وجود دارند (Badawy et al., 2023). CLA علاوه بر استفاده برای درمان

بیماری‌های قلبی عروقی، سندرم متابولیک و آسم، فواید سلامتی متعددی مانند ضد چاقی، ضد سرطان، ضد فشار خون، ضد دیابت و تعدیل‌کننده ایمنی دارد. بیشتر این اثرات بیولوژیکی به ایزومرهای c9، t11، t10 و cis12 نسبت داده شده است. علاوه بر این، مطالعات تحقیقاتی جدیدتر نشان می‌دهد که هر دو ایزومر دارای اثرات سلامتی بسیار متفاوتی هستند: t10، c12-CLA یک عامل ضد سرطان، ضد چاقی و ضد دیابت است، در حالی که t11-CLA، c9 عمدتاً ضد التهاب است. همچنین این احتمال وجود دارد که برخی از اثرات ناشی از عمل هم افزایی این ایزومرها باشد. بنابراین، CLA می‌تواند برای بهبود سندرم متابولیک انسان مفید باشد و یک مسیر تغذیه‌ای برای جلوگیری از بیماری‌های سبک زندگی یا سندرم متابولیک است (Du et al., 2023; Putera et al., 2023). با این وجود، به طور کلی، اسیدهای چرب غیر اشباع حلالیت در آب بسیار کمی دارند و مستعد تخریب اکسیداتیو هستند که از ارزش غذایی آنها می‌کاهد. به طور خاص، CLA پایداری شیمیایی بسیار ضعیفی را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده خوداکسیداسیون و ایزومریزاسیون است. برای غلبه بر این مشکلات، لازم است که با استفاده از سیستم‌های تحویل کارآمد از آن محافظت شود. به منظور محافظت از اسیدهای چرب غیر اشباع در برابر اکسیداسیون، سیستم‌های پوشینه‌سازی مختلفی از جمله ذرات پروتئین، میکرو امولسیون‌ها، لیپوزوم‌ها و سیستم‌های مبتنی بر پلیمر گزارش شده است (Nejatian et al., 2024; Yang et al., 2024).

انار (*Punica granatum*) بومی کشور ایران تا کوه‌های هیمالیا در شمال هند است. مطابق گزارشات اعلام شده، انار سالانه در ایران ۶۷۰ هزار تن و در جهان تقریباً ۲۱۸۰۰۰ تن کشت می‌شود (Ain et al., 2023). بر اساس سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO)^۴، مراکز صنعتی فرآوری انار سالانه حدود ۱/۵ میلیون تن ضایعات با ارزش غذایی فوق العاده تولید می‌کنند و بخش‌های مختلف انار غیر از آریل جزء ضایعات کشاورزی محسوب می‌شود (Gholipour et al., 2024). با این حال، پوست انار در سال‌های اخیر به دلیل خواص مفید متعدد و کاربردهای بالقوه مورد توجه قرار گرفته است. پوست انار

¹ Encapsulation² Amphiphile³ Conjugated linoleic acid⁴ Food Agricultural Organization

غربال شد. ذرات با حدود ۱ میلی‌متر انتخاب شد (Tavakolipour *et al.*, 2017). جهت استخراج تانن از پوست انار از حلال آب و دستگاه اولتراسونیک (ZE 1031 DT, Heinrichstrabe, Germany) استفاده شد. نسبت نمونه به حلال روی ۱ به ۲۰ و دما برای روش فراصوت روی ۴۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. حدود ۳ گرم پودر پوست در بطری‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری جداگانه و ۶۰ میلی‌لیتر حلال به آن اضافه شد. بطری‌ها به مدت ۱ ساعت در حمام فراصوت قرار گرفتند. فیلتراسیون نمونه‌ها با کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ انجام شد و سانتریفوژ (HB320, Brea, USA) به مدت حدود ۱۰-۱۲ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. حلال تحت خلاء ۱۴۰ میلی‌بار و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک شدن تبخیر شد. عصاره‌ها در بطری‌های شیشه‌ای کهربایی رنگ جمع‌آوری شدند و در دمای ۴-۶ درجه سانتی‌گراد در یخچال قرار گرفتند (Rajha *et al.*, 2020).

خشک کردن ترکیبات زیست فعال استخراج شده - ترکیبات فعال زیستی پوست انار (به ویژه تانن) جدا شده، به روش غوطه‌وری در ۲۵۰ میلی‌لیتر در آب (به عنوان حلال قطبی) مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و به صورت دستی تکان داده شد. فرایند خشک کردن تکمیلی عصاره تغلیظ شده، ابتدا عصاره تغلیظ شده با ۲۵ درصد مالتودکسترین مخلوط شده و توسط دستگاه خشک کن انجمادی (VACO5, ZIRBUS, Germany) به ترتیب در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و فشار ۰/۱ مگا پاسگال خشک شد. سپس عصاره خشک شده در یک ظرف شیشه‌ای تیره رنگ دربندی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، تا شروع آزمایش‌های بعدی نگهداری شد (Mokhtarian *et al.*, 2014).

تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته ترکیبات زیست فعال انار - اسید لینولئیک کانژوگه - در این تحقیق کیتوزوم با استفاده از روش حرارتی تولید شد. ابتدا لسیتین سویای پودر شده در حلال اتانول (۱درصد

سرشار از ترکیبات فعال زیستی مانند پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌ها^۱ و کاتچین‌ها^۲)، تانن‌ها (لاگیتانین‌ها^۳ و مشتقات اسید الازیک^۴ پونیکالانین^۵، پونیکالین^۶، و پدونکولاژین^۷) و آنتی‌اکسیدان‌ها است که طیف گسترده‌ای از مزایای سلامتی مانند خواص ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی را ارائه می‌دهند (Siddiqui *et al.*, 2024). همچنین به دلیل تأثیر بالقوه آنها در درمان بیماری‌های قلبی، فشار خون، چاقی، دیابت و بهبود باروری در حیوانات گزارش شده است (Hoque *et al.*, 2024). باتوجه به اثرات سلامتی‌بخش تانن استخراجی از پوست انار و CLA، این مطالعه با هدف بهینه‌یابی تولید ریزکپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینولئیک کانژوگه) به روش سطح پاسخ^۸ انجام شد.

مواد و روش‌ها

- مواد اولیه

میوه انار تازه از باغی در استان ساوه (در شمال استان مرکزی بین عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۴۵ دقیقه) واریته Wonderful، اسید لینولئیک کانژوگه از شرکت HSF (چین) و مواد شیمیایی مورد نیاز تحقیق از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

- استخراج ترکیبات زیست فعال (بویژه تانن) از پوست انار

ابتدا پوست چرمی بیرونی و سایر ضایعات زیستی آن (مزوکارپ و غشای تقسیم کننده) از دانه‌ها (آریل‌ها) حذف شد. سپس ضایعات زیستی انار تازه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد آگیری شد و در خشک‌کن انجمادی (Operon- Korea) (۵۵ درجه سلسیوس، ۰/۱۵ میلی‌متر جیوه) به مدت ۴۸ ساعت خشک شد تا زمانیکه رطوبت اولیه آن از ۰/۵ ± ۶۹/۹۳ درصد بر مبنای وزن تر به میزان رطوبت ایمن تقریباً ۴/۷۶ بر مبنای وزن تر کاهش یافت (AOAC, 1998). پس از مرحله خشک کردن، محصول نهایی به کمک آسیاب آزمایشگاهی (LB20ES, Waring, USA) تا اندازه ذرات تا ۱ میلی‌متر پودر شد. پودر تولید شده از طریق الک مشبک فولادی زنگ نزن

¹ Anthocyanins ² Catechins ³ Lagitannins

⁴ Ellagic acid ⁵ Punicalagin ⁶ Punicalin
⁷ Pedoncolagin ⁸ Software for Response Surface Methodology (RSM)

- تعیین پتانسیل زتا برای کیتوزوم‌های ریزدرون پوشانی شده

به منظور بررسی اندازه ذرات و پتانسیل زتا از دستگاه پراکنش نور^۲ (Malvern Instruments, Zetasizer Nano, UK) استفاده شد. اندازه‌گیری اندازه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از یک زتاسایزر تجاری با لیزر He/Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) و زاویه پراکندگی ۹۰ درجه انجام شد. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لیپوزومی با محلول بافر به ۱۰ میلی‌لیتر رقیق شد تا از پدیده‌های پراکندگی متعدد جلوگیری شود. سپس نمونه رقیق شده به کووت پلی‌استایرن منتقل شد تا اندازه و توزیع اندازه ذرات توسط پراکندگی نور پویا (DLS) تعیین گردید (Tan *et al.*, 2016).

- ویژگی‌های کریستالی پراش اشعه ایکس^۳ این آزمون توسط دستگاه اشعه Xت جهت تأیید ترکیبات فعال زیستی، کیتوزان، لیپوزوم، کیتوزوم و برهمکنش بین کیتوزوم و ترکیبات فعال زیستی و تشکیل ریز کپسول، هریک به صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت (Meng *et al.*, 2021).

- تجزیه و تحلیل آماری در این مطالعه، از یک طرح باکس-بنکن (BBD) و به منظور بهینه‌یابی شرایط فرایند استخراج و تولید نانو کپسول از روش سطح پاسخ استفاده شد. بهینه‌یابی با استفاده از نرم افزار Design expert 13.0.5.0 X64 انجام شد.

یافته‌ها

- ارزیابی فرآیند تولید ریزکپسول کیتوزوم با سه شاخص اندازه ذرات، کارایی ریزدرون پوشانی و پتانسیل زتا فرآیند تولید ریزکپسول کیتوزوم با سه شاخص اندازه ذرات (PS)، کارایی ریزدرون پوشانی (EE) و پتانسیل زتا (ZP) (جدول ۲) ارزیابی شد.

وزنی/حجمی) حل شد. در مرحله‌ی بعد در تبخیر کننده‌ی چرخشی تحت خلاء (Flawil, B-480, Switzerland)، حلال حذف شد تا یک لایه نازک (تشکیل وزیکول چند لایه لیپیدی لیپوزوم) در ته بالن ایجاد شد. سپس بالن در دسیکاتور قرار داده شد تا باقی‌مانده حلال نیز جدا گردید. در ادامه با استفاده از هیتر مغناطیسی لایه لیپیدی تشکیل شده در بافر فسفات حاوی ترکیبات فعال زیستی و ppm ۱۴۰۰ اسید لینولئیک کانزوگه (مطابق طرح پیشنهادی بهینه‌یابی (جدول ۱)) حل گردید. تیمار فراصوت در دامنه‌های مختلف به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. در مرحله‌ی بعد، محلول کیتوزان به محلول قبلی به صورت قطره قطره (با استفاده از پمپ سرنگی و تزریق با سرعت بسیار کم) افزوده شد. پس از تهیه ریز کپسول کیتوزوم حاوی ترکیبات فعال زیستی (به عنوان مواد هسته‌ای)، کیتوزوم بهینه از نظر ذرات (کمینه)، راندمان ریزدرون پوشانی (بیشینه) و پتانسیل زتا (بیشینه) انتخاب شدند (Seyedabadi *et al.*, 2021).

- ارزیابی کیفی ریز کپسول کیتوزوم بهینه تعیین کارایی ریزدرون پوشانی کیتوزوم‌ها

برای به دست آوردن راندمان ریزدرون پوشانی (% EE) و ظرفیت بارگذاری مقدار اسید لینولئیک آزاد از اسید لینولئیک ریزدرون پوشانی شده با استفاده از روش اولترافیلتراسیون (فیلتر اولتراسانتریفوژ آمیکون^۱ - وزن مولکولی اسمی ۳۰۰۰۰ Da) با سانتریفوژ جدا شد. نانوحامل‌ها با ۵۰ درصد اتانول وزنی بر وزن (به نسبت ۱:۶) مخلوط شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب $2000 \times g$ سانتریفوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری و با اتانول ۵۰ درصد وزنی/وزنی رقیق شدند و جذب آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در طول موج ۲۳۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کارایی ریزدرون پوشانی از رابط زیر محاسبه و گزارش شد (Hashemi *et al.*, 2020):

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Total CLA} - \text{Free CLA}}{\text{Total CLA}} \times 100 \quad (۱)$$

¹ Molecular Weight Cut-Off (MWCO)

² Dynamic Light Scattering (DLS)

³ X-Ray Diffraction Analysis (XRD)

جدول ۱- تعداد تیمارهای پیشنهادی برای بهینه‌سازی فرآیند تولید بر روی کپسول‌های کیتوزوم

Table 1-Proposed treatments to optimize the production process on chitosome capsules

Treatment	Independent variables			Response		
	Bioactive concentration (ppm)	Chitosan Concentration (% w/v)	Ultrasound wave (%)	Zeta potential (mV)	DLS (nm)	Encapsulation efficiency (%)
1	100	0.1	70			
2	100	0.2	50			
3	100	0.2	90			
4	100	0.3	70			
5	200	0.1	50			
6	200	0.1	90			
7	200	0.2	70			
8	200	0.2	70			
9	200	0.2	70			
10	200	0.3	50			
11	200	0.3	90			
12	300	0.1	70			
13	300	0.2	50			
14	300	0.2	90			
15	300	0.3	70			

جدول ۲- تیمارهای اصلی و مقادیر کپسولاسیون (PS، EE و ZP) مورد استفاده در بهینه‌سازی فرآیند تولید میکروکپسول کیتوزوم

Table 2- The main treatments and encapsulation values (PS, EE and ZP) used in the optimization of the chitosome microcapsule production process

Runs	Independent variable (* ₁)			Dependent variable (* ₁)		
	X ₁ (ppm)	X ₂ (%)	X ₃ (%w/v)	Y ₁ (nm)	Y ₂ (%)	Y ₃ (mV)
1	300	90	0.2	38.83	65.78	27.12
2	200	50	0.1	37.68	73.71	30.9
3	300	70	0.1	34.37	48.23	26.42
4	200	50	0.3	28.42	78.18	22.4
5	100	70	0.3	36.08	64.63	25.82
6	200	70	0.2	28.91	82.25	36.5
7	200	70	0.2	29.41	80.35	35.34
8	200	70	0.2	27.21	79.29	34.64
9	100	50	0.2	26.63	73.94	28.92
10	100	70	0.1	21.74	74.33	31.17
11	300	50	0.2	20.43	61.38	23.47
12	100	90	0.2	22.31	76.82	25.67
13	200	90	0.3	21.83	84.96	32.9
14	200	90	0.1	21.28	83.76	33.1
15	300	70	0.3	20.18	49.62	24.22

(1*) پارامترهای x₁، x₂ و x₃ به ترتیب با متغیرهای مستقل غلظت ترکیبات فعال زیستی، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان مرتبط هستند. همچنین نمادهای Y₁، Y₂ و Y₃ به ترتیب نمایانگر شاخص اندازه ذرات (PS)، راندمان ریزدرون پوشانی (EE) و پتانسیل زتا (ZP) هستند.

(1*) The parameters x₁, x₂ and x₃ are related to the independent variables of the concentration of bioactive compounds, the amplitude of ultrasound waves and the concentration of chitosan, respectively. Also, the symbols Y₁, Y₂ and Y₃ represent the particle size index (PS), microencapsulation efficiency (EE) and zeta potential (ZP), respectively.

رگرسیون (βx_n) روند چند جمله‌ای، دامنه امواج فرا صوت (βx₁ = -6.24792 و Fx₁ = 67.05) مهمترین فاکتور موثر بر اندازه ذرات در فرآیند تولید ریزکپسول کیتوزوم بود. ضرایب مدل رگرسیون چند جمله‌ای توصیه شده برای این

نتایج بهینه‌یابی فرآیند تولید ریزکپسول کیتوزوم
- اثر غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر اندازه ذرات
با توجه به نتایج ANOVA (جدول ۳)، مقادیر F و ضرایب

بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته ترکیبات زیست فعال انار و اسید لینولئیک کانزوگه

ضرایب مدل رگرسیون چند جمله‌ای توصیه شده برای این پارامتر (برای داده‌های واقعی) در جدول (۴) گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، ضریب تعیین برای این مدل بالا بود ($R^2 = 0.9581$) که نشان دهنده اعتبار بالای مقدار کارائی ریزدرون پوشانی برای پارامترهای عملیاتی (زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان) بود. مدل رگرسیون چند جمله‌ای پیشنهادی نشان داد که اثر خطی غلظت ترکیبات زیست فعال (x_1)، درجه دوم (x_1^2) و x_3^2 دارای اثرات مثبت معنی‌داری ($p < 0.01$) بر کارائی ریزدرون پوشانی (EE) ریزکپسول‌های کیتوزوم است. علاوه بر این، نتایج ANOVA بیشتر نشان داد که غلظت ترکیبات زیست فعال، با بالاترین مقدار $F (33/27)$ ، بیشترین تأثیر را بر کارائی ریزدرون پوشانی (EE) ریزکپسول‌های کیتوزوم داشت.

پارامتر (برای داده‌های واقعی) در جدول (۳) گزارش شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، ضریب تعیین برای این مدل بالا بود ($R^2 = 0.9555$) که نشان دهنده اعتبار بالای مقدار اندازه ذرات برای پارامترهای عملیاتی (غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان) بود.

شکل ۱ (A-C) روند تغییر اندازه ذرات (PS) را برای ریزکپسول‌های کیتوزوم تحت تأثیر متغیرهای مستقل غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان نشان می‌دهد.

– اثر غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر کارائی ریزدرون پوشانی

جدول ۳- نتایج ANOVA برای بهینه‌سازی اندازه ذرات (PS) میکروکپسول‌های کیتوزوم با استفاده از تابع رگرسیون درجه دوم
Table 3. ANOVA results for particle size optimization (PS) of chitosome microcapsules using quadratic regression function

Source (* ₁)	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	p-value (* ₂)	Coefficients of regression function (β_n)
Model	11823.32	9	1313.70	11.93	0.0069**	+420.70833
x_1	561.13	1	561.13	5.10	0.0736 ^{n.s}	-0.079583
x_2	7381.13	1	7381.13	67.05	0.0004**	-6.24792
x_3	578.00	1	578.00	5.25	0.0705 ^{n.s}	-24.58333
x_1x_2	900.00	1	900.00	8.18	0.0354*	-0.007500
x_1x_3	342.25	1	342.25	3.11	0.1381 ^{n.s}	+0.925000
x_2x_3	156.25	1	156.25	1.42	0.2870 ^{n.s}	-3.12500
x_1^2	584.64	1	584.64	5.31	0.0694 ^{n.s}	+0.001258
x_2^2	1416.03	1	1416.03	12.86	0.0158*	+0.048958
x_3^2	1.64	1	1.64	0.0149	0.9076 ^{n.s}	-66.66667
Residual	550.42	5	110.08	–	–	–
Lack of fit (LOF)	531.75	3	177.25	18.99	0.0504 ^{n.s}	–
Pure error	18.67	2	9.33	–	–	–
Total error	12373.73	14	–	–	–	–
R^2	–	–	–	–	–	0.9555
R^2_{Adj}	–	–	–	–	–	0.8754
SD	–	–	–	–	–	10.49

(1*) پارامترهای x_1 ، x_2 و x_3 به ترتیب با متغیرهای مستقل غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان مرتبط هستند.
(2*) حروف بالای مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌داری (* و **) برای $p < 0.01$ و $p < 0.05$ ، به ترتیب بین تیمارها است. همچنین علامت [n.s.] نشان دهنده تفاوت‌های ناچیز بین تیمارها است.

(1*) The parameters x_1 , x_2 and x_3 are related to the independent variables of the concentration of bioactive compounds, the amplitude of ultrasound waves and the concentration of chitosan, respectively.

(2*) Different superscript letters in each column indicate significant differences (* and **) for $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively between treatments. Also, the symbol [n.s.] indicates insignificant differences between treatments.

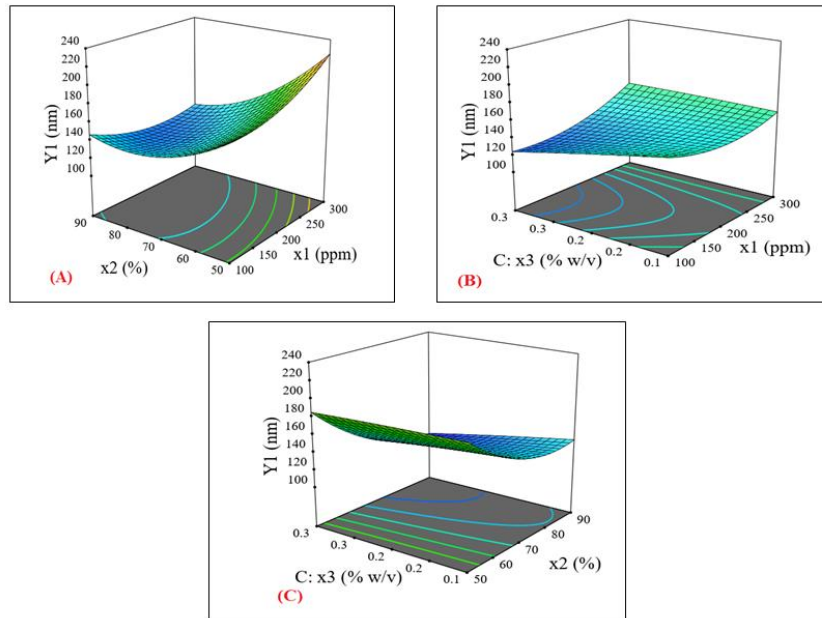


Fig. 1. Three-dimensional effects of the concentration of bioactive compounds (X1), the amplitude of ultrasound waves (X2) and the concentration of chitosan (X3) on the particle size (Y1) of chitosome microcapsules. شکل ۱- اثرات سه بعدی غلظت ترکیبات زیست فعال (X1)، دامنه امواج فراصوت (X2) و غلظت کیتوزان (X3) بر اندازه ذرات (Y1) میکروکپسول‌های کیتوزوم

جدول ۴- نتایج ANOVA برای بهینه‌سازی راندمان ریزدرون پوشانی (EE) میکروکپسول‌های کیتوزوم با استفاده از تابع رگرسیون درجه دوم

Table 4- ANOVA results for optimizing microencapsulation efficiency (EE) of chitosome microcapsules using quadratic regression function

Source (* ₁)	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	p-value (* ₂)	Coefficients of regression function (β_n)
Model	1800.24	9	200.03	12.71	0.0060**	+69.24463
x_1	523.54	1	523.54	33.27	0.0022**	+0.492328
x_2	72.72	1	72.72	4.62	0.0843 ^{n.s}	-1.52004
x_3	0.8725	1	0.8725	0.0554	0.8232 ^{n.s}	+184.97475
x_1x_2	0.5730	1	0.5730	0.0364	0.8562 ^{n.s}	+0.000189
x_1x_3	30.77	1	30.77	1.96	0.2209 ^{n.s}	+0.277360
x_2x_3	2.68	1	2.68	0.1702	0.6971 ^{n.s}	-0.409088
x_1^2	950.98	1	950.98	60.43	0.0006**	-0.001605
x_2^2	88.63	1	88.63	5.63	0.0637 ^{n.s}	+0.012248
x_3^2	106.79	1	106.79	6.79	0.0480*	-537.78250
Residual	78.68	5	15.74	-	-	-
Lack of fit (LOF)	74.18	3	24.73	10.99	0.0845 ^{n.s}	-
Pure error	4.50	2	2.25	-	-	-
Total error	1878.92	14	-	-	-	-
R^2	-	-	-	-	-	0.9581
R^2_{Adj}	-	-	-	-	-	0.8828
SD	-	-	-	-	-	3.97

(1*) پارامترهای x_1 ، x_2 و x_3 به ترتیب با متغیرهای مستقل غلظت ترکیبات فعال زیستی، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان مرتبط هستند. (2*) حروف بالای مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌داری [*] و [**] برای $p < 0.05$ و $p < 0.01$ (به ترتیب) بین تیمارها است. همچنین علامت [n.s.] نشان دهنده تفاوت‌های ناچیز بین تیمارها است.

(1*) The parameters x_1 , x_2 and x_3 are related to the independent variables of the concentration of bioactive compounds, the amplitude of ultrasound waves and the concentration of chitosan, respectively.

(2*) Different superscript letters in each column indicate significant differences [*] and [**] for $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) between treatments. Also, the symbol [n.s.] indicates insignificant differences between treatments.

بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته ترکیبات زیست فعال انار و اسید لینولئیک کانزوگه

مقدار F (ضرایب رگرسیون روند چند جمله‌ای x_3 یا βx_3) $7/66$ ($-7/57.83$)، بیشترین تأثیر را بر پتانسیل زتا (ZP) ریز کپسول‌های کیتوزوم داشت.

شکل ۳ (A-C) نمودار سه بعدی تغییرات پتانسیل زتا را برای ریز کپسول‌های کیتوزوم تحت تأثیر متغیرهای ذکر شده را نشان می‌دهد. تمامی نانوکیتوزوم‌ها بار مثبت داشتند. نقطه بهینه بر اساس RSM به شرح زیر بود و برای تحلیل XRD برقرار شد.

ویژگی‌های کریستالی XRD کیتوزوم بهینه یکی دیگر از روش‌های شناسایی نمونه‌های تولید شده آزمون XRD می‌باشد. الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه کیتوزان در شکل ۴ نشان داده شده است.

شکل ۲ (A-C) نمودار سه بعدی تغییرات مقدار کارائی ریزدرون پوشانی را تحت تأثیر متغیرهای ذکر شده نشان می‌دهد. در فرآیند کپسوله‌سازی اولتراسونیک، یعنی امولسیون‌سازی، کاویتاسیون معمولاً در فرکانس‌های حدود ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز اتفاق می‌افتد.

– غلظت ترکیبات زیست‌فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر پتانسیل زتا

مدل رگرسیون چند جمله‌ای پیشنهادی نشان داد که اثر خطی غلظت کیتوزان (x_3)، درجه دوم (x_2 و x_1) دارای اثرات مثبت معنی‌داری ($p < 0.01$) بر پتانسیل زتا (ZP) ریز کپسول‌های کیتوزوم است. علاوه بر این، نتایج ANOVA بیشتر نشان داد که غلظت کیتوزان، با بالاترین

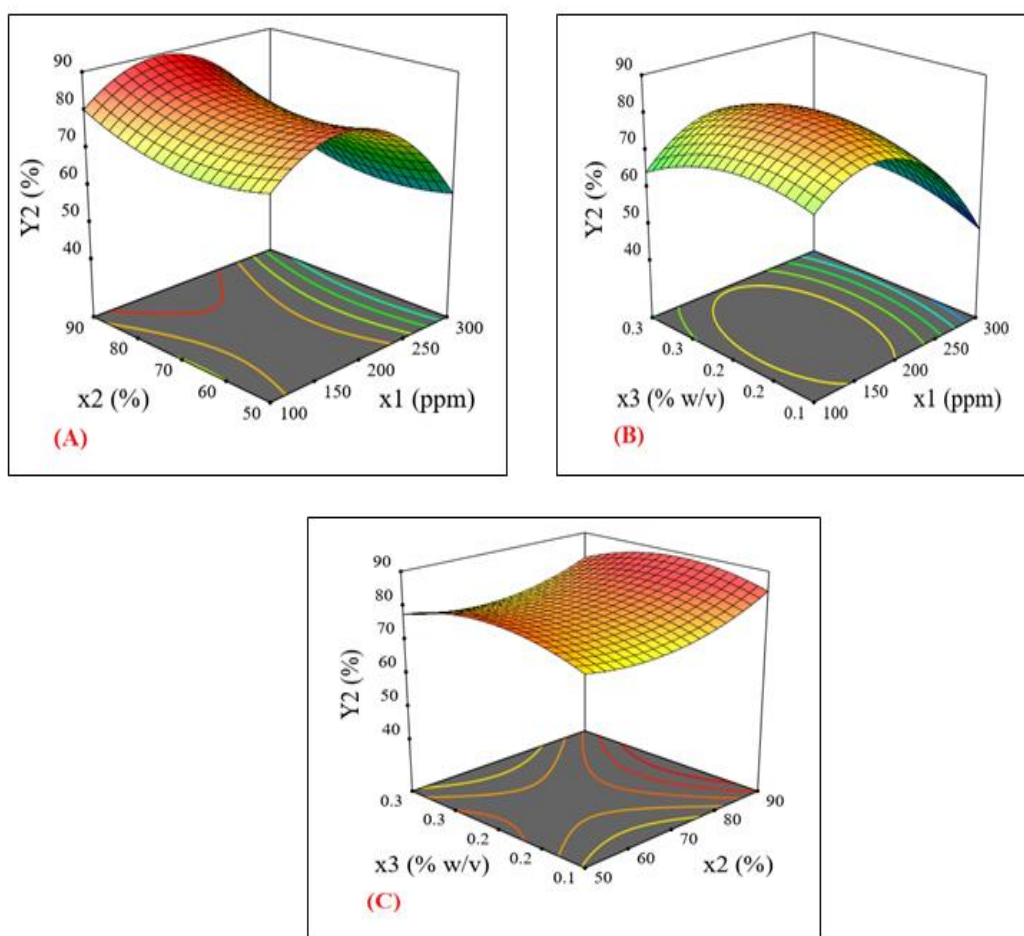


Fig. 2. The three-dimensional effects of the concentration of bioactive compounds (X1), the amplitude of ultrasound waves (X2) and the concentration of chitosan (X3) on the microencapsulation efficiency (Y2) of chitosome microcapsules.

شکل ۲- اثرات سه بعدی غلظت ترکیبات زیستی (X_1)، دامنه امواج فراصوت (X_2) و غلظت کیتوزان (X_3) بر راندمان ریزدرون پوشانی (Y_2) میکروکپسول‌های کیتوزوم

جدول ۵- نتایج ANOVA برای بهینه سازی پتانسیل زتا (ZP) میکروکپسول‌های کیتوزوم با استفاده از تابع رگرسیون درجه دوم

Table 5- ANOVA results for optimizing zeta potential (ZP) of chitosome microcapsules using quadratic regression function

Source ([*] ₁)	Sum of squares	Degree of freedom	Mean squares	F-value	p-value ([*] ₂)	Coefficients of regression function (β_n)
Model	274.59	9	30.51	7.08	0.0221 [*]	-6.65135
x_1	13.39	1	13.39	3.11	0.1381 ^{n.s}	+0.153254
x_2	21.45	1	21.45	4.98	0.0760 ^{n.s}	+0.801021
x_3	33.01	1	33.01	7.66	0.0394 [*]	-7.57083
x_1x_2	11.90	1	11.90	2.76	0.1573 ^{n.s}	+0.000863
x_1x_3	2.48	1	2.48	0.5760	0.4821 ^{n.s}	+0.078750
x_2x_3	17.22	1	17.22	4.00	0.1020 ^{n.s}	+1.03750
x_1^2	135.50	1	135.50	31.47	0.0025 ^{**}	-0.000606
x_2^2	36.41	1	36.41	8.46	0.0335 [*]	-0.007851
x_3^2	23.60	1	23.60	5.48	0.0663 ^{n.s}	-252.79167
Residual	21.53	5	4.31	—	—	—
Lack of fit (LOF)	19.77	3	6.59	7.47	0.1204 ^{n.s}	—
Pure error	1.77	2	0.8825	—	—	—
Total error	296.12	14	—	—	—	—
R ²	—	—	—	—	—	0.9273
R ² _{Adj}	—	—	—	—	—	0.7964
SD	—	—	—	—	—	2.08

(1*) پارامترهای x_1 ، x_2 و x_3 به ترتیب با متغیرهای مستقل غلظت ترکیبات فعال زیستی، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان مرتبط هستند.
 (2*) حروف بالای مختلف در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌داری ([*] و [**] برای $p < 0.05$ و $p < 0.01$ ، به ترتیب) بین تیمارها است. همچنین علامت [n.s.] نشان دهنده تفاوت‌های ناچیز بین تیمارها است.

(1*) The parameters x_1 , x_2 and x_3 are related to the independent variables of the concentration of bioactive compounds, the amplitude of ultrasound waves and the concentration of chitosan, respectively.

(2*) Different superscript letters in each column indicate significant differences ([*] and [**] for $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) between treatments. Also, the symbol [n.s.] indicates insignificant differences between treatments.

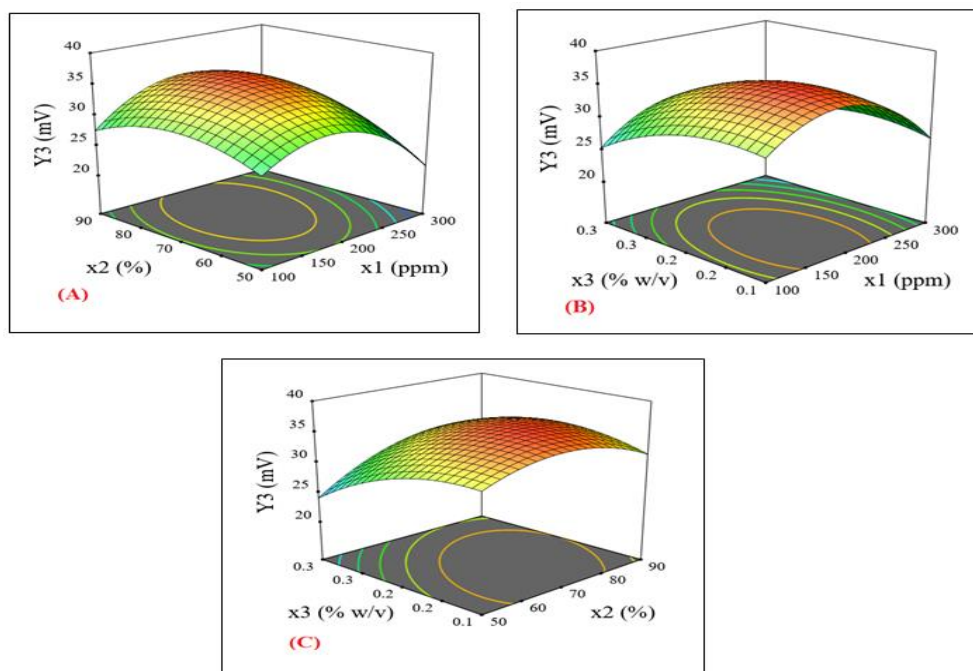


Fig. 3. The three-dimensional effects of the concentration of bioactive compounds (X1), the amplitude of ultrasound waves (X2) and the concentration of chitosan (X3) on the zeta potential (Y3) of chitosome microcapsules.

شکل ۳- اثرات سه بعدی غلظت ترکیبات فعال زیستی (x_1)، دامنه امواج فراصوت (x_2) و غلظت کیتوزان (x_3) بر پتانسیل زتا (y_3) میکروکپسول‌های کیتوزوم

جدول ۶- نقطه بهینه بر اساس روش سطح پاسخ (RSM)

Table 6- Optimum point based on RSM

Number	Core Conc. (CLA+PPE)	US Amplitude	Chitosan Conc.	Particle size	Encapsulation	Zeta potential	Desirability	
1	258	90	0.3	126.256	84.9982	37.7043	0.929	selected

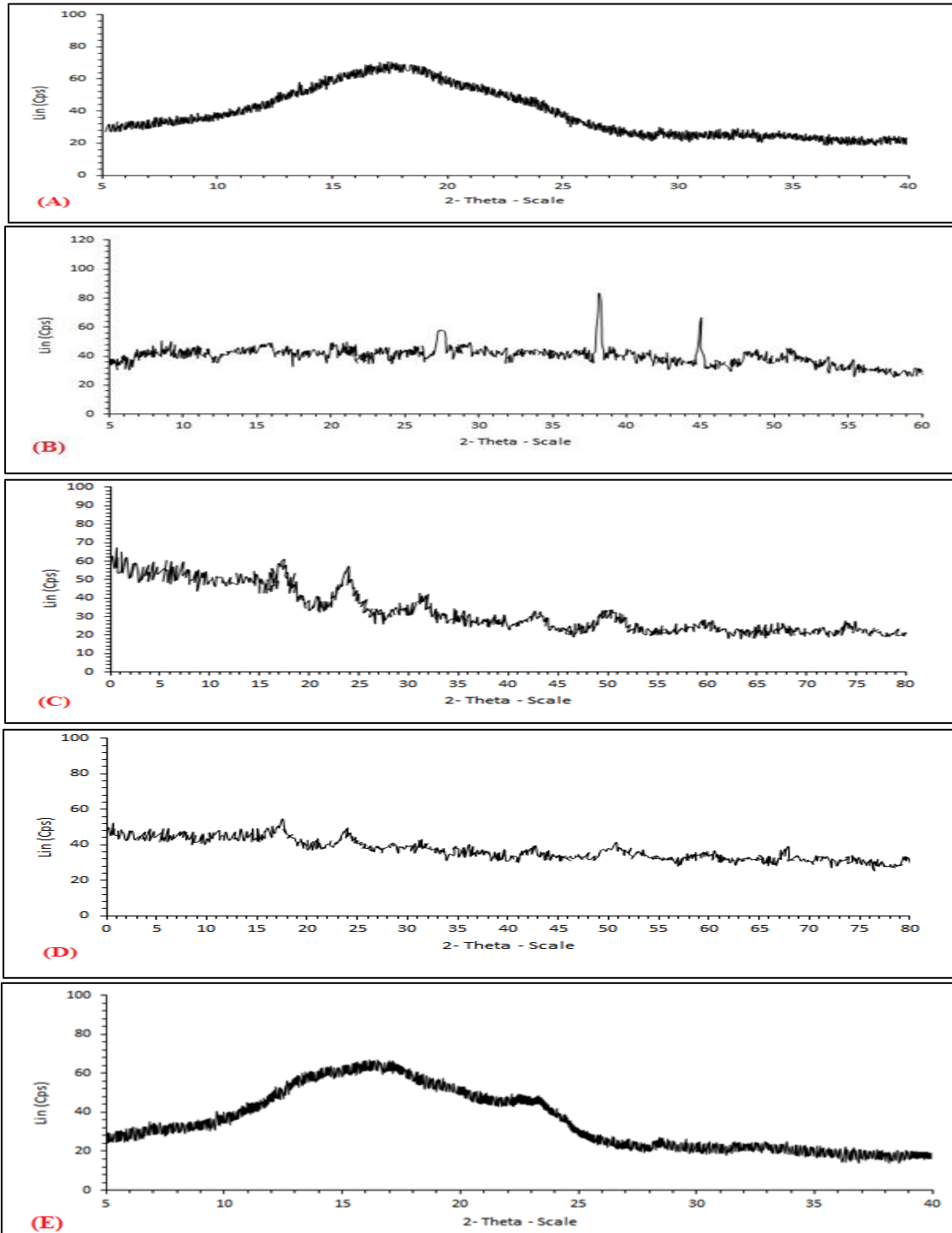


Fig. 4. XRD crystal features (A): chitosan sample/ (B): pomegranate sample/ (C): linoleic acid/ (D): pomegranate bioactive compounds/ (E): optimized chitosome

شکل ۴- ویژگی‌های کریستال XRD (A): نمونه کیتوزان / (B): نمونه انار / (C): اسید لینولئیک / (D): ترکیبات زیست فعال انار / (E): کیتوزوم بهینه

پوست پرتقال (Hosseini *et al.*, 2019) گزارش شده است.

اثر غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر اندازه ذرات

با توجه به نتایج ANOVA (جدول ۳)، مقادیر F و ضرایب رگرسیون (β_{x1}) روند چند جمله‌ای، دامنه امواج فراصوت موثر بر اندازه ذرات در فرآیند تولید ریزکپسول کیتوزوم بود. ضریب تعیین برای این مدل بالا ($R^2 = 0.9555$) نشان دهنده اعتبار بالای مقدار اندازه ذرات برای پارامترهای عملیاتی (غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان) بود. بر اساس یافته‌ها، غلظت تانن کل عصاره زیستی انار خشک شده با انجماد با افزایش تمام پارامترهای عملیاتی ذکر شده در محدوده تعریف شده ($100 < x_1(\text{ppm}) < 300$, $0.1 < x_2(\%) < 0.3$ & $50 < x_3(\%) < 90$) روند صعودی داشته است (شکل 1 A-C). برای استخراج به کمک اولتراسونیک، فرکانس پایین اولتراسوند با شدت بالا منجر به نیروی برشی و مکانیکی قوی می‌شود که برای استخراج مطلوب است (Kumar *et al.*, 2021). فرکانس پایین ثابت به دلیل تشکیل حباب‌های حفره‌ای کمتر با قطر نسبتاً بزرگ‌تر ترجیح داده می‌شود که در مقایسه با فرکانس فراصوت بالاتر، اثر حفره‌ای بزرگ‌تری ایجاد می‌کند (Leong *et al.*, 2011). حباب‌های کاویتاسیون با اندازه بزرگ یک رویداد مطلوب در طول استخراج اولتراسونیک هستند که به مدت زمان چرخه فشرده‌سازی و رقیق شدن بستگی دارد. اگر این چرخه خیلی کوتاه باشد، حباب‌هایی با قطر کمتر تولید می‌شوند که منجر به بازده استخراج ضعیف می‌شود. فرکانس اولتراسونیک و مدت چرخه رابطه معکوس با یکدیگر دارند، که نشان می‌دهد که در فرکانس بالاتر، حباب‌های حفره‌ای زمان بسیار کمتری خواهند داشت. برای رشد، مانع از اثر ترکیدن آن‌ها و افزایش تعداد آن‌ها می‌شود که در نهایت منجر به مقاومت بیشتر در برابر انتقال جرم می‌شود (Mason *et al.*, 2011). مطالعات مشابه این تحقیق در سه محدوده فرکانس متفاوت، ۴۰، ۴۰ و ۱۲۰ کیلوهرتز برای استخراج فنل از تفاله انگور (Cravotto *et al.*, 2008) استخراج پکتین از پوست انار (Moorthy *et al.*, 2015)، پوست انبه (Guandalini *et al.*, 2019) و

اثر غلظت ترکیبات زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر کارایی ریزدرون پوشانی

ضریب تعیین بالای این مدل ($R^2 = 0.9581$) که نشان دهنده اعتبار بالای مقدار کارایی ریزدرون پوشانی برای پارامترهای عملیاتی (زیست فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان) بود (جدول ۴). مطابق نتایج، غلظت ترکیبات زیست فعال، با بالاترین مقدار F (۳۳/۲۷)، بیشترین تأثیر را بر کارایی ریزدرون پوشانی (EE) ریزکپسول‌های کیتوزوم داشت. همچنین نتایج نشان داد طی فرآیند ریزدرون پوشانی به کمک امواج فراصوت، کاویتاسیون معمولاً در فرکانس‌های حدود ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز اتفاق می‌افتد. توانایی اصلی اولتراسوند برای امولسیون تا حد زیادی به فرکانس استفاده شده بستگی دارد. هنگامیکه فرکانس افزایش می‌یابد، انرژی بیشتری برای توسعه امولسیون استفاده می‌شود (Carmagnani *et al.*, 2020). قدرت فراصوت عامل مهم دیگری است که کارایی فرآیند کپسولاسیون را تعیین می‌کند. توان اولتراسونیک اساساً خروجی ژنراتور اولتراسوند است و توانایی تعامل با مواد و تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی آن را عمدتاً از طریق فرآیند کاویتاسیون تعریف می‌کند. برای امولسیون‌سازی و محصورسازی به کمک اولتراسوند از طریق نانوامولسیون‌ها، قدرت اولتراسونیک همراه با زمان کاربرد نقش حیاتی ایفا می‌کند. به منظور دستیابی به قطرات با حداقل اندازه در کوتاه‌ترین زمان ممکن، بهینه‌سازی توان فراصوت ضروری است. افزایش توان فراصوت منجر به کاهش زمان فراصوت می‌شود تا زمانی که اثر نهایی مشخص شود، اما فراتر از یک حد معین، ادغام می‌تواند ایجاد شود و از این رو افزایش قدرت، کارایی فرآیند را نشان نمی‌دهد. مقادیر توان برای مقیاس‌های کوچک (مقیاس‌های آزمایشگاهی یا آزمایشی) معمولاً از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ وات متغیر است. همچنین ثابت نگه داشتن انرژی کل سیستم که برای محصور کردن فعال‌های زیستی بدون کاهش قابل توجه در پتانسیل فعالیت است، ضروری است (Mamvura *et al.*, 2018). این

در شکل 4B الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه انار نشان داده شده است. مطابق شکل، سه پیک در این نمونه در زوایای $27/5^\circ$ ، $38/1^\circ$ و 45° قرار گرفته‌اند که الگوهای پراش مشابهی برای انار در پژوهش‌های دیگری نیز برای این ماده مشاهده شده است (Hashem *et al.*, 2023; Hemalatha and Brinda Lakshmi, 2021). این ساختار مشابه الگوهای پراش ساختار کریستالی مکعبی با گروه فضایی Fm-3m بوده و این پیک‌ها به ترتیب مربوط به صفحات کریستالی (0۰۲)، (۰۲۲) و (۱۱۳) بوده و ثابت شبکه برای این ساختار حدود $6/656$ آنگستروم بدست آمده است. برای یافتن اندازه بلورک از رابطه شرر (رابطه ۲) استفاده شده است (Hajipour *et al.*, 2021).

$$D = K\lambda / (FWHM) \times \cos(\theta) \quad \text{رابطه (۲)}$$

که در آن رابطه D اندازه بلورک، K فاکتور شکل، λ طول موج پرتو ایکس مورد استفاده ($1/5$ آنگستروم)، FWHM پهناى باند در نصف ارتفاع و θ محل وقوع پیک است. با داشتن مقدار $\cos(\theta)$ و FWHM و همچنین مقادیر ثابت λ ($1/54$ آنگستروم) و k ($0/9$) مقدار اندازه بلورک طبق رابطه شرر بدست می‌آید که با توجه به اینکه λ بر حسب آنگستروم بود این مقدار نیز بر حسب آنگستروم می‌باشد. با تقسیم مقدار بدست آمده بر 10 اندازه بلورک بر حسب نانومتر محاسبه می‌شود. این پارامتر برای فاز مورد بررسی برابر با $28/9$ nm بدست آمده است. در شکل 4C و 4D به ترتیب الگوهای پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه‌های CLA و زیست فعال انار نشان داده شده است. مطابق شکل 4D پیک‌هایی در نمونه CLA در زوایای $17/4^\circ$ ، $23/8^\circ$ ، $31/4^\circ$ ، $42/8^\circ$ ، $50/2^\circ$ ، 60° و $74/1^\circ$ قرار گرفته‌اند. این ساختار مشابه الگوهای پراش ساختار کریستالی شش وجهی با گروه فضایی R-3 بوده و این پیک‌ها به ترتیب مربوط به صفحات کریستالی (۰۰۳)، (۰۱۲)، (۱۰۴)، (۱۱۳)، (۰۱۸)، (۳۲۲) و (۲۱۷) بوده و ثابت‌های شبکه برای این ساختار حدود $47/82$ و $15/697$ آنگستروم بدست آمده است. مشخص است که در الگوی پراش مربوط به نمونه زیست فعال انار هم تقریباً در همین زوایا پیک پراش مشاهده شده است. در این نمونه پیک‌های پراش پیش گفته در زوایای $3/17^\circ$ ، 34° ، $31/2^\circ$ ، $42/1^\circ$ ، $50/8^\circ$ و $73/9^\circ$ قرار گرفته‌اند. این شباهت بین

نتیجه توسط Pulicharla و همکاران (۲۰۱۶) گزارش شد بود این محققان طی کپسوله کردن ترکیبات فنولی از توت فرنگی را با استفاده از کیتوزان مقدار کرائی ریزدرون پوشانی را $58/48 - 42/35$ درصد گزارش کردند. Medina-Torres و همکاران (۲۰۱۹) نیز کرائی نانوکیتوزوم‌های حاوی ترکیبات زیست فعال لیموی ایرانی استخراج شده تحت امواج فراصوت را $81/16$ درصد گزارش کردند. Zuanon و همکاران (۲۰۱۷) به این نتیجه رسید که امواج فراصوت با شدت بالا منجر به تولید میکروکپسول‌هایی می‌شود که کورکومین را در خود محصور می‌کنند و توانایی عملکرد بهتری به عنوان مکمل غذایی یا رنگ‌های غذایی دارند.

– غلظت ترکیبات زیست‌فعال، دامنه امواج فراصوت و غلظت کیتوزان بر پتانسیل زتا

مدل رگرسیون چند جمله‌ای پیشنهادی نشان داد که غلظت کیتوزان، با بالاترین مقدار F (ضرایب رگرسیون روند چند جمله‌ای $x3$ یا $\beta x3$) $7/66$ ($7/57 \cdot 83$)، بیشترین تأثیر را بر پتانسیل زتا (ZP) ریز کپسول‌های کیتوزوم داشت (جدول ۵). همانطور که در شکل ۳ (A-C) نشان داده شده است تمامی نانوکیتوزوم‌ها بار مثبت داشتند. که می‌تواند به دلیل گروه پروتئین در کیتوزان باشد در این راستا، Zhang و همکاران (۲۰۱۵) اشاره می‌کنند به دلیل کاهش چگالی الکترون‌های کیتوزان (بار مثبت) پس از افزودن عصاره ترکیبات فنلی (بار منفی) تشکیل شود. سپس، افزایشی در تغییر مکان الکترون ایجاد می‌شود که تجمع ذرات را به حداقل می‌رساند و اندازه کمپلکس را کاهش می‌دهد.

– ویژگی‌های کریستالی XRD کیتوزوم بهینه
بر اساس نتایج بدست آمده نقطه بهینه برای کیتوزوم‌های تانن-اسیدلینولئیک کانژوگه بر اساس جدول ۶ برقرار شد. مطابق شکل 4A در الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه کیتوزان یک پیک بسیار پهن با ماکزیمم در زوایای کمتر از 20 درجه قابل مشاهده است که چنین الگوی پراشی برای کیتوزان در مطالعات دیگری نیز مشاهده شده است (Xu *et al.*, 2021) و مربوط به ساختار آمورف (غیر کریستالی) این ماده می‌باشد (Ciolacu *et al.*, 2011).

Ain, H. B. U., Tufail, T., Bashir, S., Ijaz, N., Hussain, M., Ikram, A. & Saewan, S. A. (2023). Nutritional importance and industrial uses of pomegranate peel: A critical review. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2589-2598. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3320>

Badawy, S., Liu, Y., Guo, M., Liu, Z., Xie, C., Marawan, M. A. & Martínez, M. A. (2023). Conjugated linoleic acid (CLA) as a functional food: Is it beneficial or not?. *Food Research International*, 113158. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113158>

Carmagnani, H.J., Mansano, G.B. & Sobreira, F., (2020). Optimization of the extraction process of *Phyllanthus niruri* L. *Ultrasound*, 21, p.X22.

Carvalho Filho, J. M. (2014). Pomegranate seed oil (*Punica granatum* L.): a source of punicic acid (conjugated α -linolenic acid). *J Human Nutri Food Sci*, 2(1), 1-11.

Ciolacu, D., Ciolacu, F. & Popa, V. I. (2011). Amorphous cellulose—structure and characterization. *Cellulose chemistry and technology*, 45(1), 13.

Du, M., Jin, J., Wu, G., Jin, Q. & Wang, X. (2023). Metabolic, structure-activity characteristics of conjugated linolenic acids and their mediated health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2198006>

Dutta, S., Moses, J. A. & Anandharamakrishnan, C. (2023). Vesicular delivery systems: applications and future trends in food technology. In *Liposomal Encapsulation in Food Science and Technology* (pp. 15-38). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823935-3.00006-0>

Gholipour, A., Sadegheih, A., Mostafaeipour, A. & Fakhrzad, M. B. (2024). Designing an optimal multi-objective model for a sustainable closed-loop supply chain: a case study of pomegranate in Iran. *Environment, Development and Sustainability*, 26(2), 3993-4027. <https://doi.org/10.1007/s10668-022-02868-5>

Guandalini, B. B. V., Rodrigues, N. P. & Marczak, L. D. F. (2019). Sequential extraction of phenolics and pectin from mango peel assisted by ultrasound. *Food Research International*, 119, 455-461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.011>

Hajipour, F., Asad, S., Amoozegar, M. A., Javidparvar, A. A., Tang, J., Zhong, H. &

الگوهای پراش برای این دو نمونه بیانگر ساختار کریستالی یکسان آن‌ها و به عبارت دیگر تاییدی بر استخراج موفقیت آمیز CLA از انار است. مقادیر اندازه برای نمونه‌های CLA و زیست فعال انار نیز به ترتیب برابر با ۴/۳ و ۴/۱ نانومتر بدست آمده است که بسیار نزدیک به یکدیگر است و این اختلاف قابل اغماض می‌باشد.

الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه کیتوزوم (شکل 4e)، در الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به نمونه کیتوزوم، شبیه به الگوی پراش مربوط به کیتوزان، یک پیک بسیار پهن با قله‌ای در حدود ۱۷ درجه قابل مشاهده است که چنین الگوی پراشی همانگونه که قبلاً عنوان شد مربوط به ساختار آمورف (غیر کریستالی) این ماده می‌باشد (Ciolacu *et al.*, 2011). همچنین مطابق این الگوی پراش، یک شانه در زاویه حدود ۲۳ درجه نیز قابل مشاهده است که این پیک در الگوی پراش مربوط به CLA نیز مشاهده شده بود و می‌تواند مربوط به این ماده باشد. بنابراین با توجه به نتایج XRD، تشکیل موفقیت آمیز پیوند بین کیتوزان و زیست‌های فعال قابل استخراج از انار (همانند CLA) قابل اثبات است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، هر کیتوزوم‌های بارگذاری شده با تانن پوشش انار و اسید لینولئیک کانژوگه با موفقیت سنتز شدند تا پایداری را بهبود بخشند. نتایج بهینه‌یابی تولید ریز کپسول کیتوزوم حاوی هسته‌های زیست فعال (تانن - اسید لینولئیک کانژوگه) توسط روش سطح پاسخ (RSM) نشان داد نقطه بهینه نسبت هسته (اسید لینولئیک کنژوگه + تانن هسته انار)، دامنه اولتراسوند ۹۰ kHz و غلظت کیتوزان ۰/۳ درصد، نانوکیتوزوم‌ها اندازه ذرات nm ۱۲۶/۲۵۶، کارایی کپسولاسیون ۸۴/۹۹۸۲ درصد و پتانسیل زتای ۳۷/۷۰۴۳ داشتند. با توجه به نتایج XRD، موفقیت آمیز پیوند بین کیتوزان و زیست‌های فعال قابل استخراج از انار (همانند تانن) قابل اثبات بود.

منابع

AOAC. (1998). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.

- Khajeh, K. (2021). Developing a fluorescent hybrid nanobiosensor based on quantum dots and azoreductase enzyme for methyl red monitoring. *Iranian Biomedical Journal*, 25(1), 8. <https://doi.org/10.29252/ibj.25.1.8>
- Hashem, A., Aniagor, C. O., Fikry, M., Taha, G. M. & Badawy, S. M. (2023). Characterization and adsorption of raw pomegranate peel powder for lead (II) ions removal. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 25(4), 2087-2100. <https://doi.org/10.1007/s10163-023-01655-2>
- Hemalatha, M. & Brinda Lakshmi, A. (2021). Catalytic hydrolysis of fruit waste using magnetic carbon acid catalyst for bioethanol production. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 971-983. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01019-z>
- Hoque, M. B., Tanjila, M. J., Hosen, M. I., Hannan, M. A., Haque, P., Rahman, M. M. & Hasan, T. (2024). A comprehensive review of the health effects, origins, uses, and safety of tannins. *Plant and Soil*, 1-20. <https://doi.org/10.1007/s11104-024-06768-7>
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Kazemi, M. & Najari, Z. (2019). Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. *International journal of biological macromolecules*, 125, 621-629. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.096>
- Joy, J. M., Amruth, P., Dara, P. K., Renuka, V. & Anandan, R. (2023). Liposome mediated encapsulation and role of chitosan on modulating liposomal stability to deliver potential bioactives-A review. *Food Hydrocolloids for Health*, 100142. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2023.100142>
- Kumar, K., Srivastav, S. & Sharanagat, V.S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 70, p.105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Leong, T., Ashokkumar, M. & Kentish, S. (2011). The fundamentals of power ultrasound—A review. *Acoustics Australia*, 39(2), 54-63.
- Mamvura, T. A., Paterson, A. E. & Iyuke, S. E. (2018). Energy changes during use of high-power ultrasound on food grade surfaces. *South African Journal of Chemical Engineering*, 25(1), 62-73. <https://hdl.handle.net/10520/EJC-103495dbda>
- Mason, T. J., Cogley, A. J., Graves, J. E. & Morgan, D. (2011). New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(1), 226-230. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.008>
- Medina-Torres, N., Espinosa-Andrews, H., Trombotto, S., Ayora-Talavera, T., Patrón-Vázquez, J., González-Flores, T. & Pacheco, N. (2019). Ultrasound-assisted extraction optimization of phenolic compounds from Citrus latifolia waste for chitosan bioactive nanoparticles development. *Molecules*, 24(19), 3541. <https://doi.org/10.3390/molecules24193541>
- Meng, R., Wu, Z., Xie, Q. T., Cheng, J. S. & Zhang, B. (2021). Preparation and characterization of zein/carboxymethyl dextrin nanoparticles to encapsulate curcumin: Physicochemical stability, antioxidant activity and controlled release properties. *Food Chemistry*, 340, 127893. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127893>
- Mokhtarian, M. O. H. S. E. N., Tavakolipour, H., Jafari Savareh, S. & Amiri, M. (2014). Determination of optimal parameters to extraction and formulation of functional drink from green tea and determining its physicochemical and rheological properties. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 3(1), 51-66. [in Persian]. <https://doi.org/10.22101/JRIFST.2014.06.15.3>
- Moorthy, I. G., Maran, J. P., Muneeswari, S., Naganyashree, S. & Shivamathi, C. S. (2015). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1323-1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.037>
- Tan, T. B., Yussof, N. S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I. A. & Tan, C. P. (2016). Stability evaluation of lutein nanodispersions prepared via solvent displacement method: The effect of emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food chemistry*, 205, 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.008>
- Nejatian, M., Yazdi, A. P. G., Fattahi, R., Saberian, H., Bazsefidpar, N., Assadpour, E. & Jafari, S. M. (2024). Improving the storage and

oxidative stability of essential fatty acids by different encapsulation methods; a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129548.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129548>
Pulicharla, R., Marques, C., Das, R. K., Rouissi, T. & Brar, S. K. (2016). Encapsulation and release studies of strawberry polyphenols in biodegradable chitosan nanoformulation. *International journal of biological macromolecules*, 88, 171-178.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.036>
Putera, H. D., Doewes, R. I., Shalaby, M. N., Ramírez-Coronel, A. A., Clayton, Z. S., Abdelbasset, W. K. & Pahlavani, N. (2023). The effect of conjugated linoleic acids on inflammation, oxidative stress, body composition and physical performance: a comprehensive review of putative molecular mechanisms. *Nutrition & Metabolism*, 20(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12986-023-00758-9>

Rajha, H. N., Koubaa, M., Boussetta, N., Maroun, R. G., Louka, N., Lebovka, N. & Vorobiev, E. (2020). Selective ultrasound-assisted aqueous extraction of polyphenols from pomegranate peels and seeds. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7), e14545. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14545>

Rudzińska, M., Grygier, A., Knight, G. & Kmiecik, D. (2024). Liposomes as Carriers of Bioactive Compounds in Human Nutrition. *Foods*, 13(12), 1814. <https://doi.org/10.3390/foods13121814>

Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M. & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine.

Food bioscience, 40, 100857. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857>

Siddiqui, S. A., Singh, S. & Nayik, G. A. (2024). Bioactive compounds from pomegranate peels-Biological properties, structure-function relationships, health benefits and food applications-A comprehensive review. *Journal of Functional Foods*, 116, 106132. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106132>

Tavakolipour, H., Mokhtarian, M. & Kalbasi-Ashtari, A. (2017). Lipid oxidation kinetics of pistachio powder during different storage conditions. *Journal of food process engineering*, 40(3), e12423. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12423>

Xu, X., Lu, W., Zhu, J., Pan, X. & Zhu, X. (2021). An on-demand dissoluble chitosan hydrogel containing dynamic diselenide bond. *Gels*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.3390/gels7010021>

Yang, F., Feng, D., Oyeyinka, S. A., Zhang, H., Chen, K. & Yu, D. (2024). Preparation and Release Control of Starch-Cla Complex. Available at SSRN 4814580. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4814580>

Zhang, H. & Zhao, Y. (2015). Preparation, characterization and evaluation of tea polyphenol-Zn complex loaded β -chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 48, 260-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.015>

Zhuang, J., Ping, Q., Song, Y., Qi, J. & Cui, Z. (2010). Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of mitoxantrone liposomes. *International journal of nanomedicine*, 407-416.

Optimizing the Production of Chitosan Microcapsules Containing Pomegranate Bioactive Compounds-Conjugated Linoleic Acid using the Response Surface Method (RSM)

M. Jamshid Eini^a, H. Tavakolipour^{b*}, R. Mosavi Nadoshan^c, M. Mokhtarian^d

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

^b Professor of the Department of Food Science and Technology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

^c Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Biological Science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

^d Associate Professor of the Department of Food Science and Technology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

Received: 29 July 2024

Accepted: 4 January 2025

Abstract

10

Introduction: Due to the sensitivity of many bioactive compounds, their incorporation into the food matrix is difficult. Also, these compounds are decomposed in the digestive system and do not reach the intestine to be absorbed. Therefore, this study was conducted with the aim of optimizing the production of chitosome microcapsules containing bioactive cores (tannin-conjugated linoleic acid) using the response surface methodology.

Materials and Methods: After extracting of tannin by ultrasonic, chitosomes containing a bioactive core (tannin-conjugated linoleic acid) were produced by thermal method. The optimal extraction conditions were optimized by the RSM with the Box-Benken model. The variables of bioactive compounds concentration (100 to 300 ppm), chitosan gelate (0.1 to 0.3%w/v), and the range of ultrasound waves (50 to 90%) were considered as independent variables. The optimal chitosomes were selected based on minimum particle size, maximum microencapsulation efficiency and maximum zeta potential.

Results: During the optimization of chitosome microcapsules production containing bioactive cores (tannin- conjugated linoleic acid) including chitosan concentration (0.1-0.3%), ultrasound frequency (50-90kHz) and tannin concentration (100-300 ppm), the nanochitosomes particle size was 126.256 nm, encapsulation efficiency was 84.9982% and zeta potential was 37.70. The successful interaction between chitosan and bioactive pomegranate extract can be proven by XRD analysis. The almost spherical chitosan particles with size of 77.66 and 79.90 nm with the observed uniformity in particle size confirmed the normal particle size distribution.

Conclusion: The present results indicated that biopolymers play a key role in the stability of the liposome membrane structure and the stable release of molecules trapped by a spatial barrier on the surface. This will provide a potential platform for the proper design of carriers for nutrients or preservatives to increase the shelf life and safety of food matrices.

Keywords: Conjugated Linoleic Acid, Chitosome, Pomegranate Peel Extract, Tannin, Ultrasound.

* Corresponding Author: h.tavakolipour@gmail.com