

ارزیابی خواص ریزپوشینه‌های حاوی عصاره کاکوتی (*Ziziphora clinopodiodes*) پایدار شده با صمغ عربی، ایزوله پروتئین آب پنیر صمغ گوار و ترکیب آنها

محمود حسین نیا^۱، هادی الماسی^{۲*} و محمد عزیززاده خالد آباد^۲

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۴

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۰

^۱ دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۲ به ترتیب دانشیار و استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه: Email: h.almasi@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: درون پوشانی یکی از روش‌های جدید افزایش پایداری ترکیبات زیست فعال در طی فراوری و نگهداری مواد غذایی محسوب می‌شود. **هدف:** هدف از این پژوهش، ارزیابی و مقایسه کارایی صمغ عربی، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ گوار در ریزپوشانی عصاره کاکوتی (*Ziziphora clinopodiodes*) و تولید پودر ریزپوشینه بود. **روش کار:** سه هیدروکلئید مذکور به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر برای تولید میکروکپسول عصاره کاکوتی به وسیله روش اولتراسونیکاسیون مورد استفاده قرار گرفتند و نمونه‌ها با روش خشک کردن انجمادی به پودر تبدیل شدند. نتایج آنالیز نشان داد ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله ایزوله پروتئین آب پنیر کمترین اندازه ذره (۲۹۲/۷ نانومتر) را دارا بودند. ترکیب صمغ عربی یا گوار با ایزوله پروتئین آب پنیر، کارایی پلی ساکاریدها را بهبود بخشید. با در نظر گرفتن مقادیر راندمان انکپسولاسیون، اندازه ذرات، شاخص چند پختی و پتانسیل زتا، سازگاری ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ عربی بیشتر از صمغ گوار بود. بیشترین کارایی درون پوشانی (۸۶/۹۱٪) متعلق به نمونه صمغ عربی / ایزوله پروتئین آب پنیر بود. زمانی که ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ عربی مخلوط شد، محتوای فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی در بالاترین میزان خود بودند. شکل کروی ریزپوشینه‌ها برای تمامی نمونه‌ها بجز ترکیب صمغ گوار و صمغ عربی که شکل نامشخصی داشت، به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده شد. آنالیز FT-IR، شکل‌گیری برهمکنش‌های جدید بین مواد دیواره (بجز صمغ گوار) و اجزای عصاره کاکوتی را تایید کرد. آزمون XRD نشان داد که شاخص بلورینگی مواد دیواره بعد از ترکیب با عصاره کاکوتی کاهش می‌یابد اما نمونه‌های حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر در مقابل تغییرات ساختاری مقاوم است. **نتیجه گیری نهایی:** نتایج این پژوهش نشان داد که کارایی ایزوله پروتئین آب پنیر در ریزپوشانی عصاره کاکوتی بیشتر از پلی ساکاریدها می‌باشد. اما توصیه می‌شود این مواد دیواره در ترکیب با یکدیگر به خصوص ترکیب صمغ عربی / ایزوله پروتئین آب پنیر استفاده شوند تا بهترین نتیجه حاصل شود.

واژگان کلیدی: ریزپوشانی، عصاره کاکوتی، مواد دیواره، اندازه ذرات، مورفولوژی

مقدمه

با توجه به افزایش آگاهی و تقاضای مصرف کنندگان برای دریافت مواد غذایی سالم و طبیعی بدون افزودنی‌های مصنوعی، در سالیان اخیر صنایع غذایی بیشتر به استفاده از افزودنی‌های طبیعی پرداخته است. عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها طیف وسیعی از نگهدارنده‌های غذایی طبیعی هستند که عموماً ایمن شناخته شده‌اند (باکالی و همکاران ۲۰۰۸). عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها عطر و طعم مشخصی دارند و فعالیت آنتی اکسیدانی خوب و همچنین خواص ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند. با توجه به طبیعت فرار و واکنش پذیری شیمیایی‌شان، ترکیبات زیست فعال گیاهی را نمی‌توان در بیشتر سیستم‌های غذایی با موفقیت استفاده کرد. قدرت اختلاط ضعیف و دوفازه شدن یکی از مشکلاتی است که در اثر افزودن مستقیم عصاره‌ها و اسانس‌ها به کمپلکس‌های غذایی پدید می‌آید. تخریب حرارتی، شیمیایی و نوری ترکیبات زیست فعال از دیگر معضلاتی هستند که این مواد افزودنی طبیعی ایجاد می‌کنند (الماسی و همکاران ۲۰۱۶).

کاکوتی (با نام علمی *Ziziphora clinopodiodes*) یکی از رایج‌ترین گیاهان متعلق به خانواده *Lamiaceae* می‌باشد و از گیاهان بومی در ایران و ترکیه است. عمده ترکیبات فنولیک اسانس کاکوتی شامل پولگون، ۸،۱-سینئول، تیمول، کارواکرول، پی-سیمن و لیمونن است (سنبل و همکاران ۲۰۱۰، شهبازی و همکاران، ۱۳۹۶). خواص کاربردی عصاره و اسانس کاکوتی شامل فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی قوی است که در تحقیقات قبلی (شهبازی a,b ۲۰۱۵، شهبازی و شایوسی ۲۰۱۶) به طور کامل شناخته شده‌اند. خدایپرست و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر عصاره و اسانس کاکوتی را بر روی فلور میکروبی ماست مقایسه کردند. آنها نشان دادند که تاثیر اسانس کاکوتی بر روی تعداد استارتر معنی‌دار نبوده است. اما

عصاره کاکوتی در غلظت بالاتر (۴۰۰۰ میکرو گرم بر لیتر) تنوع استارتر را بعد از ۱۹ روز ذخیره سازی به طور معنی داری کاهش داد. بنابراین، آن‌ها دریافتند که اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی بیشتر از اسانس آن می‌باشد.

ریزپوشانی^۱ رایج‌ترین روشی است که به منظور افزایش ثبات ترکیبات زیست فعال استفاده می‌شود. مزایای ریزپوشانی عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها عبارتند از: حفاظت از اجزای عطر و طعمی در مقابل تبخیر و تغییرات مخرب، سهولت حمل و نقل، اختلاط بهتر با ماتریکس غذایی، رهایش کنترل شده و افزایش قابلیت زیستی (ده وس و همکاران ۲۰۱۰). تکنیک‌های زیادی برای ریزپوشانی وجود دارد. اولتراسونیکاسیون که با امواج پر شدت فراصوت کار می‌کند از تکنیک‌های کارآمد ریزپوشانی محسوب می‌شود. مزایای اصلی این روش شامل مصرف انرژی کمتر، اندازه ذره کوچک‌تر، شاخص چند پخشی کمتر و کارایی درون پوشانی بیشتر می‌باشد (دنسی و همکاران ۲۰۱۱).

انتخاب ماده دیواره مناسب برای رسیدن به درون پوشانی موفق، ضروری می‌باشد. پروتئین‌های آب پنیر به عنوان محصول فرعی صنعت پنیرسازی به طور وسیعی در فرمولاسیون‌های غذایی استفاده شده‌اند. اجزای اصلی پروتئین‌های آب پنیر، بتا لاکتو گلوبولین، آلفا لاکتا آلبومین، سرم آلبومین گاوی و ایمینوگلوبولین‌ها هستند (اسلوینسکی و همکاران ۲۰۰۳). خواص فعالیت سطحی قابل توجه کنسانتره پروتئین آب پنیر و ایزوله پروتئین آب پنیر، آن‌ها را به عنوان مواد دیواره مناسب برای درون پوشانی معرفی می‌کند. گزارش‌های متعددی در مورد استفاده از کنسانتره و ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی (باقری و همکاران ۲۰۱۳؛ پارتازاراسی و آناندهاراماکریشنن ۲۰۱۶) یا در ترکیب با بیوپلیمرهای دیگر (سرانو کروز و همکاران ۲۰۱۳؛ باکری و همکاران ۲۰۱۶) برای درون

(وینبرکی و همکاران ۲۰۰۴؛ کارنیرو و همکاران ۲۰۱۳؛ اراته و همکاران ۲۰۱۵) برای درون پوشانی ترکیبات زیست فعال مختلف ارائه شده‌اند. در تحقیق قبلی نویسندگان این مقاله (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷)، ریزپوشینه‌های اسانس کاکوتی به وسیله روش اولتراسونیکاسیون و با استفاده از پکتین و ایزوله پروتئین آب پنیر به عنوان مواد دیواره تهیه شدند. بعد از بهینه سازی توان اولتراسوند و نسبت هسته به ماده دیواره با استفاده از روش سطح پاسخ، ریزپوشینه‌های بهینه سازی شده تهیه شدند. میانگین اندازه ذرات برای ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله ایزوله پروتئین آب پنیر و پکتین به ترتیب ۱۷۲/۹۴ و ۸۵۶/۱۶ نانومتر به دست آمد.

بجز تحقیق قبلی ما، گزارشی در مورد درون پوشانی اسانس یا عصاره کاکوتی وجود ندارد. هدف از این تحقیق ارزیابی و مقایسه توانایی سه نوع از مواد دیواره (ایزوله پروتئین آب پنیر، صمغ گوار و صمغ عربی) و ترکیب آنها برای ریزپوشانی عصاره کاکوتی با استفاده از روش اولتراسونیکاسیون می‌باشد. ویژگی‌های فیزیکی و نیز خواص ساختاری و مورفولوژیکی ریزپوشینه‌ها به وسیله آنالیزهای FT-IR، XRD و SEM مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوله پروتئین آب پنیر (۸۵٪ پروتئین) از شرکت آرلا فود (دانمارک) خریداری شد. صمغ گوار (Lucid Colloids Ltd., Mumbai, India) به صورت پودر خشک با میانگین اندازه ذره ۷۵ میکرو متر و صمغ عربی (Colloides Naturels Brasil, Sao Paulo, Brazil) به صورت پودر حاوی ۹۲/۱۷٪ ماده خشک و متوسط جرم مولی ۵۲۰۰۰۰ گرم بر مول به عنوان مواد دیواره استفاده شدند. سایر ترکیبات از شرکت سیگما آلد ریچ (آلمان) خریداری شدند.

پوشانی ترکیبات زیست فعال موجود هستند. صمغ عربی، صمغ تراوشی بی‌رنگ بدست آمده از درخت *Acacia Senegal* یک ماده دیواره موثر شناخته شده می‌باشد که در ریزپوشانی استفاده شده است. صمغ عربی ساختار منشعب زیادی دارد. امولسیفیه کنندگی خوب، ویسکوزیته بالا، پایدار کنندگی بالا و حفظ خوب مواد فرار، خصوصیات اصلی صمغ عربی می‌باشند (اکرمی و همکاران، ۱۳۹۵؛ تومباره و همکاران ۲۰۱۶). این پلی‌ساکارید به طور گسترده‌ای به منظور درون پوشانی عصاره‌های گیاهی (مهدوی خزایی و همکاران ۲۰۱۴؛ تن و همکاران ۲۰۱۵؛ سایمون براون و همکاران ۲۰۱۶) و اسانس‌ها (دونگ و همکاران ۲۰۱۱؛ فراسکارلی و همکاران ۲۰۱۲؛ فرناندز و همکاران ۲۰۱۴) استفاده شده است. صمغ گوار یک گالاکتومانان به دست آمده از اندوسپرم دانه‌های گوار (*Cyamoposis tetragonolobus*)، پلی ساکارید دیگری است که به منظور درون پوشانی استفاده می‌شود. ویسکوزیته بسیار بالا و نبود فعالیت امولسیفیه کنندگی، محدودیت‌های اصلی صمغ گوار برای کاربرد به عنوان یک ماده دیواره برای انکپسولاسیون می‌باشند (سرکار و سینگال ۲۰۱۱). به این ترتیب، مشتقات هیدرولیز شده‌ی صمغ گوار (سرکار و همکاران ۲۰۱۲؛ کوک و نورنا ۲۰۱۶) یا در ترکیب با بیوپلیمرهای دیگر (کوک و همکاران ۲۰۱۷) برای اهداف درون پوشانی استفاده می‌شوند. با وجود خواص خوب همه‌ی مواد دیواره، معمولاً یک بیوپلیمر همه ویژگی‌های مورد نیاز را ندارد. بنابراین استفاده از مخلوط پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها در نسبت‌های مختلف می‌تواند منجر به افزایش کارایی درون پوشانی و کاهش هزینه‌ها شود. اخیراً گزارش‌هایی در مورد استفاده از ترکیب‌های بیوپلیمرهای انتخابی همچون صمغ گوار-صمغ عربی (راویچاندان و همکاران ۲۰۱۴)، صمغ گوار- ایزوله پروتئین آب پنیر (ارچلی و ایبانوگلو ۲۰۰۹؛ مهیار و همکاران ۲۰۱۴) و صمغ عربی- ایزوله پروتئین آب پنیر

استخراج عصاره

برگ‌های کاکوتی (*Z. clinopodiodes*) در مرحله گلدهی در اواخر خرداد ماه ۱۳۹۶ از دشت‌های آذربایجان غربی برداشت شدند و اصالت آن‌ها به وسیله انستیتو علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تایید شد. برگ‌ها شسته شدند و در دمای اتاق خشک شدند. سپس استخراج به وسیله آب انجام شد (سوخته زاری و همکاران ۲۰۱۷). ماده گیاهی خشک شده با آب مقطر با نسبت ۱:۵ در یک پرکولاتور به مدت ۶ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد مخلوط شد. سپس مخلوط از طریق کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف شد و حلال با استفاده از اوپراتور چرخشی تحت خلأ (Heidolph, Germany) جدا شد و عصاره کاکوتی با غلظت ۸۰٪ برای جمع آوری و برای استفاده‌های بعدی نگهداری شد.

تهیه ریزپوشینه‌ها

فرآیند درون پوشانی عصاره کاکوتی با روش بهینه سازی شده در تحقیق قبلی نویسندگان این مقاله انجام شد (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷). محلول‌های آبی صمغ گوار (GG) و صمغ عربی (GA) (۱٪ وزنی) به طور مجزا به وسیله اختلاط با آب مقطر با استفاده از همزن مغناطیسی آماده شدند. در مورد ایزوله پروتئین آب پنیر (WPI)، محلول به وسیله اختلاط مقداری پودر ایزوله پروتئین آب پنیر در محلول بافر (۵ میلی مولار بافر فسفات) تهیه شد. به منظور اطمینان یافتن از اشباعیت کامل مولکول‌های بیو پلیمرها، سوسپانسیون مواد دیواره یک روز قبل از درون پوشانی آماده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس عصاره کاکوتی به وسیله همزن مکانیکی تحت سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در یک هموژنایزر با سرعت بالا (KA T25 digital Ultra- (Turrax, Selangor, Malaysia) به آرامی داخل سوسپانسیون هر بیو پلیمر با رعایت نسبت هسته به ماده دیواره ۲:۱ اضافه شد. در مورد ترکیب مواد

دیواره، محلول‌های مخلوط شده با نسبت ۱:۱ از هر دو بیوپلیمر (GG /WPI، GA /WPI و GA /GG) قبل از افزودن عصاره تهیه شدند. در مرحله بعد، هموژنایزر اولتراسونیک (UP200Ht, Hielscher, Germany) مجهز به پروب تیتانیوم با ضخامت پروب ۱۴ میلی متر برای ریزپوشانی استفاده شد. هموژنیزاسیون اولتراسونیک روی ۱۰۰ گرم محلول با استفاده از توان اولتراسوند ۱۰۰ وات و فرکانس ۳۰ کیلو هرتز انجام شد. فرآیند اولتراسونیکاسیون در دمای اتاق به مدت ۲ دقیقه انجام شد. بعد از درون پوشانی، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد شدند و سپس با استفاده از خشک کن انجمادی پودر ریزپوشینه‌ها تهیه شدند.

خواص فیزیکی ریزپوشینه‌ها

آنالیز اندازه ذرات

میانگین قطر حجمی (D_{43}) و شاخص چند پخشی (PDI) ریزپوشینه‌ها به روش ژانگ و همکاران (۲۰۱۲) تعیین شدند. آنالیز اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق نوری دینامیکی (Malvern instruments, Worcestershire, UK) انجام شد. رقیق سازی ریزپوشینه‌ها با آب مقطر (۱:۱۰۰) قبل از اندازه گیری ذرات انجام گرفت. همه اندازه گیری‌ها در دمای ۲۵ °C انجام شد.

اندازه گیری پتانسیل زتا

هدف از اندازه‌گیری پتانسیل زتا، تعیین بار خالص سطحی ذرات پراکنده در محلول‌های آبی است. پتانسیل زتای ریزپوشینه‌ها به وسیله دستگاه زتا سائزر (Malvern instruments, Worcestershire, UK) در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. قبل از آنالیز، امولسیون‌ها تا دست یابی به غلظت ۰/۰۱٪ ذرات با استفاده از آب مقطر رقیق سازی شدند (سوخته زاری و همکاران، ۱۳۹۶).

کارایی درون پوشانی

تعیین درصد کل عصاره محصور شده در ریزپوشینه‌ها، هدف این آزمون بود. کارایی درون

نانومتر با اسپکتروفتومتر UV/vis (Unico, S 2100) اندازه گیری شد. حداکثر جذب عصاره کاکوتی در این طول موج (λ_{max}) ثبت شده است. منحنی کالیبراسیون با غلظت‌های مختلف عصاره کاکوتی رسم شد و محتوای عصاره کاکوتی کل با استفاده از معادله خطی به دست آمده از معادله کالیبراسیون محاسبه شد. کارایی درون پوشانی با استفاده از معادله زیر به دست آمد:

$$\text{Encapsulation efficiency} = (\text{total extract} - \text{free extract}) / \text{total extract}$$

برای این آنالیز استفاده شد. سوسپانسیون ریزپوشینه‌ها (۰/۱٪ وزنی/ وزنی) با توجه به روشی که در تعیین محتوای فنولی ذکر شد، به منظور تجزیه‌ی ریزپوشینه‌ها سانتریفیوژ شدند. برای عصاره کاکوتی خالص، ۰/۳۳٪ وزنی/ وزنی محلول عصاره کاکوتی در آب مقطر به منظور حفظ غلظت عصاره کاکوتی در سطح مشابهی از سوسپانسیون ریزپوشینه‌ها تهیه شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر مایع رویی ریزپوشینه‌های سانتریفیوژ شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول عصاره کاکوتی با ۲/۹ میلی لیتر از محلول ۶۰ میکرو مولار DPPH در متانول مخلوط شد. مخلوط واکنش در محیط تاریک به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سرانجام، جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد ممانعت کنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط معادله زیر به دست آمد:

$$100 * (1 - A_s / A_c) = \text{درصد مهار کنندگی}$$

که A_c جذب نمونه کنترل و A_s جذب نمونه حاوی ریزپوشینه‌ها می‌باشد.

خصوصیات مورفولوژیکی ریزپوشینه‌ها

FT-IR

آنالیز FTIR به منظور بررسی ساختار شیمیایی پودرهای بیوپلیمرها و ریزپوشینه‌های آنها و برهمکنش‌های بین آنها انجام گرفت. نمونه‌ها به وسیله روش قرص پتاسیم برمید آماده شدند. پودر نمونه‌ها به

پوشانی به روش حق جو و همکاران (۲۰۱۶) اندازه گیری شد. محلول ریزپوشینه‌ها (۰/۱٪ در آب مقطر) آماده شد و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از سرنگ PTFE با اندازه منفذ ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. سپس، مایع رویی فیلتر شده (۴۰ میکرولیتر) با ۲ میلی لیتر استون رقیق شد و به منظور اندازه گیری کارایی درون پوشانی مورد استفاده قرار گرفت. جذب در ۳۹۹

خواص کاربردی ریزپوشینه‌ها

محتوای فنولی کل

محتوای فنولی کل عصاره کاکوتی و ریزپوشینه‌های آن به وسیله روش فولین سیوکالچو (باقری و همکاران ۲۰۱۳) تعیین شدند. ۲۰ میکرولیتر از عصاره کاکوتی با ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالچو و پس از آن افزودن ۳۰۰ میکرولیتر محلول سدیم بی کربنات (۲۰٪ وزنی/ حجمی) مخلوط شد. بعد از نگهداری به مدت ۷۰ دقیقه در دمای اتاق، جذب در ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. تعیین محتوای فنول کل ریزپوشینه‌ها (۰/۱٪ وزنی/ وزنی در آب مقطر) بعد از تجزیه آنها در اثر نیروی برشی بالا که به وسیله مخلوط کردن در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، انجام شد. ۲۰ میکرولیتر مایع رویی ریزپوشینه‌ها پس از سانتریفیوژ، با توجه به روش ذکر شده برای تعیین فنول کل استفاده شدند. اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده شد و محتوای فنول کل به صورت معادل اسید گالیک در صد گرم ماده خشک (mg GAE.100g⁻¹DW) محاسبه شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی

توانایی مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۲۰۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل) به منظور تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ریزپوشینه‌ها اندازه گیری شد. روشی که توسط ال سید و همکاران (۲۰۱۴) شرح داده شده بود

گرفت. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد گزارش شدند.

نتایج و بحث

اندازه ذرات و شاخص چند پختی

متوسط قطر حجمی (D_{43}) و شاخص PDI ریزپوشینه‌ها در جدول ۱ آمده است. اندازه همه نمونه‌ها در محدوده ۲۹۲ تا ۱۸۸۵ نانومتر قرار داشت. اندازه ذرات ریزپوشینه‌ها به وسیله نوع ماده دیواره تحت تاثیر قرار گرفتند. بزرگترین اندازه ذره متعلق به ریزپوشینه‌های صمغ گوار بود و زمانی که ایزوله پروتئین آب پنیر به عنوان ماده دیواره استفاده شد، کوچکترین اندازه به دست آمد. توانایی بالای ایزوله پروتئین آب پنیر در کاهش کشش سطحی به خاصیت امولسیفیه کنندگی خوب آن برمی‌گردد که به وجود همزمان بخش‌های آبگریز و آبدوست در آن مربوط می‌شود. این یکی از ویژگی‌های اصلی بیوپلیمرهای پروتئینی همچون ایزوله پروتئین آب پنیر است. با این حال، پلی ساکاریدها (صمغ عربی و صمغ گوار) طبیعت آمفی فیلک ندارند و کارایی شان در سطح دو فاز کمتر از ایزوله پروتئین آب پنیر است. نتایج مشابه در تحقیق قبلی ما (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷) نشان داد که کارایی درون پوشانی اسانس کاکوتی به وسیله ایزوله پروتئین آب پنیر بیشتر از پکتین است. همچنین مقایسه ایزوله پروتئین آب پنیر و نشاسته اصلاح شده در درون پوشانی روغن دانه annatto (سیلوا و همکاران ۲۰۱۶) و مقایسه ایزوله پروتئین آب پنیر، کربوکسی متیل سلولز یا پولولان در درون پوشانی مخلوط روغن تن ماهی/ روغن نخود فرنگی (باکری و همکاران ۲۰۱۶) نتایجی در تایید داده‌های این پژوهش داشته‌اند. وزن مولکولی پایین و ساختار شاخه‌ای صمغ عربی در مقایسه با صمغ گوار دلایل بالاتر بودن کارایی درون پوشانی و در پایین‌تر بودن متوسط اندازه ذرات برای ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله

صورت یک قرص کوچک با ضخامت حدود ۱ میلی متر پرس شد. طیف سنجی FT-IR با استفاده از اسپکترومتر FT-IR (Nexus 670, USA) انجام شد که با قدرت تفکیک ۴ بر سانتی متر در محدوده ۴۰۰۰ تا ۴۰۰ بر سانتی متر کار می‌کرد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

مورفولوژی سطح ریزپوشینه‌ها به وسیله SEM مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها با یک لایه نازک رسانا از جنس طلا پوشش داده شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (KYKY-EM3200) در یک ولتاژ شتاب دهنده از ۱۰ تا ۲۰ کیلو ولت مشاهدات انجام شد. قطر متوسط ریزپوشینه‌ها در روی تصاویر SEM، به وسیله نرم افزار Image.J محاسبه شد.

آزمون XRD

آزمون XRD بر روی پودرهای مواد دیواره خالص و پودرهای ریزپوشینه‌های تهیه شده با دستگاه X-ray از نوع Siemens D5000 (آلمان) انجام شد که مجهز به منبع تابشی $\text{CuK}\alpha$ ($k=0/154 \text{ nm}$) در ۴۰ کیلو ولت و ۳۰ میلی آمپر است. نمونه‌ها در محدوده زاویه پراش $(2\theta=70-2)$ با سرعت ۰/۵ درجه بر دقیقه و در دمای اتاق اسکن شدند. شاخص بلورینگی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (پور جواهر و همکاران ۲۰۱۷):

$$\text{CrI}(\%) = [(I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}] \times 100$$

که CrI شاخص بلورینگی، I_{002} ، ماکزیمم شدت انعکاسی سطح بلورین بیوپلیمرها و I_{am} ، ماکزیمم شدت پهنای تفرق اشعه X در قسمت آمورف نمونه (شدت پراش در $2\theta=18$) است.

آنالیز آماری

همه آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. آزمایش صورت کاملاً تصادفی انجام و از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با نرم افزار SPSS (Version 21, SPSS Inc., Chicago, IL) برای آنالیز نتایج استفاده شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0/05$) به منظور تشخیص تفاوت بین مقادیر میانگین مورد استفاده قرار

پروتئین آب پنیر و جود نداشته و آن‌ها به صورت مستقل به عنوان مواد دیواره ایفای نقش می‌کنند. اما برهم‌کنش‌های بین صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر قابل توجه بوده و مخلوط‌شان، PDI کمتری دارد. در حقیقت، ایزوله پروتئین آب پنیر با اثر امولسیفیه کنندگی بالا و وزن مولکولی پایین قادر به کاهش شاخص PDI ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله صمغ عربی می‌باشد. نتایج مشابه به وسیله کارنیرو و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده شد که تاثیر ترکیب صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر را بر روی درون پوشانی روغن بذر کتان بررسی کردند. زمانی که ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی استفاده شد، پایین ترین PDI مشاهده شد. همان طور که بیان شد، خاصیت امولسیفیه کنندگی خوب ایزوله پروتئین آب پنیر با توجه به ساختار آمفی فیلک، علت تولید ریزپوشینه‌های همگن می‌باشد (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷).

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا، بار سطحی خالص ریزپوشینه‌ها را نشان می‌دهد. افزایش پتانسیل زتا، تثبیت سیستم‌های کلوئیدی را با توجه به افزایش نیروهای دافعه الکترواستاتیکی افزایش می‌دهد. در میان مواد دیواره استفاده شده، صمغ عربی بیشترین پتانسیل زتا (۲۰/۵- میلی ولت) را داشت. از آنجایی که pH ایزوالکتریک ایزوله پروتئین آب پنیر تقریباً معادل ۵ است و pH محلول‌ها تقریباً ۷ است، بار خالص این ریزپوشینه‌ها منفی (۱۵/۵- میلی ولت) می‌باشد. صمغ گوار، پلی الکترولیت ضعیفی است و پایین ترین پتانسیل زتا (۶/۶- میلی ولت) را دارد. تقریباً نتایج مشابه درباره مقادیر پتانسیل زتای ایزوله پروتئین آب پنیر (باکری و همکاران ۲۰۱۶) و صمغ عربی (سیلوا و همکاران ۲۰۱۴) در مقالات گزارش شده است. ترکیب صمغ گوار با صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر، پتانسیل زتا را به طور معنی داری کاهش داد. در میان مخلوط‌های مواد دیواره، نمونه

صمغ عربی می‌باشند. همان طور که قبلاً ذکر شد، با توجه به توانایی امولسیفیه کنندگی پایین صمغ گوار، تقریباً شکل هیدرولیز شده آن به عنوان ماده دیواره در تحقیقات قبلی استفاده شده است. زمانی که ترکیب بیوپلیمرها برای پایدار کنندگی عصاره کاکوتی استفاده شد (کوک و نورنا ۲۰۱۶؛ سرکار و همکاران ۲۰۱۲)، رفتارهای متفاوتی مشاهده گردید. صمغ گوار در ترکیب با صمغ عربی، اندازه ذرات ریزپوشینه‌ها را کاهش داد. اما کارایی ایزوله پروتئین آب پنیر زمانی که با صمغ گوار ترکیب شد، به طور معنی داری کاهش پیدا کرد و اندازه ذرات افزایش یافت. این مشاهدات مشخص کرد که سازگاری صمغ گوار با صمغ عربی بیشتر از ایزوله پروتئین آب پنیر است. ارچلی و ایبانوگلو (۲۰۰۹) تاثیر پکتین و صمغ گوار را بر روی ویژگی‌های رئولوژیکی امولسیون‌های پایدار شده به وسیله ایزوله پروتئین آب پنیر مقایسه کردند. آن‌ها بیان کردند که افزایش غلظت صمغ گوار، ویسکوزیته را تا حد زیادی افزایش داد و از جذب سریع ایزوله پروتئین آب پنیر در سطح ممانعت کرد. زمانی که در ترکیب با ایزوله پروتئین آب پنیر مورد استفاده قرار گرفت کارایی پایدار کنندگی صمغ عربی به طور معنی داری بهبود یافت. سانتانا و همکاران (۲۰۱۶) تاثیر ترکیب ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ عربی را بر روی کارایی ریزپوشانی *Jussara pulp* (*Euterpe edulis*) بررسی کردند. با توجه به گزارش آن‌ها، زمانی که مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر/ صمغ عربی به جای صمغ عربی به تنهایی استفاده شد، کارایی درون پوشانی افزایش و توزیع اندازه ذرات کاهش یافت. با توجه به جدول ۸، ریزپوشینه‌های صمغ عربی و صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر بیشترین PDI برابر ۱ را داشتند. ریزپوشینه‌های صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر، توزیع اندازه ذرات دو پخشی داشتند. این مسئله در تصاویر SEM قابل مشاهده است (شکل ۳). به نظر می‌رسد که هیچ برهم‌کنشی بین صمغ گوار و ایزوله

صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر، بیشترین مقدار پتانسیل زتا را داشت.

کارایی درون پوشانی

مقادیر کارایی درون پوشانی در جدول ۱ نشان داده شده است. کارایی درون پوشانی از ۲۷/۳۲٪ برای صمغ گوار تا ۸۶/۹۱٪ برای مخلوط صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر تغییر یافته است. کارایی درون پوشانی ۲۷/۳۲٪ برای صمغ گوار به این معنی است که سه چهارم عصاره کاکوتی انکپسوله شده، آزاد است. همان طور که قبلاً اشاره شد، صمغ گوار ویسکوزیته بسیار بالایی بدون خاصیت امولسیفیه‌کنندگی دارد که منجر به کاهش توانایی آن برای مورد استفاده قرار گرفتن به عنوان عامل ریزپوشانی می‌شود (کوک و نورنا ۲۰۱۶). به همین خاطر، استفاده از صمغ گوار به تنهایی و بدون ترکیب با سایر بیوپلیمرها کمتر به عنوان ماده دیواره استفاده شده است و هیچ گزارشی برای مقایسه با این تحقیق وجود ندارد. با مقایسه ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی، کارایی درون پوشانی ایزوله پروتئین آب پنیر به طور معنی داری بیشتر از صمغ عربی می باشد. این می‌تواند به توانایی امولسیفیه‌کنندگی ایزوله پروتئین آب پنیر آمفی فیلک در مقایسه با ساختار آبدوست صمغ عربی نسبت داده شود. باقری و همکاران (۲۰۱۳)، کارایی درون پوشانی بیشتر از ۷۰٪ را برای درون پوشانی عصاره هسته خرما با ایزوله پروتئین آب پنیر مشاهده کردند. آن‌ها بیان کردند که توانایی پروتئین‌های آب پنیر در محصور کردن پلی فنول‌ها بیشتر از پلی ساکاریدها است. مشابه با این نتایج، فریدی اسفنجانی و همکاران (۲۰۱۵) کارایی درون پوشانی بیشتر از ۷۰ درصد را برای درون پوشانی سافرانال با کنسانتره پروتئین آب پنیر گزارش کردند. زمانی که ترکیب بیوپلیمرها استفاده شد، هیچ اختلاف معنی داری بین مخلوط‌های صمغ گوار/

صمغ عربی و صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر مشاهده نشد. افزایش ویسکوزیته و کاهش تحرک زنجیره‌های بیوپلیمر در حرکت به سمت ترکیبات فنولی، دلیل اصلی اثر کاهشی صمغ گوار بر روی توانایی درون پوشانی صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد (گاستونه و همکاران ۲۰۱۴). نتایج مشابهی برای تاثیر صمغ گوار بر روی کارایی درون پوشانی ایزوله پروتئین آب پنیر (مهیار و همکاران ۲۰۱۴) و صمغ عربی (راویچاندان و همکاران ۲۰۱۴) در محصور کردن سایر ترکیبات زیست فعال گزارش شده‌اند. با این حال، زمانی که مخلوط صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر استفاده شد، یک اثر سینرژیستی مشاهده شد. بیشترین مقدار کارایی درون پوشانی (۸۶/۹۱٪) برای ریزپوشینه‌های پوشیده شده به وسیله صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر ثبت شد. سانتانا و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که تاثیر ترکیب کنسانتره پروتئین آب پنیر و ایزوله پروتئین سویا بر روی صمغ عربی در انکپسولاسیون *Jussara pulp* بیشتر از نشاسته اصلاح شده می‌باشد. به نظر می‌رسد، وجود برهمکنش‌هایی بین آمینو اسید زنجیره‌های جانبی ایزوله پروتئین آب پنیر و مونوساکاریدهای صمغ عربی با وجود بار منفی شان محتمل است که موجب آرایش بهتر درشت مولکول‌ها در اطراف ترکیبات فنولی و دست یابی به کارایی ریزپوشانی بیشتر می‌شود (اش و همکاران ۲۰۱۵).

جدول ۱- اندازه ذرات، شاخص PDI، پتانسیل زتا و کارایی درون پوشانی ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله ترکیبات مختلف مواد دیواره

Table 1- Particle size, PDI index, Zeta potential and encapsulation efficiency of microcapsules encapsulated with different wall materials

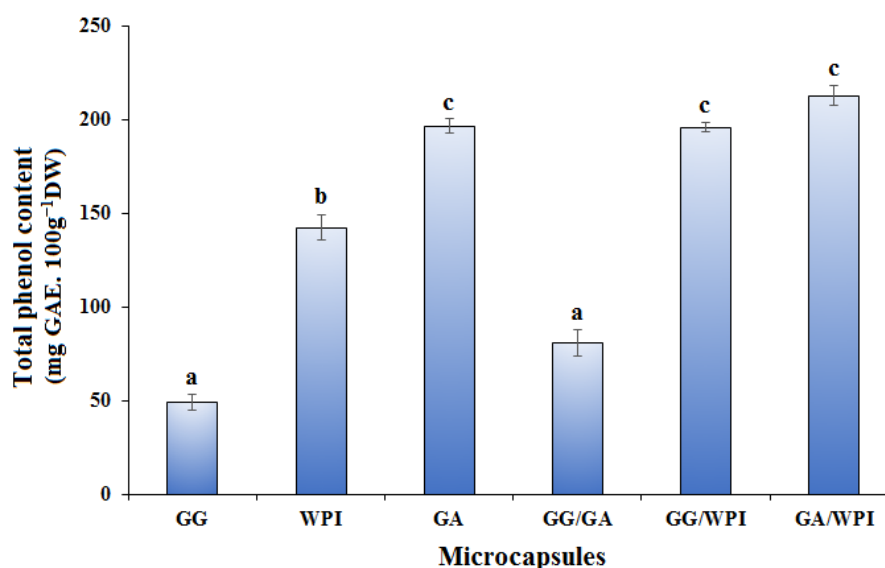
Type of microcapsule	Mean particle size (nm)	PDI index	Zeta potential (meV)	Encapsulation efficiency (%)
GG	1885.3±12.2 ^e	0.84±0.06 ^b	-6.6±0.91 ^c	27.32±5.32 ^a
WPI	292.7±4.4 ^a	0.47±0.04 ^a	-15.5±1.20 ^b	67.54±2.23 ^c
GA	1201.5±10.0 ^c	1.00±0.00 ^c	-20.5±4.31 ^a	43.87±2.54 ^b
GG/GA	952.7±7.7 ^b	0.75±0.02 ^b	-11.75±2.32 ^b	49.44±1.00 ^b
GG/WPI	1702.1±9.5 ^d	1.00±0.00 ^c	-7.98±0.67 ^c	55.65±6.21 ^b
GA/WPI	353.4±16.6 ^a	0.56±0.06 ^a	-15.4±0.30 ^b	86.91±5.55 ^d

Different subscripts in a same column represent significant difference at level of 5% (P<0.05).

محتوای فنولی کل

شکل ۱، محتوای فنول کل ریزپوشینه‌های تهیه شده با مواد دیواره مختلف را نشان می‌دهد. محتوای فنول کل اولیه‌ی عصاره کاکوتی قبل از محصور شدن در ریزپوشینه‌ها برابر با ۳۴۶/۹۱ بود. محتوای فنول کل همه نمونه‌ها کمتر از مقدار اولیه در عصاره کاکوتی تازه می‌باشد. این به این معنی است که حتی خشک کردن انجمادی به عنوان یک روش خشک کردن در دمای پایین نیز منجر به تخریب بخش کمی از ترکیبات فنولی می‌شود. به علاوه، اولتراسونیکاسیون قادر به تجزیه برخی از فنول‌ها می‌باشد (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷). در بین ریزپوشینه‌ها، آن‌هایی که کارایی درون پوشانی بالاتری دارند، محتوای فنول کل بیشتری هم نشان می‌دهند. محتوای فنول کل صمغ عربی بیشتر از ایزوله پروتئین آب پنیر و پس از آنها صمغ گوار می‌باشد. زمانی که مخلوط مواد دیواره استفاده شد، محتوای فنول کل افزایش یافت و نمونه صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر بیشترین محتوای فنولی کل (۲۱۲/۸۱) را داشت. با مقایسه داده‌های جدول ۱ با شکل ۱، مشاهده می‌شود که محتوای فنول کل با افزایش

کارایی درون پوشانی افزایش یافته است و فنول‌های پوشش داده نشده به سرعت تخریب شده اند. تن و همکاران (۲۰۱۵)، عصاره خربزه تلخ را به وسیله خشک کردن پاششی درون پوشانی کردند و از مالتودکسترین و صمغ عربی به عنوان عوامل درون پوشانی استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که یک ارتباط قوی بین راندمان درون پوشانی و محتوای فنول کل ریزپوشینه‌ها وجود داشته است. اما سایمون براون و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که در عصاره زنجبیل ریزپوشانی شده با مالتودکسترین یا صمغ عربی و یا مخلوط‌های آنها هیچ اختلاف معنی داری در ترکیبات فنولی وجود ندارد. عمده ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی شامل پولگون، ۸،۱-سینئول، تیمول، کارواکرول، پی-سیمن و لیمونن می‌باشد (سنبل و همکاران ۲۰۱۰). این ترکیبات، مواد شیمیایی واکنش پذیر هستند و تخریب حرارتی یا شیمیایی رایج ترین ضعف این ترکیبات زیست فعال می‌باشد (دنسی و همکاران ۲۰۱۱). بنابراین، ریزپوشانی می‌تواند رویکردی موثر و کارآمد برای افزایش ثبات فیزیکی و شیمیایی ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی باشد (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷).



شکل ۱- محتوای فنولی کل ریزپوشینه‌های عصاره کاکوتی پایدار شده به وسیله ترکیبات مختلف مواد دیواره

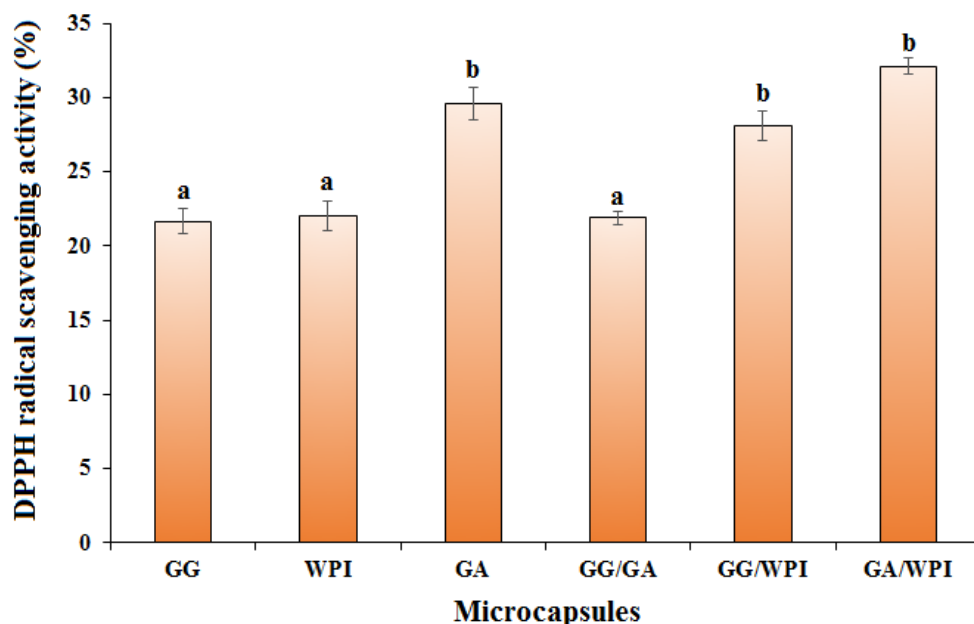
Figure 1- Total phenol content of *Ziziphora clinopodiodes* extract microcapsules stabilized by different wall materials

Different subscripts represent significant difference at level of 5%.

فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت مهار کنندگی DPPH ریزپوشینه‌ها مشابه با روند محتوای فنول کل بود که در شکل ۲ آمده است. صمغ گوار و صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب با ۲۱/۶۷٪ و ۳۲/۱۱٪ کمترین و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارند. خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره کاکوتی خالص در غلظت یکسان، ۳۹/۴۲٪ به دست آمد. اجزای فنولی همچون تیمول، کارواکرول، پی- سیمن، آلفا- پینن، لیمونن و ایزو- نئومنتال مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی خوب عصاره کاکوتی هستند (شهبازی a ۲۰۱۵). تجزیه قسمتی از ترکیبات فنولی بعد از خشک کردن و در طی ذخیره سازی منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی ریزپوشینه‌ها شده است.

این کاهش برای ریزپوشینه‌هایی که کارآیی درون پوشانی کمتری دارند قابل توجه است. به عبارت دیگر، ترکیبات فنولی ریزپوشانی شده که به سطح ریزپوشینه‌ها متصل شده‌اند نسبت به تبخیر و تخریب شیمیایی یا فیزیکی حساس هستند، به راحتی تجزیه شده و منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی ریزپوشینه‌ها می‌شوند. سایر تحقیقات (تن و همکاران ۲۰۱۵؛ کوک و همکاران ۲۰۱۷؛ دی باتیستا و همکاران ۲۰۱۵)، نظر مشابهی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های گیاهی ریزپوشانی شده دارند و بیان می‌کنند که آن با کارآیی درون پوشانی در ارتباط می‌باشد.



شکل ۲- فعالیت آنتی اکسیدانی ریزپوشینه‌های عصاره کاکوتی پایدار شده به وسیله ترکیبات مختلف مواد دیواره

Figure 2- Antioxidant activity of *Ziziphora clinopodioides* extract microcapsules stabilized by different wall materials

Different subscripts represent significant difference at level of 5%.

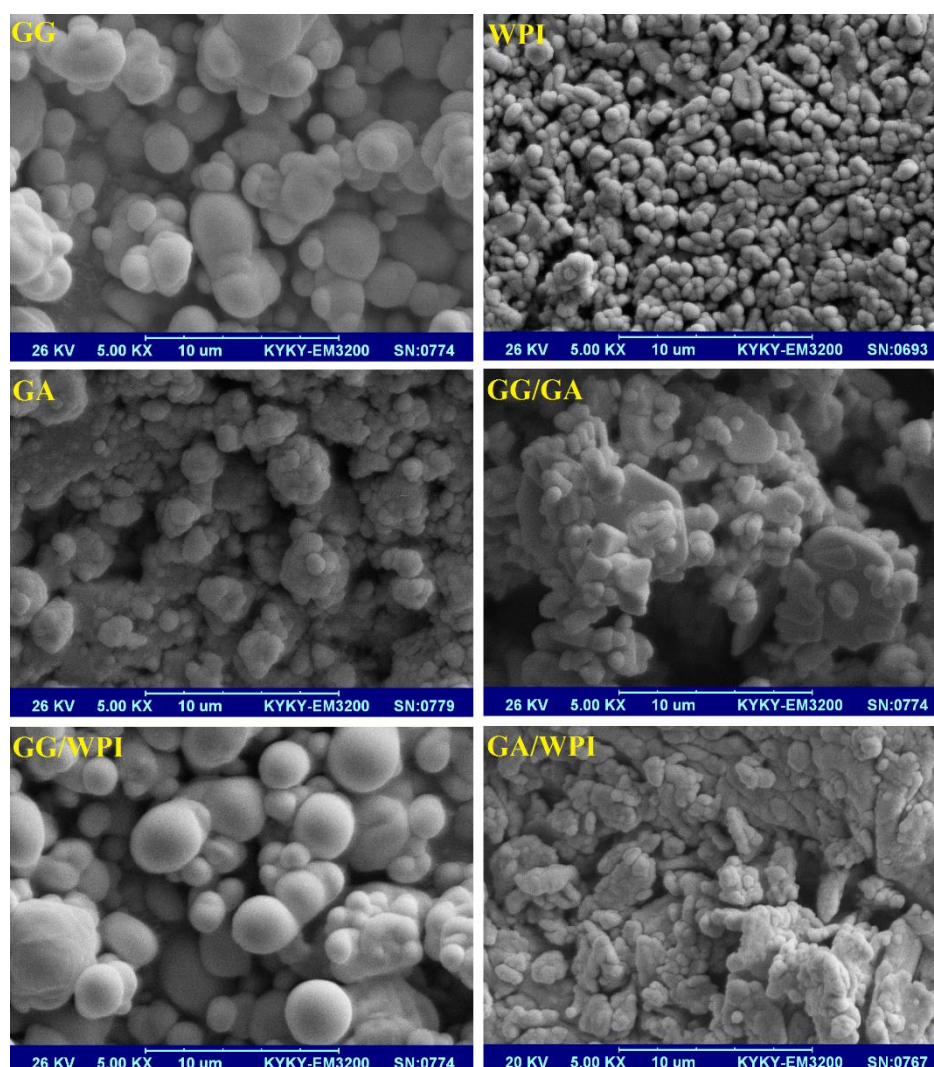
ایزوله پروتئین آب پنیر کمترین اندازه ذرات را با توزیع یکنواخت به نمایش گذاشتند. PDI و قطر متوسط برای ریزپوشینه‌های صمغ عربی بیشتر بوده و این پارامترها برای ریزپوشینه‌های صمغ گوار افزایش یافت. قطر متوسط ریزپوشینه‌های ایزوله پروتئین آب پنیر، صمغ گوار و صمغ عربی، که از روی تصاویر محاسبه شدند، به ترتیب ۳۵۵، ۲۰۲۰ و ۱۳۶۰ نانومتر می‌باشند که با نتایج آنالیز اندازه ذرات مطابقت دارند. وجود مشابهت بین نتایج DLS و تصاویر SEM برای ترکیب مواد دیواره نیز تایید شد. همان طور که مشاهده می‌شود، مخلوط‌های صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر بیشترین اندازه ذره (۱۹۳۰ نانومتر) را در مقایسه با ریزپوشینه‌های پایدار شده به وسیله صمغ گوار/ صمغ عربی (۹۵۲ نانومتر) و صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر (۴۲۵ نانومتر) دارند. کمترین محدوده توزیع اندازه ذرات بین مخلوط عوامل پوشش دهنده به ریزپوشینه‌های صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر تعلق دارد. شاخص PDI بیشتر زمانی ظاهر می‌شود که

مطالعه مورفولوژی با میکروسکوپ SEM

اندازه، شکل و مورفولوژی ریزپوشینه‌ها در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی ارائه شده در شکل ۳ قابل مشاهده هستند. نبود شکاف یا تخلخل در سطح ذرات، پوشش کامل ماده هسته توسط مواد دیواره و موفقیت آمیز بودن فرآیند درون پوشانی را نشان می‌دهد. یک دلیل اصلی برای این مسئله، استفاده از روش خشک کردن انجمادی می‌باشد. پارتازاراسیا و آناندهاراماکریشنان (۲۰۱۶)، ویتامین E درون پوشانی شده با ایزوله پروتئین آب پنیر را به وسیله سه روش خشک کردن انجمادی، خشک کردن پاششی و خشک کردن پاششی- انجمادی تهیه کردند. آن‌ها اظهار کردند که شکل منظم و کارایی درون پوشانی برای روش خشک کردن انجمادی بیشتر از خشک کردن پاششی است. همان طور که دیده می‌شود، زمانی که مواد دیواره به تنهایی استفاده شدند ریزپوشینه‌های کروی به دست آمدند. با اینکه قطر متوسط و توزیع اندازه ذرات متفاوت بودند. ریزپوشینه‌های پایدار شده با

در تحقیق حاضر شد. نکته دیگر شکل ۳، تفاوت در شکل ریزپوشینه‌های صمغ گوار/ صمغ عربی می‌باشد. زمانی که صمغ گوار با صمغ عربی مخلوط شد، شکل کروی به دست نیامد و مورفولوژی نامنظمی برای ترکیبشان پدید آمد. تن و همکاران (۲۰۱۵)، شکل نامنظم مشابهی را برای ریزپوشینه‌های عصاره خربزه تلخ مشاهده کردند زمانی که صمغ عربی با مالتودکسترین مخلوط شد.

صمغ گوار به تنهایی و یا در ترکیب با صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر به عنوان ماده دیواره استفاده شود. کوک و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که زمانی که از صمغ گوار هیدرولیز شده به جای صمغ عربی به عنوان عامل انکپسوله کننده استفاده شد اندازه ذرات ریزپوشینه‌های عصاره فنولی پوست انگور کاهش یافت و ویژگی‌های مورفولوژیکی بهبود یافت. وزن مولکولی بالای صمغ گوار و نبود فعالیت امولسیفیه کنندگی منجر به تشکیل ریزپوشینه‌هایی با محدوده وسیع اندازه ذرات



شکل ۳- تصاویر SEM از ریزپوشینه‌های عصاره کاکوتی پایدار شده به وسیله ترکیبات مختلف مواد دیواره

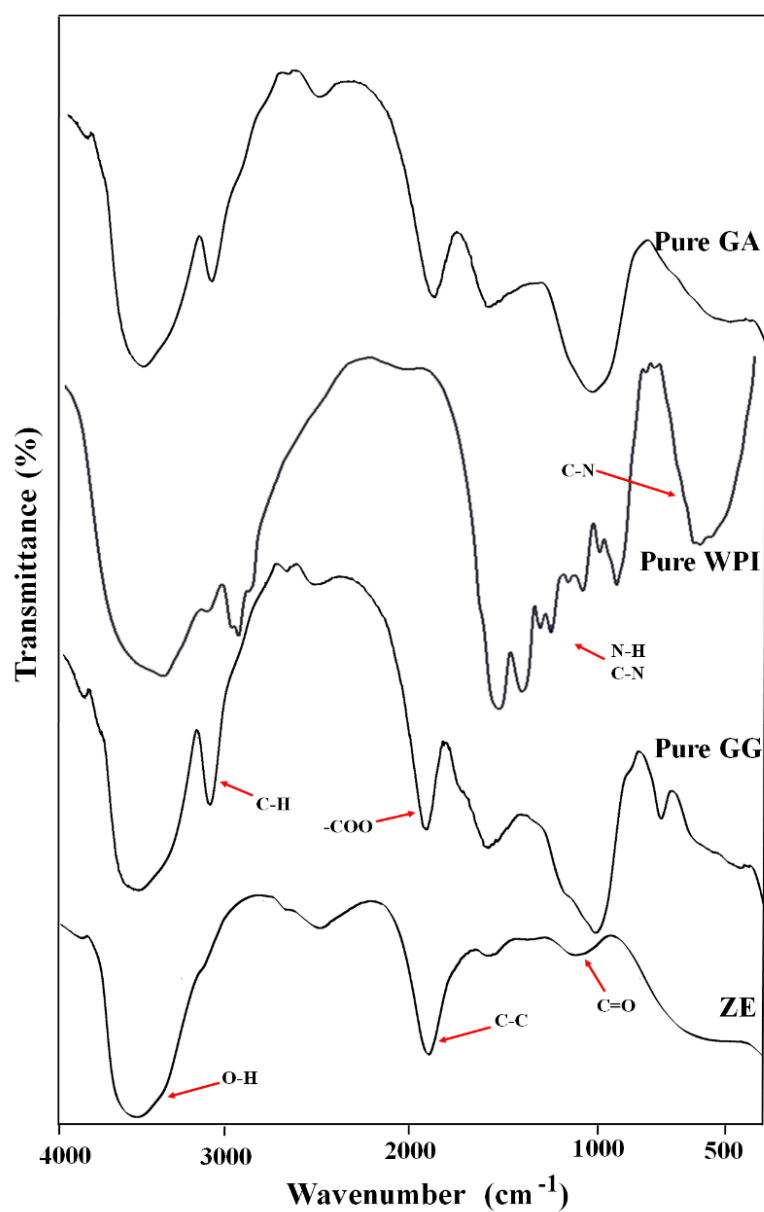
Figure 3- SEM images of *Ziziphora clinopodiodes* extract microcapsules stabilized by different wall materials

آنالیز FT-IR

شکل ۴، طیف FT-IR را برای عصاره کاکوتی، پودرهای صمغ گوار، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی خالص نشان می‌دهد. آنالیز FT-IR ریزپوشینه‌ها با مواد دیواره به صورت تنها یا ترکیب شده نیز در شکل ۵ آمده است. باند ۳۴۰۰ برای عصاره کاکوتی به کشش O-H گروه هیدروکسیل در گروه کربوکسیل اسیدی (COOH) بر روی حلقه بنزنی فنولیک اسید مربوط می‌شود. پیک مشاهده شده در ۱۸۵۰ به ارتعاشات کششی C-C حلقه آروماتیک نسبت داده می‌شود که گروه‌های عملگرایی رایج در ترکیبات فنولی می‌باشند. پیکی که در ۱۱۱۰ مشاهده شد، مربوط به ارتعاش نامتقارن C=O می‌باشد (باقری و همکاران ۲۰۱۳). طیف‌های صمغ عربی و صمغ گوار خالص دارای ۵ پیک جذبی یکسان بودند که شامل پیک در محدوده ۳۰۰۰-۳۶۰۰ برای باند کششی O-H، ۲۹۹۰ برای باند کششی C-H، ۱۷۷۰ برای باند کششی C=O، ۱۵۴۰ برای باندهای کششی گروه‌های COO- و ۱۰۶۷ برای باندهای دوگانه C=O یا C=C می‌باشند (نایاک و همکاران ۲۰۱۲ و ساوراب و همکاران ۲۰۱۶). پودر ایزوله پروتئین آب پنیر، چندین پیک جذبی خاص را نشان می‌دهد. پیک ظاهر شده در ۶۶۷ به گروه‌های C-N مربوط می‌شود. پیک‌های در محدوده ۱۰۷۵-۱۴۵۸ به باندهای کششی N-H و C-N (آمید نوع سوم و نوع دوم) مربوط می‌شود. دو پیک تند در ۱۶۵۲ و ۱۷۰۳ مشاهده شد که به باندهای کششی گروه‌های C=O (آمید نوع اول) مربوط می‌شوند. یک پیک در ۳۰۱۰ به باند کششی C-H اختصاص یافته است. پیک در محدوده ۳۵۰۰ به گروه‌های O-H آزاد مربوط می‌شود (راموس و همکاران ۲۰۱۳).

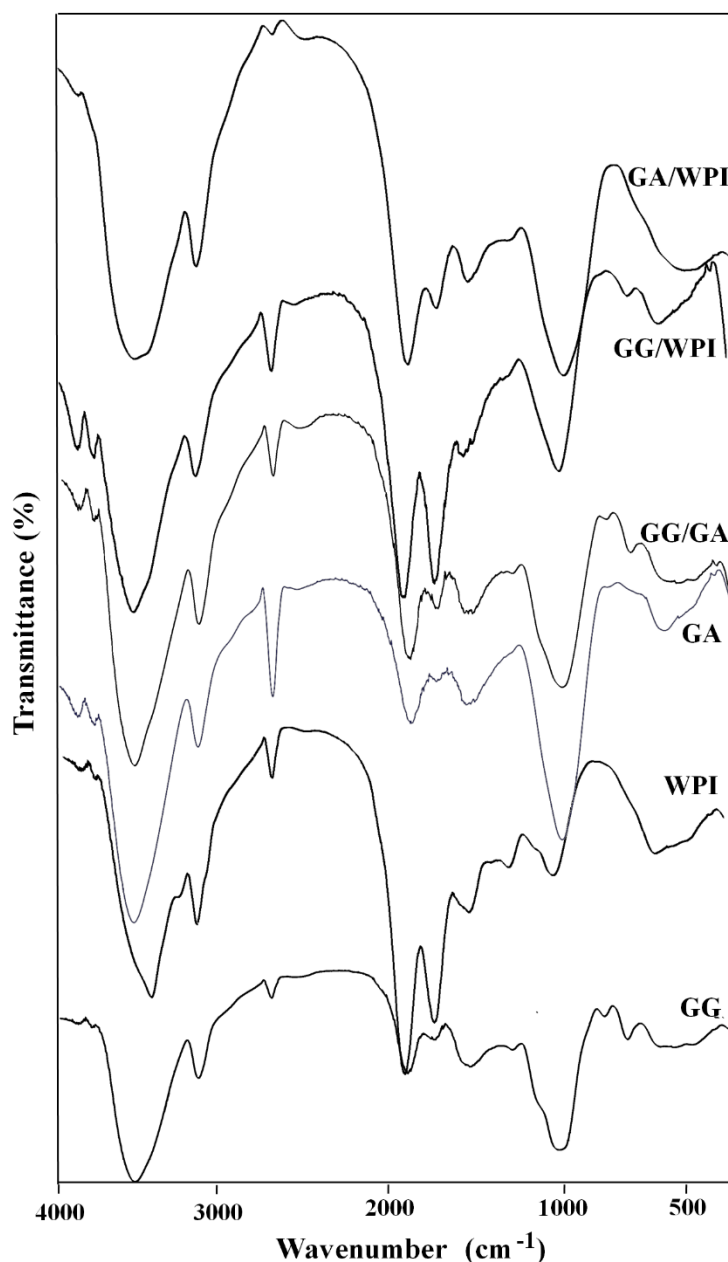
شکل ۵، طیف FT-IR را برای ریزپوشینه‌ها نشان می‌دهد. با مقایسه طیف به دست آمده برای ریزپوشینه‌های صمغ گوار (شکل ۵) با صمغ گوار خالص (شکل ۴)، هیچ پیک جدیدی در ریزپوشینه‌های

صمغ گوار یافت نشد که این به عدم تولید باند شیمیایی بین صمغ گوار و ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی اشاره می‌کند. این مشاهدات، به دام انداختن فیزیکی عصاره کاکوتی درون پوشانی شده را در ماتریکس صمغ گوار بدون برهمکنش‌های شیمیایی تایید می‌کند. با این حال، در سایر ریزپوشینه‌ها، تغییراتی در طیف FT-IR پدید آمد. برای ریزپوشینه‌های پایدار شده با ایزوله پروتئین آب پنیر، بیشترین تغییرات به باندهای کششی در ۱۶۵۲ و ۱۷۰۳ گروه‌های C=O آمید نوع اول مربوط می‌شود که به شدت افزایش یافته است. تغییر دیگر در طیف ایزوله پروتئین آب پنیر بعد از متصل شدن به عصاره کاکوتی، کاهش شدت گروه‌های C-N در ۶۶۷ می‌باشد. این تغییرات همچنین برای ریزپوشینه‌های صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر مشاهده شدند که نشان می‌دهد برهمکنش‌های جدیدی بین زنجیره‌های ایزوله پروتئین آب پنیر و ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی رخ داده است. برای ریزپوشینه‌های صمغ عربی در مقایسه با صمغ عربی خالص، باندهای دوگانه C=O یا C=C در پیک ۱۰۶۷ افزایش یافت. در نهایت آخرین تغییر در طیف ریزپوشینه‌ها (بجز صمغ گوار و صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر)، ظهور یک پیک جذبی جدید در ۲۸۱۸ برای گروه‌های C-H می‌باشد. همه داده‌ها نشان می‌دهند که اجزای عصاره کاکوتی با زنجیره‌های پروتئین یا پلی ساکارید از طریق باندهای آمیدی یا هیدروژن برهمکنش داشته‌اند. نتایج ما با تحقیقات قبلی مطابقت دارند (امامبکس و تایلور ۲۰۰۳؛ تایلور و همکاران ۲۰۰۹). با این وجود، باقری و همکاران (۲۰۱۳)، هیچ برهمکنش کوالانسی را برای ریزپوشینه‌های عصاره هسته خرما- ایزوله پروتئین آب پنیر گزارش نکردند. همچنین در تحقیق قبلی این گروه پژوهشی (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷)، به دام انداختن فیزیکی اسانس کاکوتی در ماتریکس پکتین توسط آنالیز FT-IR تایید شد.



شکل ۴- طیف FT-IR از عصاره کاکوتی و پودر خالص مواد دیواره

Figure 4- FT-IR spectra of *Ziziphora clinopodioides* (ZE) extract and neat powder of wall materials



شکل ۵- طیف FT-IR ریزپوشینه‌های عصاره کاکوتی پایدار شده به وسیله ترکیبات مختلف مواد دیواره

Figure 5- FT-IR spectra of *Ziziphora clinopodiodes* extract microcapsules stabilized by different wall materials

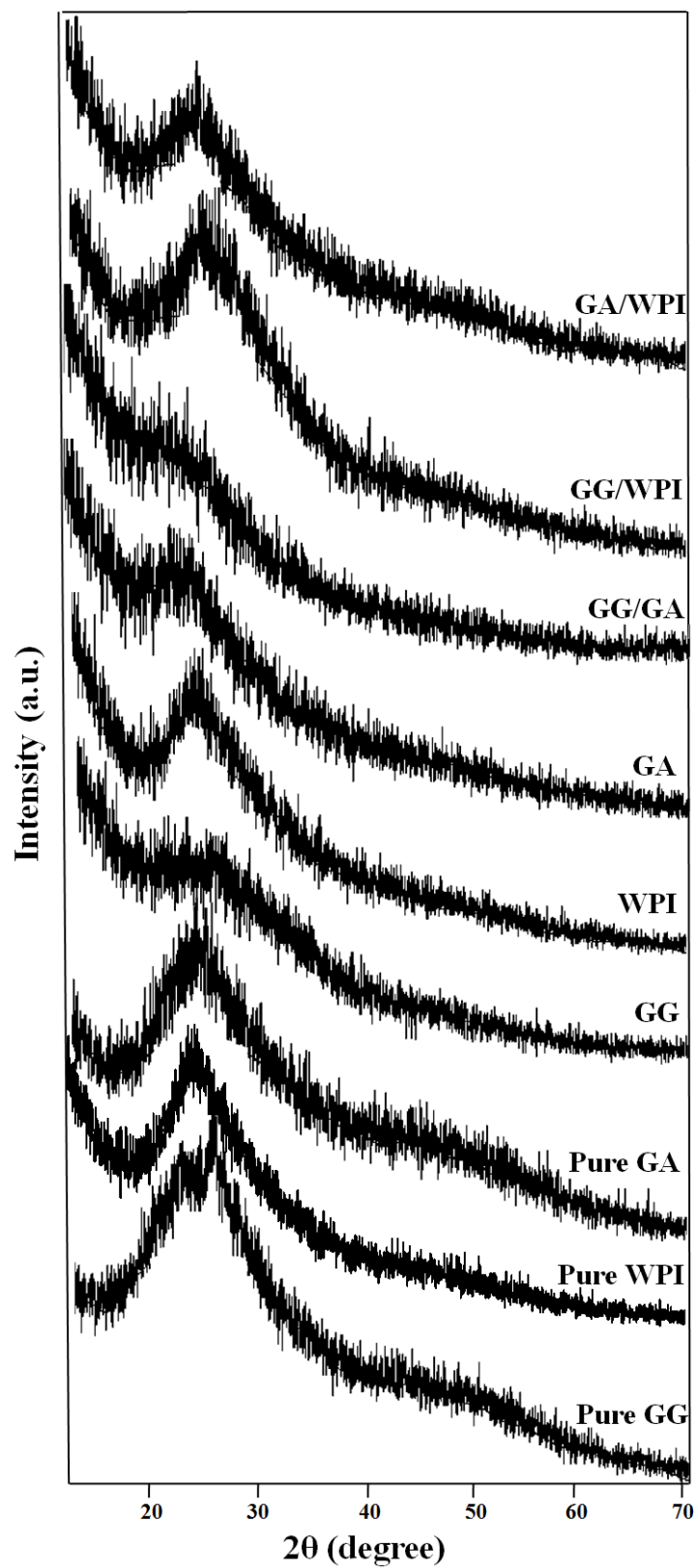
آزمون پراش اشعه X

الگوهای XRD برای صمغ گوار، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی و پودر ریزپوشنه‌های آنها به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در شکل ۶ آمده‌اند. نتایج XRD، نوعی ساختار نیمه بلورین برای صمغ گوار، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی خالص با یک پیک پهن در $2\theta = 20^\circ$ را نشان داد. شاخص بلورینگی برای صمغ

گوار، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی به ترتیب ۳۱/۱۱٪، ۲۶/۴۵٪ و ۲۳/۱۹٪ به دست آمد. در مطابقت با نتایج XRD، گزارش‌هایی برای صمغ گوار (اراته و همکاران ۲۰۱۵)، ایزوله پروتئین آب پنیر (ساوراب و همکاران ۲۰۱۳) و صمغ عربی (لیو و همکاران ۲۰۱۶) ارائه شده است. ساختار خطی صمغ گوار در مقایسه با صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر منجر به افزایش

درجه بلورینگی با توجه به نظم بیشتر بین زنجیره‌های ماکرومولکول‌ها می‌شود (جومل و همکاران ۱۹۹۶). همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، شاخص بلورینگی مواد دیواره بعد از تولید ریزپوشینه‌ها به شدت کاهش یافته است. با این حال، این کاهش برای نمونه‌های حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر کم بوده و شدت پیک اشاره شده برای ریزپوشینه‌های پایدار شده با ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی یا در ترکیب با صمغ عربی و صمغ گوار به آرامی کاهش یافت. شاخص بلورینگی برای ریزپوشینه‌های پوشیده شده با صمغ گوار، صمغ عربی و ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب ۶/۵۴٪، ۲۳/۱۳٪ و ۹/۷۶٪ به دست آمد. شاخص بلورینگی برای ریزپوشینه‌های صمغ گوار/ صمغ عربی، صمغ گوار/ ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب ۱۱/۵٪، ۲۵/۲۱٪ و ۱۹/۶۶٪ محاسبه شد. با توجه به اعمال فرآیند سونیکاسیون یکسان و شرایط خشک کردن برای تمامی نمونه‌ها، این نتایج نشان می‌دهد که عصاره کاکوتی هیچ تاثیری بر روی بلورهای ایزوله پروتئین آب پنیر نداشته است اما آن، ساختار عوامل درون پوشانی پلی ساکاریدی را تخریب می‌کند. الگوی XRD مشابه در تحقیق قبلی ما بر روی درون پوشانی اسانس کاکوتی به وسیله ایزوله پروتئین آب پنیر و پکتین

گزارش شد (حسین نیا و همکاران ۲۰۱۷). با توجه به نتایج آنالیز FT-IR، برهمکنش‌های شیمیایی بین مواد دیواره و عصاره کاکوتی وجود دارد. بنابراین، از تفاوت موجود در الگوهای XRD ریزپوشینه‌ها می‌توان نتیجه گیری کرد که اتصال ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی به زنجیره‌های ایزوله پروتئین آب پنیر از طریق گروه‌های جانبی آمینو اسیدها انجام شده و به این ترتیب هیچ تغییری در نظم زنجیره‌های ایزوله پروتئین آب پنیر رخ نداده است. ترکیب عصاره کاکوتی، برهمکنش‌های بین مولکولی را کاهش داد و نواحی آرایش منظم صمغ عربی و صمغ گوار را مختل کرد و به این ترتیب ماهیت بلورین آنها را کاهش داد. نتایج FT-IR نشان می‌دهد که صمغ گوار هیچ برهمکنش کوالانسی با اجزای عصاره کاکوتی ندارد اما با توجه به الگوهای XRD، حتی به دام انداختن فیزیکی عصاره کاکوتی در ماتریکس صمغ گوار توانست در نظم ساختار اختلال ایجاد کند. مشابه نتایج این پژوهش در الگوهای XRD ریزپوشینه‌های پایدار شده با ایزوله پروتئین آب پنیر برای درون پوشانی روغن دانه annatto (سیلوا و همکاران ۲۰۱۶)، اسانس رزماری (فرناندز و همکاران ۲۰۱۴) و کورکومین (لیو و همکاران ۲۰۱۶) نیز هیچ تغییری گزارش نشده است.



شکل ۶- الگوهای XRD هیدرو کلونید های خالص و ریزپوشینه‌های عصاره کاکوتی پایدار شده به وسیله آنها

Figure 6- XRD patterns of pure hydrocolloids and *Ziziphora clinopodioides* extract microcapsules stabilized by thereof

نتیجه گیری

در این پژوهش، کارایی مواد دیواره مختلف و ترکیب آنها در درون پوشانی عصاره کاکوتی مورد ارزیابی قرار گرفت. ایزوله پروتئین آب پنیر و ترکیب صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب کمترین اندازه ذرات و بهترین کارایی درون پوشانی را نشان دادند. در بررسی محتوای فنولی کل، مخلوط صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر در حفاظت از ترکیبات فنولی عصاره کاکوتی بهتر عمل کردند که منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی ریزپوشینه‌ها شد. تصاویر SEM نشان داد که تولید موفق ریزپوشینه‌ها با صمغ عربی، ایزوله پروتئین آب پنیر و صمغ گوار امکان پذیر می‌باشد اما بهتر است ترکیب آنها استفاده شود. زمانی که ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ عربی مخلوط شد، ریزپوشینه‌های کروی با بهترین ویژگی‌های مورفولوژیکی به دست آمدند. شکل گیری برهمکنش‌های جدید بین صمغ عربی، ایزوله پروتئین آب

پنیر و اجزای عصاره کاکوتی به وسیله آنالیز FT-IR تایید شد. اما آزمون XRD نشان داد که این برهمکنش‌ها موجب تغییر خصوصیات ساختاری بیوپلیمرها می‌شوند. با این حال، زمانی که ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی یا در ترکیب با پلی ساکاریدها استفاده شد، علی رغم تشکیل باند جدید، ساختار نیمه بلورین را حفظ کرد. به طور کلی با مقایسه مواد دیواره می‌توان نتیجه گرفت که ایزوله پروتئین آب پنیر بهترین عامل درون پوشانی است اما کارایی آن در نتیجه مخلوط شدن با سایر بیوپلیمرها افزایش می‌یابد. سازگاری ایزوله پروتئین آب پنیر با صمغ عربی بیشتر از صمغ گوار است و با توجه به نتایج، ترکیب صمغ عربی/ ایزوله پروتئین آب پنیر بهترین رفتار را نشان می‌دهد. به منظور بررسی عملکرد این ریزپوشینه‌ها و کاربردها در فرمولاسیون غذایی به مطالعات بیشتری نیاز است.

منابع مورد استفاده

- اکرمی م، قنبرزاده ب، پورظفر ف، مرتضوی ع، دیناروند ر و دهقان نیا ج، ۱۳۹۵، نانوکمپلکس‌های صمغ عربی- کازئینات حامل بتا کاروتن (۲): بررسی اندازه ذرات، پتانسیل زتا، مورفولوژی و کارایی انکپسولاسیون. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۶(۴)، ۷۷۸-۷۶۳.
- سوخته زاری ش، الماسی ه، پیرسا س، زندی م و پیروزی فرد خ، ۱۳۹۶، بررسی خصوصیات فیزیکی و آنتی اکسیدانی فیلم فعال سلولز باکتریایی حاوی عصاره گیاه تشنه داری (*Scrophularia striata*). نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۷(۲)، ۶۲-۵۱.
- شهبازی ی و موسوی م، ۱۳۹۶، بررسی تاثیر اسانس کاکوتی کوهی و عصاره متانولی پوست انار بر ویژگی‌های فیزیکی، مکانیکی و ضدباکتریایی فیلم خوراکی کیتوزان. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۷(۲)، ۱۲۱-۱۳۴.
- Ach D, Briancon S, Dugas V, Pelletier J, Broze G and Chevalier Y, 2015. Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with Acacia gum. Coll Surf A Phys Eng Asp 481:367-374.
- Almasi H, Zandi M, Beigzadeh S, Haghju S and Mehrnow N, 2016. Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica Dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: II. Antioxidant activity and release properties. Journal of Microencapsulation 33(5): 449-459.
- Bagheri L, Madadlou A, Yarmand M and Mousavi ME, 2013. Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. Food Research International 51: 866-871.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, and Idaomar M, 2008. Biological effects of essential oils: a review. Food and Chemical Toxicology 46(2): 446-475.

- Bakry AM, Fang Z, Ni Y, Cheng H, Chen YQ and Liang L, 2016. Stability of tuna oil and tuna oil/peppermint oil blend microencapsulated using whey protein isolate in combination with carboxymethyl cellulose or pullulan. *Food Hydrocolloids* 60:559-571.
- Carneiro HCF, Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD, 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering* 115:443-451.
- de Vos P, Faas MM, Spasojevic M and Sikkema J, 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20: 292-302.
- di Battista CA, Constenla D, Ramírez-Rigo MV and Piña J, 2015. The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology* 286: 193–201.
- Dong Z, Ma Y, Hayat K, Jia C, Xia S and Zhang X, 2011. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering* 104: 455-460.
- Donsì F, Annunziata M, Sessa M and Ferrari G, 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Sciences and Technology* 44: 1908-1914.
- El-Said MM, Haggag HF, El-Din HMF, Gad AS and Farahat AM, 2014. Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. *Annals of Agricultural Science* 59(2): 207-212.
- Emmambux NM and Taylor JRN, 2003. Sorghum kafirin interaction with various phenolic compounds. *Journal Science Food Agriculture* 83(5): 402–407.
- Eratte D, McKnight S, Gengenbach TR, Dowling K, Barrow CJ and Adhikari BPJ, 2015. Co-encapsulation and characterization of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods* 19: 882-892.
- Erçelebi EA and Ibanoglu E, 2009. Rheological properties of whey protein isolate stabilized emulsions with pectin and guar gum. *Food Research Technology* 229:281-286.
- Faridi Esfajani A, Jafari SM, Assadpoor E, Mohammadi A, 2015. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering* 165: 149-155.
- Fernandes RV, Borges SV and Botrel DA, 2014. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydrate Polymers* 101: 524-532.
- Frascareli EC, Silva VM, Tonon RV and Hubinger MD, 2012. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing* 90: 413-424.
- Gastone F, Tosco T and Sethi RJ, 2014. Guar gum solutions for improved delivery of iron particles in porous media (Part 1): Porous medium rheology and guar gum-induced clogging. *Journal of Contaminant Hydrology* 166: 23-33.
- Ghanbarzadeh B, Almasi H and Entezami AA, 2010. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11: 697-0702.
- Haghju S, Beigzadeh S, Almasi H and Hamishehkar H, 2016. Chitosan films incorporated with nettle (*Urtica dioica* L.) extract-loaded nanoliposomes: I. Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Journal of Microencapsulation* 33(5): 438-448.
- Hosseinnia M, Alizadeh Khaledabad M and Almasi H, 2017. Optimization of *Ziziphora clinopodioides* essential oil microencapsulation by whey protein isolate and pectin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 958-966.
- Jumel K, Harding SE and Mitchell JR, 1996. Effect of gamma irradiation on the macromolecular integrity of guar gum. *Carbohydrate Research* 282: 223–236.
- Khodaparast H, Hosein M, Sangatash M, Karazian M, Habibi Najafi R, Beiraghi MB and Toosi S, 2007. Effect of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* on yoghurt starts culture activity. *World Applied Sciences Journal* 2(3): 194-197.

- Kuck LS and Noreña CPZ, 2016. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry* 194: 569-576.
- Kuck LS, Wesolowski JL and Noreña CPZ, 2017. Effect of temperature and relative humidity on stability following simulated gastro-intestinal digestion of microcapsules of Bordo grape skin phenolic extract produced with different carrier agents. *Food Chemistry* 230: 257-264.
- Liu W, Chen XD, Cheng Z and Selomulya C, 2016. On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *Journal of Food Engineering* 169: 189-195.
- Mahdavee Khazaei K, Jafari SM, Ghorbani M, Hemmati Kakhki A, 2014. Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers* 105: 57-62.
- Mehyar GF, Al-Isamil KM, Al-Ghizzawi HM and Holley RA, 2014. Stability of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil in microcapsules made of whey protein isolate, guar gum, and carrageenan. *Journal of Food Science* 79(10): 1939-1949.
- Nayak AK, Das B and Maji R, 2012. Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 51: 1070-1078.
- Parthasarathi C and Anandharamakrishnan B, 2016. Enhancement of oral bioavailability of vitamin E by spray-freeze drying of whey protein microcapsules. *Food and Bioproducts Processing* 100: 469-476.
- Pourjavaher S, Almasi H, Meshkini S, Pirsas S and Parandi E, 2017. Development of a colorimetric pH indicator based on bacterial cellulose nanofibers and red cabbage (*Brassica oleraceae*) extract. *Carbohydrate Polymers* 156:193-201.
- Ramos L, Reinas I, Silva SI, Fernandes JC, Cerqueira MA, Pereira RN, Vicente AA, Poças MF, Pintado ME and Malcat FX, 2013. Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids* 30: 110-122.
- Ravichandran K, Palaniraj R, Saw NMT, Gabr AMM, Ahmed AR, Knorr D and Smetanska I, 2014. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology* 51(9): 2216-2221.
- Santana AA, Cano-Higueta DM, de Oliveira RA and Telis VRN, 2016. Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chemistry* 212: 1-9.
- Sarkar S and Singhal RS, 2011. Esterification of guar gum hydrolysate and gum Arabic with n-octenyl succinic anhydride and oleic acid and its evaluation as wall material in microencapsulation. *Carbohydrate Polymers* 86: 1723-1731.
- Sarkar S, Gupta S, Variyar PS, Sharma A and Singhal RS, 2012. Irradiation depolymerized guar gum as partial replacement of gum Arabic for microencapsulation of mint oil. *Carbohydrate Polymers* 90: 1685-1694.
- Saurabh CK, Gupta S, Bahadur J, Mazumder S, Variyar PS and Sharma A, 2013. Radiation dose dependent change in physiochemical: mechanical and barrier properties of guar gum based films. *Carbohydrate Polymers* 98: 1610-1617.
- Saurabh CK, Gupta S, Variyar PS and Sharma A, 2016. Effect of addition of nanoclay, beeswax, tween-80 and glycerol on physicochemical properties of guar gum films. *Industrial Crops and Products* 89: 109-118.
- Serrano-Cruz MR, Villanueva-Carvajal A, Rosales AJ, Dávila JFR and Dominguez-Lopez A, 2013. Controlled release and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin. *LWT-Food Science and Technology* 50: 554-561.
- Shahbazi Y and Shavisi N, 2016. Interactions of *Ziziphora clinopodioides* and *Mentha spicata* essential oils with chitosan and ciprofloxacin against common food-related pathogens. *LWT - Food Science and Technology* 71: 364-369.

- Shahbazi Y, 2015a. Chemical composition and in vitro antibacterial effect of *ziziphora clinopodioides* essential oil. *Pharmaceutical Sciences* 21: 51-56.
- Shahbazi Y, 2015b. *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as potential antimicrobial agents against *Escherichia coli* O157: H7 in Doogh (Iranian Yoghurt Drink). *Journal of Pathology* 176: 1-7.
- Silva EK, Azevedo VM, Cunha RL, Hubinger MD and Meireles MA, 2016. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: Whey protein isolate versus modified starch. *Food Hydrocolloids* 56: 71-83.
- Silva VM, Vieira GS and Hubinger MD, 2014. Influence of different combinations of wall materials and homogenization pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Research International* 61: 132-143.
- Simon-Brown K, Solval KM, Chotiko A, Alfaro L, Reyes V, Liu C, Dzandu B, Kyereh E, Barnaby AG, Thompson I, Xu Z and Sathivel S, 2016. Microencapsulation of ginger (*Zingiber officinale*) extract by spray drying technology. *LWT-Food Science and Technology* 70: 119-125.
- Sliwinski EL, Roubos PJ, Zoet FD, Van Boekel MAJS and Wouters JTM, 2003. Effects of heat on physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 31: 231-242.
- Sonboli A, Atri M and Shafiei S, 2010. Intraspecific variability of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* ssp. *rigida* from Iran. *Chemistry & Biodiversity* 7: 1784-1789.
- Sukhtezari S, Almasi H, Pirsas S, Zandi M and Pirouzifard MK, 2017. Development of bacterial cellulose based slow-release active films by incorporation of *Scrophularia striata* Boiss. extract. *Carbohydrate Polymers* 156: 340-350.
- Tan SP, Kha TC, Parks S, Stathopoulos C and Roach PD, 2015. Optimizing the encapsulation of an aqueous bitter melon extract by spray-drying. *Foods* 3: 400-419.
- Taylor J, Taylor JRN, Belton PS and Minnaar A, 2009. Kafirin microparticle encapsulation of catechin and sorghum condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(16): 7523-7528.
- Thombare N, Jha U, Mishra S and Siddiqui MZ, 2016. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 88: 361-372.
- Weinbrecky F, Minory M and De kruif CG, 2004. Microencapsulation of oils using whey protein/gum arabic coacervates. *Journal of Microencapsulation* 21(6): 667-679.
- Zhang HY, Arab Tehrany E, Kahn CJF, Ponçot M, Linder M and Cleymand F, 2012. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 88(2): 618-627.

Evaluation of the properties of microcapsules containing *Ziziphora clinopodiodes* extract stabilized by gum Arabic, whey protein isolate, guar gum and their combinations

M Hosseinnia¹, H Almasi^{*2} and M Alizadeh Khaledabad²

Received: August 26, 2018

Accepted: October 2, 2018

¹PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

²Associate Professor and Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

*Corresponding author: Email: h.almasi@urmia.ac.ir

Introduction: Due to the increasing of awareness and consumer demand for healthy and natural foods without synthetic preservatives, in the recent years the food industry has paid increasing attention to using natural preservatives. Plant extracts and essential oils (EO) are a broad class of natural food preservatives that are generally recognized as safe (GRAS). Microencapsulation is the most common technique that has been utilized to increase the stability of bioactive compounds. The benefits of microencapsulation of herbal extracts and essential oils includes: protection of flavor components from evaporation and destructive changes, promotion of easier handling, better mixing with food matrix, release controlling and increasing bioavailability (Donsi et al., 2011). *Ziziphora clinopodiodes* (known as Kakuti) is one of the most commonly consumed herbal plants belonging to the family of *Lamiaceae* and it is native to Turkey and Iran. The major phenolic compounds of *Z. clinopodiodes* essential oil (ZEO) or its extract (ZE) are include pulegone, 1,8-cineole, thymol, carvacrol, p-cymene and limonene (Sonboli et al., 2010). The functional properties of *Z. clinopodiodes* extract (ZE) and ZEO including strong antioxidant, antibacterial, antifungal and antiviral activities have been fully recognized in previous researches. The selection of a suitable wall material is critical to have a successful microencapsulation. Whey protein isolate (WPI), gum Arabic (GA) and guar gum (GG) are some of most frequently used biopolymers for encapsulation of bioactive compounds in food industry applications (Kuck et al., 2017). There is no report on the encapsulation of ZEO or ZE. The aim of this research was to evaluate and compare the potential of GA, WPI and GG either alone or in combination with each other in the microencapsulation of *Ziziphora clinopodiodes* extract (ZE) by ultrasonication method.

Material and methods: The GG, GA and WPI were used for encapsulation of ZE in the single form or in combination with each other. After encapsulation, the suspensions were freeze dried and the powder of microcapsules was used for further analyses. The particle size, zeta potential, and encapsulation efficiency were determined. Also, the total phenol content, antioxidant activity and color properties of microcapsules were analyzed. Structural and morphological properties of them were also characterized by FT-IR, XRD and SEM analyses. The one-way ANOVA method by using SPSS software was used for statistical analysis of obtained data.

Results and discussion: Particle size analysis showed that the WPI stabilized sample had the lowest particle size (292.7 nm). The performance of GA and GG was improved after combination with WPI. By considering encapsulation efficiency (EE%), particle size, PDI and Zeta potential values, the compatibility of WPI with GA was more than GG. The highest EE% (86.91%) belonged to GA/WPI sample. Total phenol content and antioxidant activity were in their maximum level for GA/WPI mixture. Among the used wall materials, GA had the highest Zeta potential (-20.5 mV).

Since the isoelectric point of WPI is around pH 5 and pH of dispersions was about 7, the net charge of these microcapsules was also negative (-15.5 mV). GG is a weak polyelectrolyte and had the lowest Zeta potential (-6.6 mV). All of the powders had a whitish color. There was no significant difference between L^* and a^* values of samples ($p>0.05$). But b^* was increased significantly when WPI and GA were used instead of GG. Yellowish color of WPI and GA caused to increase b^* . This yellow appearance was more distinct in GA in comparison to WPI. The initial TPC of ZE before enclosing in microcapsules was equal to 346.91 mg GAE.100g⁻¹ DW. The TPC of all samples was lower than initial amount in fresh ZE. Between microcapsules, those that had the higher EE showed a higher TPC too. TPC of GA was higher than WPI followed by GG. When the mixture of wall materials was used, TPC was increased and the GA/WPI sample had the highest TPC (212.81 mg GAE.100g⁻¹ DW). GG and GA/WPI with 21.67% and 32.11% respectively, had the lowest and highest antioxidant activity. Spherical shape of microcapsules was observed by SEM for all samples except to GG/GA. WPI stabilized microcapsules exhibited the lowest particle size with uniform distribution. Polydispersity and mean diameter was higher for GA microcapsules and these parameters increased for GG microcapsules. FT-IR analysis confirmed the formation of new interactions between wall materials (except to GG) and ZE ingredients. XRD test revealed that the crystallinity of wall materials was decreased after ZE incorporation but WPI contained samples were resistant against structural alterations. Crystallinity index of GG, GA and WPI coated microcapsules was equal to 6.54%, 23.13% and 9.76%, respectively. Crystallinity index of 11.5%, 25.21% and 19.66% was calculated for GG/GA, GG/WPI and GA/WPI microcapsules, respectively. By considering of applying similar sonication and drying conditions on all samples, these results indicate that the ZE incorporation had no distinct effect on crystallinity of WPI but it disrupt the structure of polysaccharide based encapsulating agents.

Conclusion: In this work the performance of different wall materials and their combinations was evaluated in microencapsulation of ZE. WPI and GA/WPI combination showed the lowest particle size and the best encapsulation efficiency, respectively. In the total phenolic content study, the mixture of GA/WPI performed better in protecting the ZE phenolic compounds leading to increase the antioxidant activity of microcapsules. SEM images indicated that the successful fabrication of microcapsules with GA, WPI and GG is possible but it is better to use their combination. The best morphological characteristics with spherical microparticles were obtained when WPI was mixed with GA. Formation of new interactions between GA, WPI and ZE ingredients was approved by FT-IR analysis. But XRD test indicated that these interactions lead to change in structural characteristics of biopolymers. However, in spite of new bond formation, WPI preserved its semi-crystalline structure when used alone or in combination with polysaccharides. Generally, by in comparison of individual wall materials, the WPI was the best encapsulating agent but its performance was increased via blending with other biopolymers. The compatibility of WPI with GA was more than GG and by considering the set of results; the combination of GA/WPI presented the best behavior. Further studies are required for exploring the performance of these microcapsules for their application in food formulation.

Keywords: microencapsulation, *Ziziphora clinopodiodes* extract, wall materials, particle size, morphology