

## ریزپوشانی ویتامین D با استفاده از موسیلاژ شاهی و ایزوله پروتئین سویا به روش توده‌سازی مرکب

نفیسه جان‌نثاری<sup>1</sup>، میلاد فتحی<sup>2\*</sup>، سیدجمال مشتاقیان<sup>3</sup>، علیرضا عباس‌پور راد<sup>4</sup>

- 1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
- 2- دانشیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران  
\* نویسنده مسئول (mfathi@cc.iut.ac.ir)
- 3- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، ایران
- 4- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و علوم زیستی، دانشگاه کورنل، نیویورک، آمریکا

### چکیده

تاریخ دریافت: 1397/08/28  
تاریخ پذیرش: 1397/11/11

### واژه‌های کلیدی

ایزوله پروتئین سویا  
ریزپوشانی  
موسیلاژ شاهی  
ویتامین D

ویتامین D نقش مهمی در حفظ سلامتی و عملکرد اندام‌های بدن انسان دارد. مطالعه‌های متعددی بر نقش آن در پیشگیری از بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های قلبی، سیستم ایمنی، اسکلتی و بیماری‌های عفونی تأکید نموده‌اند. در این پژوهش فرایند ریزپوشانی ویتامین D به روش توده‌ای شدن با استفاده از موسیلاژ شاهی به‌عنوان یک هیدروکلوئید جدید و ایزوله پروتئین سویا بررسی و اثرات نسبت هسته به پوسته و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید ارزیابی گردید. نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق نشان داد هر دو پارامتر موردبررسی اثر معنی‌داری بر راندمان و بارگذاری ریزپوشانی داشتند ( $P < 0/05$ ). استفاده از نسبت هسته به پوسته و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید  $0/3$  منجر به تولید میکروکپسول‌ها با بهترین ویژگی‌های کاربردی گردید. راندمان ریزپوشانی و بارگذاری به ترتیب در دامنه 20-90 و 2-27 درصد بود. براساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی این میکروکپسول‌ها تقریباً کروی و دارای سطح ناهمواری بودند. متوسط اندازه ذرات  $57/2 \pm 1/2$  میکرومتر بود. آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نشان‌دهنده شکل‌گیری اتصالات الکترواستاتیکی بر اثر واکنش توده‌ای شدن بین گروه کربوکسیل موسیلاژ شاهی و گروه آمین ایزوله پروتئین سویا بود. نتایج این تحقیق مبین امکان استفاده از دو بیوپلمر موسیلاژ دانه شاهی و پروتئین سویا برای ریزپوشانی ترکیبات آب‌گریز مانند ویتامین D بود.

### مقدمه

معمولاً به دو شکل  $D_2$  (ارگوکلسی‌فرول<sup>1</sup>) و  $D_3$  (کولی‌کلسفرول<sup>2</sup>) وجود دارد. ویتامین  $D_2$  با تابش اشعه ماوراءبنفش از ارگوسترول<sup>3</sup> گیاهان و ویتامین  $D_3$  در پوست انسان سنتز می‌شود. این ویتامین جذب روده‌ای کلسیم و تشکیل طبیعی استخوان را افزایش می‌دهد

ویتامین D به‌عنوان یک ویتامین محلول در چربی نقش مهمی در سلامت استخوان‌ها دارد. در نوزادان کمبود ویتامین D منجر به نرمی استخوان شده و از سوی دیگر مصرف بیش از حد این ویتامین خطر ابتلا به هایپرکلسمی و مشکلات کلیوی را افزایش می‌دهد (Verkaik- Kloosterman, Seves, & Ocké, 2017). این ویتامین

<sup>1</sup> Ergocalciferol  
<sup>2</sup> Cholecalciferol  
<sup>3</sup> Ergosterol

مخالف مخلوط شوند دو فاز محلول و توده‌ای شکل می‌گیرد. فاز توده‌ای، محلول پلیمر غلیظ‌شده است که در فرایند ریزپوشانی شرکت می‌کند و فاز رویی، محلولی رقیق است و به‌عنوان محیطی که در آن کپسول‌ها تشکیل می‌شوند، ایفای نقش می‌کند (Thies, 2007).

Sutaphanit و Chitprasert (2014) از توده‌سازی ساده ژلاتین، جهت ریزپوشانی اسانس روغنی ریحان استفاده کردند. آنها نشان دادند در صورتی که میزان ژلاتین استفاده‌شده به‌عنوان دیواره کپسول از 4 درصد (وزنی/حجمی) کمتر باشد علاوه بر کاهش مقدار میکروکپسول تولیدی، راندمان ریزپوشانی نیز کاهش می‌یابد. همچنین کاربرد بیش از 16 درصد (وزنی/حجمی) ژلاتین، محلولی با ویسکوزیته زیاد ایجاد می‌کند که ویسکوزیته زیاد آن باعث ایجاد اختلال در مهاجرت مواد کپسوله‌کننده به سطح قطره‌های روغن می‌شود (Sutaphanit & Chitprasert, 2014).

Kiani, Fathi و Ghasemi (2017) ویتامین D را با استفاده از نانوحامل‌های لیپیدی ریزپوشانی کرده و برای غنی‌سازی شیر مورد استفاده قرار دادند (Kavousi, Fathi, & Goli, 2017).

Fahami و Fathi (2018) به‌منظور تولید نانوالیاف حاوی ویتامین A از موسیلاژ شاهی و پلی‌وینیل الکل استفاده کردند. آنها گزارش کردند نانوالیاف تولیدشده دارای مقاومت حرارتی بیشتری نسبت به هریک از ترکیبات دیواره بوده لذا به‌طور مؤثری ویتامین را در برابر فرایندهای حرارتی محافظت می‌کند (Fahami & Fathi, 2018; Kavousi et al., 2017).

مطالعه‌های پیشین نشان داده است صمغ استخراج‌شده از دانه‌ها، هیدروکلوئیدهای مطلوبی می‌باشند. این ترکیبات ارزان، غیرسمی، سازگار با محیط‌زیست و غیرآلاینده در طی تولید می‌باشند. بررسی برهم‌کنش موجود بین بیوپلیمرهای پروتئین-پلی‌ساکارید به‌منظور یافتن کاربرد آنها در صنایع غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. براساس تحقیق‌های انجام‌شده ذرات پوشیده‌شده با کمپلکس پروتئین-پلی‌ساکارید در برابر تنش محیطی پایدارتر از ذرات پوشیده‌شده با پروتئین به تنهایی هستند.

(Park, Garcia, Shin, & Kim, 2017). انواع ویتامین‌ها (محلول در آب و محلول در چربی) می‌توانند با استفاده از فناوری‌های جدید محافظت و کپسوله شوند. هدف از کپسوله‌کردن این مواد افزایش طول عمر و حفاظت از آنها در برابر شرایط نامناسب مانند نور، اکسیژن و دمای بالا می‌باشد (Gouin, 2004).

سویا یکی از اعضای خانواده حبوبات با درصد پروتئین بالاست. ایجاد طعم‌های نامطلوب، حضور مواد ضدتغذیه‌ای و پایین‌بودن محتوای پروتئین آرد سویا، لزوم تولید محصولاتی همچون کنسانتره و ایزوله پروتئین سویا که میزان پروتئین بالاتر و ویژگی‌های عملکردی بهتری دارند را نمایان می‌کند. خالص‌ترین شکل پروتئین سویا، ایزوله پروتئین سویا بوده که عبارت است از فراکسیون اصلی پروتئین سویا که پس از حذف اجزای غیرپروتئینی تولید می‌شود. ایزوله پروتئین سویا به شکل پودری، گرانولی و رشته‌ای وجود دارد و دارای حداقل 90 درصد پروتئین می‌باشد (Reuter, Jocher, Hornstein, Mönting, & Schempp, 2007).

موسیلاژهای گیاهی منابع باارزشی از کربوهیدرات‌های قابل‌استفاده در فراوری مواد غذایی هستند که به راحتی در دسترس بوده و قیمت مناسبی دارند. گیاه شاهی با نام علمی لیپیدیوم ساتیوم<sup>1</sup> از خانواده شب‌بوینان و گیاهی علفی است. دانه‌های شاهی بعد از خیساندن و جذب آب، لایه موسیلاژی شفاف و چسبناکی تولید می‌کند. این لایه موسیلاژی به‌دلیل حضور گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل و نیز حضور دو اسید ارونیک گالاکتورونیک و گلوکورونیک (مجموعاً 15 درصد) دارای ماهیت پلی‌الکترولیت است (Karazhiyan et al., 2009).

توده‌ای‌شدن<sup>2</sup> که به آن جداسازی فازی هم گفته می‌شود در سال 1952 توسط شرکت ملی کش رجیستر در آمریکا توسعه یافت و به‌عنوان یک تکنیک مهم ریزپوشانی توسط بسیاری از محققین در نظر گرفته شده است. در این فرایند هنگامی که دو یا تعداد بیشتری از ترکیبات دارای طبیعت پلی‌الکترولیت با بار

<sup>1</sup> *Lepidium sativum*

<sup>2</sup> Coacervation

اضافی از صافی پارچه‌ای عبور داده شد. سپس طی دو روز در آون فن‌دار در دمای 60 درجه سانتی‌گراد خشک گردید (Karazhiyan et al., 2009).

#### تولید میکروکپسول

میکروکپسول‌ها به روش توده‌سازی مرکب مطابق روش Kavousi و همکاران (2017) تولید شدند. برای این منظور یک دیسپرسیون روغنی (روغن آفتاب‌گردان) ویتامین D (10 درصد ویتامین D) به محلول آبی 3 درصد ایزوله پروتئین سویا در دمای 25 درجه سانتی‌گراد اضافه و در 18000 دور در دقیقه به مدت 4 دقیقه هم‌وزن (IKA، ساخت آلمان) شد. pH با محلول سود (NaOH) 0/1 M تا 8 افزایش داده شد و سپس محلول آبی محتوای 1 درصد صمغ شاهی در دمای 40 درجه سانتی‌گراد اضافه و سیستم به مدت 10 دقیقه هم‌زده شد. pH با محلول اسید کلریدریک (HCl) 0/1 M روی 3/4 (براساس نقطه ایزوالکتریک پروتئین و انجام پیش‌تست‌ها این pH به‌عنوان بهترین pH برای تشکیل توده‌ها در نظر گرفته شد) تنظیم گردید و سپس محلول دو فاز حاصل به مدت 15 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در 10000 دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ فاز توده‌ای ته‌نشین شده جدا گردید و پس از انجماد در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد، توده‌ها توسط خشک‌کن انجمادی خشک شدند (Kavousi et al., 2017). در این تحقیق اثر دو متغیر نسبت هسته به دیواره (1:10، 2:10، 3:10) و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید (1:1، 1:2 و 1:3) بررسی شد.

#### اندازه‌گیری راندمان کارایی و بارگذاری ریزپوشانی

برای اندازه‌گیری کارایی ریزپوشینه‌کردن ویتامین D در میکروکپسول‌های ایزوله پروتئین سویا و موسیلاژ شاهی ابتدا میزان ویتامین ریزپوشینه‌دار نشده موجود در سطح کپسول‌ها اندازه‌گیری شد. برای این منظور 1 گرم کپسول همراه با 15 میلی‌لیتر هگزان به مدت 2 دقیقه در دمای اتاق با دست مخلوط و پس از عبور از کاغذ صافی به منظور جداسازی فاز روغنی پوشینه‌دار نشده از سطح میکروکپسول‌ها، بالن حاوی حلال هگزان و

Karazhiyan و همکاران (2009) نشان دادند پلیمر موسیلاژ دانه شاهی متشکل از کربوهیدرات با گروه‌های عملکردی کربوکسیل و هیدروکسیل است. حضور دو اسید ارونیک در صمغ (مجموعاً 15 درصد گالاکتورونیک و گلوکورونیک اسید) بیانگر طبیعت پلی‌الکترولیت آن می‌باشد. وزن مولکولی جزء ماکرومولکولی موسیلاژ 540 کیلودالتون گزارش شد (Karazhiyan et al., 2009).

باتوجه به کمبود ویتامین D و همچنین افت آن حین فراوری به دلیل حساسیت به نور و حرارت، دستیابی به روش‌های نوین از جمله ریزپوشانی می‌تواند سبب رفع محدودیت‌های ذکر شده گردد. بنابراین هدف از این پژوهش ریزپوشانی ویتامین D به روش توده‌ای شدن مرکب توسط موسیلاژ شاهی به‌عنوان یک هیدروکلئید بومی جدید و ایزوله پروتئین سویا و همچنین بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ریزپوشینه‌های تولیدی بود.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد

دانه شاهی به رنگ قهوه‌ای و عاری از هرگونه ناخالصی از یک عطاری در شهر اصفهان تهیه گردید. ایزوله پروتئین سویا (SPI)، درجه خلوص 90 درصد و رطوبت 15 درصد) و ویتامین D<sub>3</sub> به ترتیب از شرکت‌های جهان شیمی و داروسازی دانا تهیه شد. سدیم هیدروکسید، اسید کلریدریک و هگزان (شرکت Merk، آلمان) دارای درجه خلوص آزمایشگاهی بودند.

##### روش‌ها

##### استخراج صمغ

استخراج صمغ طبق روش Karazhiyan و همکاران (2009) انجام شد. صمغ از دانه کامل و با استفاده از آب مقطر (با نسبت آب به دانه 1:30) در pH 10 و دمای 35 درجه سانتی‌گراد استخراج گردید. آب و دانه با استفاده از همزن به مدت 15 دقیقه مخلوط شدند. سپس با استفاده از دستگاه اکستراکتور دارای صفحه چرخنده صمغ حاصل از دانه جدا و جهت خروج ذرات

دستگاه طیف‌سنجی با وضوح 0/4 بر سانتی‌متر در معرض اشعه مادون‌قرمز در محدوده عدد موج 400 تا 4000 بر سانتی‌متر قرار گرفتند (Butstraen & Salaiin, 2014).

### آنالیز آماری

به‌منظور بررسی اثر تیمارها بر خصوصیات میکروکپسول‌های بارگذاری‌شده با ویتامین از آرایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با تعداد دو تکرار استفاده شد. جهت تجزیه آماری داده‌های حاصل از نرم افزار SPSS نسخه 22 و به‌منظور مقایسه میانگین از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار ( $LSD^1$ ) در سطح اطمینان 95 درصد استفاده گردید.

### نتایج و بحث

در این تحقیق دو پارامتر نسبت هسته به دیواره (0/1)، 0/2 و 0/3 و نسبت پروتئین به پلی‌ساکارید (1، 0/5 و 0/3) به‌عنوان متغیر در نظر گرفته شد. میزان pH باتوجه به نقطه ایزوالکتریک پروتئین و انجام پیش‌تیمارها برابر 3/4 انتخاب شد. برای این منظور pHی که در آن بیشترین میزان توده‌ها تشکیل شود براساس پیش‌تست‌ها در دامنه 3 تا 4 بررسی گردید. که بیشترین وزن توده (بیشترین میزان پیوند الکترواستاتیک) در pH=3/4 حاصل گردید جدول (1) شرایط هر تیمار و پاسخ‌های به‌دست‌آمده را نشان می‌دهد. آزمونی که مجموع پاسخ‌های نرمال (به‌منظور نرمالیزه کردن اعداد، هریک از پاسخ‌های به‌دست‌آمده برای یک پارامتر بر بزرگ‌ترین پاسخ به‌دست‌آمده برای همان پارامتر تقسیم شد) آن بزرگ‌تر از سایرین بود به‌عنوان بهترین شرایط تولید ریزپوشینه انتخاب شد. باتوجه به داده‌ها، آزمون شماره 9 که در آن نسبت هسته به پوسته و نسبت بیوپلیمرها 0/3 است ریزپوشینه‌هایی با بیشترین راندمان و بارگذاری را تولید می‌کند.

ویتامین همراه با آن در دستگاه روتاری تحت‌خلأ در دمای 60 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به‌منظور حذف کامل هگزان و رسیدن به وزن ثابت، نمونه در آن با دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه قرار گرفت. پس از تبخیر کامل هگزان میزان ویتامین ریزپوشینه‌دار نشده با استفاده از روش وزن‌سنجی محاسبه شد. کارایی و بارگذاری ریزپوشینه‌کردن نیز براساس رابطه‌های (1) و (2) (Ifeduba & Akoh, 2016) با فرض ضریب نفوذ برابر ویتامین D و روغن محاسبه گردیدند (Kavousi et al., 2017).  
رابطه (1)

$$\text{ویتامین سطحی} - \text{ویتامین کل} = \frac{\text{کارایی ریزپوشانی}}{\text{ویتامین کل}} \times 100$$

رابطه (2)

$$\text{ویتامین سطحی} - \text{ویتامین کل} = \frac{\text{بارگذاری ریزپوشانی}}{\text{وزن کل دیواره}} \times 100$$

### بررسی مورفولوژی ذرات

جهت تعیین اندازه ذرات و مشاهده شکل ظاهری میکروکپسول‌های ایجادشده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (Philips، XL30، ساخت هلند) استفاده شد. مقدار کمی از میکروکپسول‌های تولیدشده روی یک سمت از نوارچسب قرار گرفت و سطح آنها درون محفظه تحت‌خلأ (Baltech، ساخت آلمان) با اتم‌های طلا پوشانیده شدند و مورفولوژی آنها توسط میکروسکوپ روبشی با ولتاژ شتاب‌دهنده 20 کیلوولت بررسی شد (Peng et al., 2014).

### طیف‌سنجی فوریه مادون‌قرمز (FT-IR)

ساختمان شیمیایی و گروه‌های عاملی مواد اولیه و میکروکپسول‌ها به‌وسیله اسپکترومتر مادون‌قرمز (FT-IR) (مدل Jasco 680 plus، شرکت شیمادزو، ساخت ژاپن) بررسی شد. جهت آماده‌سازی، ویتامین D، ایزوله سویا، موسیلاژ و میکروکپسول‌های تولیدی توسط پتاسیم برومید (نسبت نمونه به پتاسیم برمید: 1:100) با فشار زیاد به‌صورت قرص تبدیل شدند و توسط

<sup>1</sup> Least Significant Difference

جدول 1- آزمون های انجام شده به منظور ساخت میکروکپسول ویتامین D ریزپوشینه شده با موسیلاژ شاهی - ایزوله پروتئین سویا

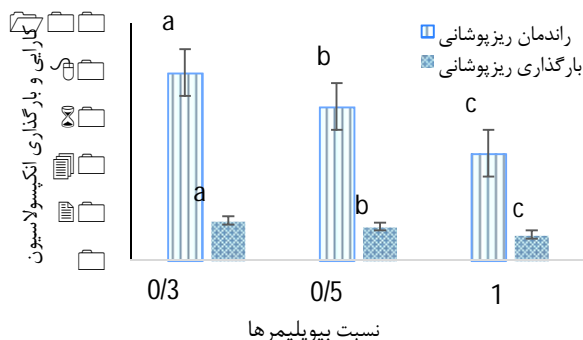
ردیف	نسبت هسته به دیواره	نسبت پروتئین به پلی ساکارید	محصول (درصد)	راندمان ریزپوشانی (درصد)	راندمان بارگذاری (درصد)	محصول نرمال	راندمان ریزپوشانی نرمال	راندمان بارگذاری نرمال	مجموع مقادیر نرمال
1	0/10	1	78/05±1/50	20/65±1/30	2/35±0/70	0/7911	0/222	0/074	1/087
2	0/20	1	94/80±0/40	45/60±1/20	8/95±0/10	0/949	0/5	0/333	1/783
3	0/30	1	97/83±1/34	69/80±1/40	21/57±0/80	0/975	0/783	0/783	2/542
4	0/10	0/50	99/05±4/20	46/00±2/00	4/60±0/30	1/00	0/50	0/166	1/666
5	0/20	0/50	88/90±1/80	66/25±1/50	13/18±0/16	0/901	0/727	0/485	2/114
6	0/30	0/50	93/15±0/90	84/90±0/60	25/60±0/80	0/939	0/933	0/933	2/806
7	0/10	0/30	95/30±2/10	62/90±0/90	6/50±0/60	0/947	0/694	0/231	1/873
8	0/20	0/30	91/10±2/10	85/50±1/10	17/40±0/80	0/926	0/944	0/629	2/500
9	0/30	0/30	87/02±3/40	90/60±1/20	26/60±0/70	0/891	1/00	1/00	2/891

نسبت بیوپلیمرها: نسبت ایزوله پروتئین سویا به موسیلاژ شاهی

### راندمان و بارگذاری ریزپوشانی

براساس نتایج حاصل، نسبت هسته به دیواره میکروکپسول، نسبت پروتئین به پلی ساکارید و اثر مشترک آنها بر کارایی ریزپوشانی و بارگذاری ویتامین اثر معنی داری داشتند ( $P < 0/05$ ). فاکتور نسبت بیوپلیمرهای شرکت کننده در واکنش یکی از پارامترهای اساسی در تشکیل توده‌ها می باشد و لذا فرایند توده‌سازی مرکب نیازمند وجود تعادل بین بیوپلیمرهای شرکت کننده می باشد (Dubin, Bock, Davis, Schulz, & Thies, 2012). اثر نسبت بیوپلیمرهای شرکت کننده بر محدوده شکل گیری کمپلکس تأثیر دارد و با تغییر نسبت‌های بیوپلیمری به دلیل تغییر در میزان بارهای ناهم نام موجود، برهم کنش بین آنها تحت تأثیر قرار خواهد گرفت. شکل (1) رابطه بین نسبت بیوپلیمرها را با تغییرات کارایی و بارگذاری ویتامین نشان می دهد. با افزایش نسبت ایزوله پروتئین سویا به موسیلاژ شاهی از 0/3 تا 1، میزان بارهای مثبت آمین برای برقراری واکنش با بارهای منفی کربوکسیل بیشتر شده و با توجه به زیاده‌بودن پتانسیل زتا در ایزوله پروتئین سویا نسبت به موسیلاژ شاهی، تعادل بار الکتریکی محیط فرایند به هم خورده و در نتیجه توده‌ای شدن کاهش می یابد. Dragosavac, Giorno, Piacentini, Vladisavljević و Holdich (2013) طی بررسی ریزپوشانی یک فاز روغنی در توده‌سازی مرکب ژلاتین ماهی و صمغ عربی نشان دادند زمانی که کل بیوپلیمر مورد استفاده به عنوان دیواره از میزان مشخصی بیشتر شود، دیواره‌ای اطراف قطره‌های روغن تشکیل نمی شود (Piacentini et al., 2013). Boonme, Sinchaipanid, Mitrevej, Junyaprasert و Wurster (2001) ریزپوشانی ویتامین A با استفاده از ژلاتین

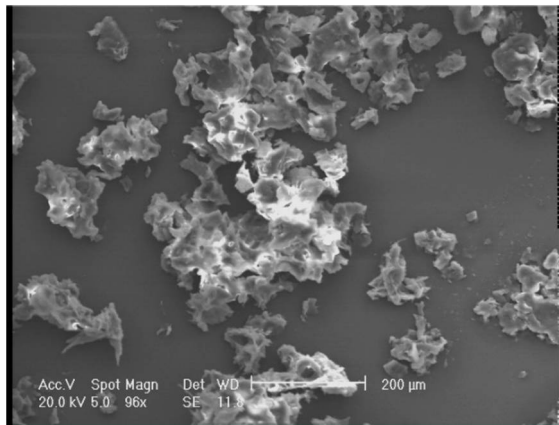
و صمغ عربی توسط تکنیک توده‌سازی مرکب را بررسی کردند و مشاهده نمودند بهترین نسبت ژلاتین به صمغ عربی برای تولید میکروکپسول‌هایی با بیشترین بارگذاری ویتامین نسبت 1:2 است (Junyaprasert et al., 2001).



شکل 1- تأثیر نسبت بیوپلیمرها بر کارایی و بارگذاری ریزپوشانی

نسبت هسته به دیواره تأثیر زیادی بر کارایی و بارگذاری ریزپوشانی دارد. بالاترین بازده ریزپوشانی باید در شرایطی ایجاد شود که میکروکپسول تولید شده دارای بیشترین پایداری مکانیکی بوده، علاوه بر این هسته به طور کامل توسط دیواره محافظت شود (Weinbreck, Tromp, & de Kruif, 2004). به طور معمول اگر نسبت هسته به دیواره از حد مشخصی بیشتر شود راندمان ریزپوشانی کاهش می یابد. زیرا در این صورت با افزایش هسته در محیط فرایند میزان پلیمر دیواره برای ایجاد پوشش در اطراف هسته کافی نبوده و بخشی از هسته به صورت ریزپوشانی نشده در محیط باقی مانده و راندمان کاهش می یابد. از سوی دیگر زمانی که مقدار هسته در فرمولاسیون

شست‌وشوی ویتامین سطحی تهیه شدند. در تمامی این اشکال میکروکپسول‌ها دارای شکلی نامنظم با سطوح ناصاف بودند. وجود دندان‌ه و سطوح ناهموار در سطح میکروکپسول‌ها را می‌توان به دلیل استفاده از خشک‌کن انجمادی دانست. حذف ذرات یخ طی تصعید می‌تواند باعث ایجاد حفره‌هایی در سطح ذرات شود (Fonte et al., 2012).



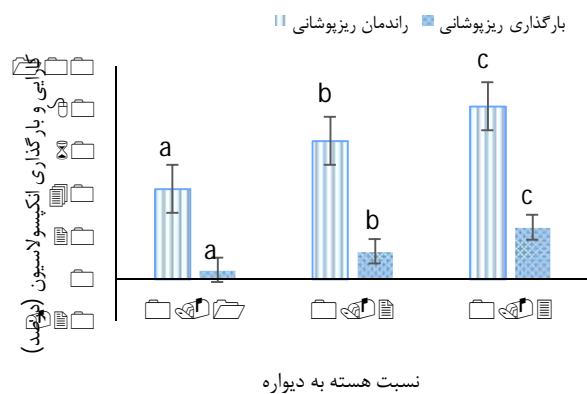
شکل 3- تصویر SEM مربوط به میکروکپسول‌های ریزپوشینه‌شده از ویتامین D

### آنالیز طیف‌سنجی فوریه مادون قرمز

طیف‌های فوریه مادون قرمز حاصل از آنالیز میکروکپسول‌های پروتئین سویا-موسیلاژ شاهی و ویتامین D در شکل (4) نشان داده شده است. براساس شکل (4) طیف موسیلاژ شاهی خالص دارای پیک‌های شاخص در عدد موج 1620 و 1420 بر سانتی‌متر می‌باشد که به ترتیب مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه کربونیل C=O نامتقارن و متقارن است علاوه بر این پیک موجود در عدد موج 3416 بر سانتی‌متر مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه H=O است. همچنین وجود پیک‌های مربوط به ارتعاش‌های متقارن و نامتقارن گروه H=C در عدد موج 2924 بر سانتی‌متر و ارتعاش‌های ضعیف کششی مربوط به گروه C=O در عدد موج 1128 بر سانتی‌متر از جمله دیگر پیک‌های شاخص و اصلی مربوط به موسیلاژ دانه شاهی می‌باشند (Karazhiyan et al., 2009).

خیلی کم باشد بسیاری از کپسول‌های تشکیل‌شده حاوی مقادیر ویتامین کمی بوده و لذا بار مفید میکروکپسول‌ها کاهش می‌یابد (Maji, Baruah, Dube, & Hussain, 2007).

همان‌طور که در نمودارهای شکل (2) مشخص است با افزایش نسبت هسته به دیواره از 0/1 تا 0/3 کارایی و بارگذاری ریزپوشانی ویتامین در میکروکپسول‌ها افزایش یافت. میکروکپسول‌هایی که میزان کمتری از هسته در آنها بارگذاری شده است، دارای ضخامت دیواره بیشتر و اندازه ذره بزرگ‌تری هستند که باعث حفاظت بهتر هسته در محیط می‌شود (Calderón-Oliver, Pedroza-Islas, Escalona-Buendía, Pedraza-Chaverri, & Ponce-Alquicira, 2017).

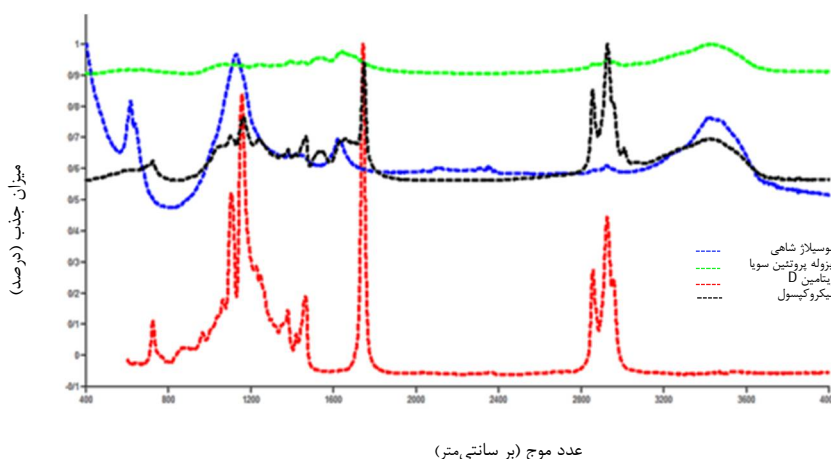


شکل 2- تأثیر نسبت هسته به پوسته بر راندمان کارایی و بارگذاری ریزپوشانی

Hogan, McNamee, O'Riordan و O'Sullivan (2001) به‌منظور ریزپوشانی روغن سویا از سدیم کازئینات استفاده کردند. براساس نتایج آنها با افزایش نسبت هسته به دیواره از 0/25 به 3 راندمان ریزپوشانی از 89/2 به 18/80 درصد کاهش یافت. این محققان بیان کردند کاهش راندمان ریزپوشانی می‌تواند ناشی از حجم زیاد فاز روغنی و افزایش ویسکوزیته باشد (Hogan et al., 2001).

### مورفولوژی میکروکپسول‌ها

شکل (3) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) میکروکپسول‌های تولیدی را نشان می‌دهد. این تصویر پس از خشک و آسیاب کردن ریزپوشینه‌های بهینه، قبل از



شکل 4- طیف‌های حاصل از آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز مربوط به موسیلاژ شاهی، ایزوله پروتئین سویا، ویتامین D و میکروکپسول موسیلاژ شاهی-ایزوله پروتئین سویا ریزپوشینه‌شده با ویتامین D

مشخص است. همان‌طور که در طیف مربوط به میکروکپسول مشخص است حضور یک پیک در عدد موج 2853 بر سانتی‌متر که در طیف مربوط به ویتامین D نیز دیده می‌شود دلیلی بر وجود ویتامین در کپسول‌ها و ریزپوشانی این ترکیب می‌باشد.

تغییر در طیف‌های مربوط به ایزوله پروتئین سویا و موسیلاژ دانه شاهی و وجود پیک مشترک در 2853 بر سانتی‌متر در نمونه میکروکپسول و ویتامین D، ناشی از شکل‌گیری اتصال‌های الکتروستاتیکی بر اثر واکنش توده‌ای شدن بین گروه کربوکسیل موسیلاژ شاهی و گروه آمین پروتئینه‌شده ایزوله پروتئین سویاست. همچنین حضور باندهای کربونیل مربوط به ویتامین D در 1744 و 1154 بر سانتی‌متر در طیف مربوط به میکروکپسول قابل مشاهده و بیانگر حضور ویتامین D است که این خود می‌تواند به‌عنوان دلیل دیگری بر تأیید ریزپوشانی این ترکیب با موسیلاژ شاهی و ایزوله پروتئین سویا باشد. وجود یک پیک مشترک در هر چهار نمونه بررسی شده در عدد موج 2924 بر سانتی‌متر نشان‌دهنده هم‌پوشانی بر اثر ارتعاش‌های کششی گروه C-H است.

#### نتیجه‌گیری

در این پژوهش ویتامین D با استفاده از روش توده‌ای شدن مرکب ریزپوشانی شد. ایجاد جاذبه الکتروستاتیکی بین موسیلاژ شاهی و ایزوله پروتئین سویا طی واکنش منجر به جدا شدن فازهای مایع و تشکیل کمپلکس‌های نامحلول شد. در این بررسی کارایی ریزپوشانی، بارگذاری

در شکل (4) طیف ویتامین D خالص پیک‌های مشخصی در 1632 و 1167 بر سانتی‌متر وجود دارد که به ترتیب مربوط به ارتعاش‌های کششی کربونیل C=O و گروه C=O می‌باشند. علاوه بر این پیک‌های ارتعاش‌های کششی مربوط به گروه C=H در 2938 و 2868 بر سانتی‌متر دیده می‌شوند. پیک ضعیفی در عدد موج 718 بر سانتی‌متر نیز وجود دارد که مربوط به ارتعاش‌های ضعیف کششی گروه CH<sub>2</sub> است. همچنین پیک‌های ضعیف دیگری در 966-835 حضور دارند که نشان‌دهنده پیوند C=H است (Kiani et al., 2017).

در طیف مربوط به ایزوله پروتئین سویا در عدد موج 1100 بر سانتی‌متر پیک ضعیفی وجود دارد که مربوط به ارتعاش‌های کششی گروه‌های مختلف مانند C-H در گروه‌های آروماتیک و PO<sub>2</sub> یا P-OH در استرهای فسفات است که به‌طور مشخصی در ایزوله پروتئین سویا و سایر پروتئین‌های دارای اسیدآمینه سرین وجود دارد. پیک‌های دیگری در عدد موج 1630، 1530، 1450، 1230 و 1630 دیده می‌شود که به ترتیب مربوط به ارتعاش‌های کششی C-H و N-H در آمید III، ارتعاش‌های گروه C-H، ارتعاش‌های مربوط به پیوند N-H در آمید II و ارتعاش‌های کششی C=O در آمید I است. پیک‌های شاخصی نیز در عدد موج 3000-3600 بر سانتی‌متر وجود دارد که مربوط به ارتعاش‌های گروه‌های O-H و N-H آزاد و یا پیوندی است (Schmidt, Giacomelli, & Soldi, 2005). حضور پیک ایزوله پروتئین سویا در عدد موج 1632 در نمونه میکروکپسول موسیلاژ شاهی-ایزوله پروتئین سویا

داد میکروکپسول‌ها دارای اشکال نامنظم، سطوح ناهموار و اندازه میکرومتری هستند. داده‌های حاضر نشان داد امکان استفاده از صمغ شاهی و ایزوله پروتئین سویا به‌عنوان هیدروژل‌های بومی و ارزان برای انکپسولاسیون ترکیبات آب‌گریز وجود دارد.

### تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم تحقیقات و فناوری انجام شد.

ریزپوشانی و میزان میکروکپسول تولیدشده در فرایند به‌ترتیب 90، 27 و 88/75 درصد بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد پارامترهای نسبت هسته به دیواره و نسبت بیوپلیمرها اثر معنی‌داری بر شکل‌گیری فرایند توده‌ای شدن دارند. همچنین بررسی تصاویر مربوط به طیف FT-IR به‌خوبی نمایانگر ایجاد پیوند بین گروه‌های عاملی بیوپلیمرهای دیواره و هسته بود. شکل‌گیری این پیوندها تحت تأثیر ماهیت پلی‌الکترولیت بیوپلیمرها باعث توده‌ای شدن می‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان

### منابع

- Butstraen, C., & Salaün, F. (2014). Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 99, 608-616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>
- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocolloids*, 62, 49-57. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>
- Dubin, P., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., & Thies, C. (2012). *Macromolecular complexes in chemistry and biology*: Springer Science & Business Media.
- Fahami, A., & Fathi, M. (2018). Development of cress seed mucilage/PVA nanofibers as a novel carrier for vitamin A delivery. *Food Hydrocolloids*, 81, 31-38. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.008>
- Fonte, P., Soares, S., Costa, A., Andrade, J. C., Seabra, V., Reis, S., & Sarmiento, B. (2012). Effect of cryoprotectants on the porosity and stability of insulin-loaded PLGA nanoparticles after freeze-drying. *Biomatter*, 2(4), 329-339. doi:<https://doi.org/10.4161/biom.23246>
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7-8), 330-347. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Hogan, S. A., McNamee, B. F., O'Riordan, E. D., & O'Sullivan, M. (2001). Microencapsulating properties of sodium caseinate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1934-1938. doi:<https://doi.org/10.1021/jf000276q>
- Ifeduba, E. A., & Akoh, C. C. (2016). Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in Maillard reaction-modified complex coacervates. *Food Chemistry*, 199, 524-532. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.011>
- Junyaprasert, V. B., Mitrevej, A., Sinchaipanid, N., Boonme, P., & Wurster, D. E. (2001). Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(6), 561-566. doi:<https://doi.org/10.1081/DDC-100105181>
- Karazhiyan, H., Razavi, S. M., Phillips, G. O., Fang, Y., Al-Assaf, S., Nishinari, K., & Farhoosh, R. (2009). Rheological properties of *Lepidium sativum* seed extract as a function of concentration, temperature and time. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2062-2068. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.03.019>
- Kavousi, H. R., Fathi, M., & Goli, S. A. (2017). Stability enhancement of fish oil by its encapsulation using a novel hydrogel of cress seed mucilage/chitosan. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1890-1900. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1357042>
- Kiani, A., Fathi, M., & Ghasemi, S. M. (2017). Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. *International Journal of Food Properties*, 20(11), 2466-2476. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1240690>



- Maji, T. K., Baruah, I., Dube, S., & Hussain, M. R. (2007). Microencapsulation of Zanthoxylum limonella oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology*, 98(4), 840-844. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.03.005>
- Park, S. J., Garcia, C. V., Shin, G. H., & Kim, J. T. (2017). Development of nanostructured lipid carriers for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, 225, 213-219. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.015>
- Peng, C., Zhao, S.-Q., Zhang, J., Huang, G.-Y., Chen, L.-Y., & Zhao, F.-Y. (2014). Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *Food Chemistry*, 165, 560-568. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>
- Piacentini, E., Giorno, L., Dragosavac, M. M., Vladislavljević, G. T., & Holdich, R. G. (2013). Microencapsulation of oil droplets using cold water fish gelatine/gum arabic complex coacervation by membrane emulsification. *Food Research International*, 53(1), 362-372. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.012>
- Reuter, J., Jocher, A., Hornstein, S., Mönting, J. S., & Schempp, C. M. (2007). Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema in vivo. *Planta Medica*, 73(11), 1190-1191. doi:<https://doi.org/10.1055/s-2007-981583>
- Schmidt, V., Giacomelli, C., & Soldi, V. (2005). Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. *Polymer Degradation and Stability*, 87(1), 25-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.07.003>
- Sutaphanit, P., & Chitprasert, P. (2014). Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chemistry*, 150, 313-320. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.159>
- Thies, C. (2007). Microencapsulation of flavors by complex coacervation. *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, 149-170. doi:<https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch7>
- Verkaik-Kloosterman, J., Seves, S. M., & Ocké, M. C. (2017). Vitamin D concentrations in fortified foods and dietary supplements intended for infants: Implications for vitamin D intake. *Food Chemistry*, 221, 629-635. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.128>
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & de Kruif, C. G. (2004). Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, 5(4), 1437-1445. doi:<https://doi.org/10.1021/bm049970v>

## Microencapsulation of Vitamin D by Complex Coacervation Using Soy Protein Isolate and Cress Seed Mucilage

Nafiseh Jannasari<sup>1</sup>, Milad Fathi<sup>2\*</sup>, Seyed Jamal Moshtaghian<sup>3</sup>, Alireza Abbaspourrad<sup>4</sup>

1- Graduated Master Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Esfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Esfahan, Iran

\* Corresponding author (mfathi@cc.iut.ac.ir)

3- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Esfahan, Iran

4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Life Science, Cornell University, New York, USA

### Abstract

Vitamin D plays a significant role for human health, survival and fertility. Several studies have focused on preventing diseases such as heart, immune and skeletal disorders, and infectious using vitamin D. In this study, microencapsulation process of vitamin D by complex coacervation method was investigated using cress seed mucilage as an indigenous hydrocolloid and soy protein isolate, and effects of core to shell and protein to polysaccharide ratios were evaluated. The results showed that both parameters had significant effects on the encapsulation efficiency and loading capacity ( $P < 0.05$ ). Using the ratios of core to shell and protein to polysaccharide of 0.3 resulted in the production of microcapsules with the best functional properties. The microencapsulation efficiency and loading were in the range of 20-90% and 2-27%, respectively. Scanning electron microscopy indicated that microcapsules were almost non-spherical and had rough surfaces. The mean particle size was  $57.2 \pm 1.2$ . The analysis of Fourier infrared transformation spectrometry confirmed the presence of vitamin D in the produced microcapsules and interaction of cress seed mucilage and soy protein isolate. The results of this study suggested the possibility of using cress seed mucilage and soy protein as domestic and low-cost hydrocolloids for encapsulation of hydrophobic compounds.

**Keywords:** Cress Seed Mucilage, Microencapsulation, Soybean Protein Isolate, Vitamin D