بررسی رهایش اسانس بادرنجبویه انکپسوله شده در ماست بوسیله روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی

ایرج کریمی ثانی[۱]، محمد علیزاده [۲*]، سجاد پیرسا[۳]، احسان مقدس کیا[۴]

۱- دانش اموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم پزشکی مراغه
(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

امروزه اسانس بادرنجبویه به دلیل دارا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی جهت افزودن به سامانه های غذایی و زیستی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی میزان رهایش اسانس بادرنجبویه انکپسوله شده با وی پروتئین ایزوله و سدیم کازئینات در ماست بوسیله روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی می باشد. در این مطالعه نمونه های ماست با درصد های مختلف اسانس (۰، ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم در لیتر) انکپسوله شده به روش سونیکاسیون تهیه شدند. اثر دو فاکتور زمان نگهداری (۱، ۱۱ , ۲۱ روز) و در صد افزودن اسانس انکپسوله بر روی پروفیل کروماتوگرافی گازی و نیز میزان رهایش اسانس بادرنجبویه توسط طرح آماری مرکب مرکزی[1] بررسی شد. از نمونه های ماست حاوی درصدهای مختلف اسانس انکپسوله شده، مقدار ۱۰ گرم ماست سانتریفوژ شده و قسمت مایع آن از فیلتر سرسرنگی عبور داده شد. اسانس رهایش شده به داخل ماست (از قسمت مایع) بوسیله روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی استخراج شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شده و پروفیل کروماتوگرافی آن (مجموع سطح زیر پیک و مجموع ارتفاع پیک) بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد ارتباط معنی داری بین سطح زیر پیک و ارتفاع پیک های کروماتوگرافی گازی و میزان اسانس رها شده به درون ماست برقرار می باشد. با بررسی سطح زیر پیک کروماتوگرافی می توان میزان رهایش اسانس به داخل ماده غذایی را تخمین زده و از روی آن سرعت رهایش را نیز بررسی کرد.

کلید واژگان: اسانس بادرنجبویه، انکپسولاسیون، رهایش، ریز استخراج مایع – مایع پخشی، کروماتوگرافی گازی

*مسئول مکاتبات: malizadeh@outlook.com

1. Central Composite Design

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۱- مقدمه

فناوری ریز پوشانی ابزار سودمندی جهت بهبود رهایش ترکیبات زیست فعال مواد غذایی، به ویژه باکتری های پروبیوتیک، مواد معدنی، ویتامین ها، فیتواسترول ها، لوتئین، اسیدهای چرب، کاروتنوئید لیکوپن و ترکیبات آنتی اکسیدانی می باشد [۱]. چندین روش در فناوری ریزپوشانی به منظور کاربرد در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند که در تولید فرآورده های غذایی فرا سودمند نقش بسزایی دارند. علاوه بر این با استفاده از این فناوری ها امکان رهایش موفقیت آمیز ترکیبات زیست فعال در دستگاه گوارش فراهم شده است. سایر پژوهش ها با تمرکز بر جنبه های رهایش و استفاده از روش های ریزپوشانی نوین با هدف کاربرد ترکیب دو یا تعداد بیشتری از ترکیبات زیست فعال دارای اثر سینرژیستی انجام می گردند [۲]. نکته ی حائز اهمیت این است که تحت محرک معینی، مواد داخل هسته با سرعت کنترل شده ای رها می شوند، در غذا، رهایش کنترل شده پروبیوتیک های درون هسته ، به این معنی است که این باکتری ها به طور یک جا در معرض شرایط غذا و دستگاه گوارش قرار نمی گیرند. بلکه به تدریج از درون میکروکپسول آزاد شده و طی مدت زمانی طولانی، جمعیت پروبیوتیک ها در داخل روده به طور مداوم تجدید می گردد [۳]. میکروانکپسولاسیون روشی است که درآن ترکیبات فعال در راستای حفاظت، تثبیت و کنترل رها سازی توسط ترکیبات دیواره پوشش داده می شوند تا اجزای کپسوله شده بوجود آیند. در این تکنیک اجزای مواد غذایی نظیر آنزیم ها، مواد معدنی، ویتامین ها، اسانس ها، روغن ها و میکرو ارگانیسم ها و ... می توانند توسط ترکیبات بیوپلیمری نظیر کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها پوشش داده شوند [٤و ٥]. مواد پوششی (دیواره) مورد استفاده در انواع روش های میکرو انکپسولاسیون شامل کربوهیدرات ها ، سلولز (کربوکسی متیل سلولز، متیل سلولز، اتیل سلولز)، صمغ ها (صمغ اقاقیا، آگار، سدیم آلژینات، صمغ عربی)، لیپید ها (موم ها، دی گلیسرید ها، روغن ها، چربی ها)، پروتئین ها (گلوتن، کازئین، ژلاتین، آلبومین، پپتید ها) می باشد [٦]. میکرو انکپسولاسیون اجزای حساس نظیر پروبیوتیک ها در ماست دارای مزایای متعددی است، نخست آنکه مقاومت ماست را به شرایط سخت محیط (به خصوص اسیدیته) بیشتر می کند و میزان تولید اسید توسط باکتری های پروبیوتیک را طی مرحله تولید و نگهداری کاهش می دهد. به ویژه در مورد بیفیدو باکتر با کاهش تولید اسید استیک طعم فرآورده بهبود می یابد. در عین حال میکرو انکپسولاسیون می تواند مقاومت باکتری ها به اسید و صفرا در داخل بدن را افزایش دهد. کاهش یا توقف اسید سازی موجب بقاء بیشتر ماست درطی دوره نگهداری می شود [۷]. اسانس های گیاهی و ترکیبات موجود در آنها از زمان های دور به عنوان خوش طعم کننده غذاها مصرف می شدند و به دلیل وسیع الطیف بودن خاصیت ضد میکروبی مورد استفاده قرار می گرفتند[۸]. ترکیب و ساختار و عملکرد اسانس ها نقش مهمی در تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس ها دارد [۹]. ترکیبات ضد میکروبی موجود در غذاها، منجر به افزایش ماندگاری غذاهای فرآوری شده یا فرآوری نشده می شود که به دلیل محدود کردن رشد فلور میکروبی موجود در آنها می باشد[۱۰]. بادرنجبویه (*Melissa officinalis*). گیاهی علفی، پایا، پرشاخه و پر پشت و از خانواده نعنائیان می باشد. برگ های گیاه بیضی یا قلبی شکل، متقابل و دندانه دار، با دندانه های فاصله دار از هم است. برگ ها ممکن است نرم یا مقداری کرک دار باشند. منشاء این گیاه شرق مدیترانه و جنوب اروپا گزارش شده است. طبیعت این گیاه گرم و خشک است [۱۱]. رنگ برگ ها معمولاً در سطح فوقانی سبز تیره و در سطح تحتانی سبز روشن می باشد. از آن جا که بیشتر ماده موثره بادرنجبویه در برگ های آن است بهتر است که فقط برگ های آن مورد استفاده قرار گیرند تا میزان ماده موثره حاصله بیشتر باشد [۱۲]. بادرنجبویه شامل روغن های فرار، ترکیبات فنولیک، مشتق کافئیک اسید (رزمارینیک اسید)، فلاونوئیدها، فنولیک اسید و اسیدهای تری ترپن می باشد که دو ترکیب آخر به عنوان آنتی اکسیدان شناخته شده اند. این گیاه به علت دارا بودن آلفا توکوفرول و ترکیبات دیگری از جمله اسید لینولئیک، کارنوسیک، یورسولیک خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی دارند [۱۳]. بادرنجبویه شامل حداقل ۰/۰۵ درصد اسانس روغنی است و ماده موثره اصلی این گیاه سیترونلال است که همراه با سیترال است. سیترال در حقیقت حاوی دو ترکیب ژرانیال و نرال است که به نسبت ٤ به ۳ وجود دارند. بادرنجبویه علاوه براین حاوی حدود ٤ درصد اسید رزمارینیک (تانن نعناعیان)، اسیدهای فنولیک، تریترپن ها گلیکوزیدهای مونوترپن و فلاونوئیدها می باشد و بادرنجبویه نوعی گیاه دارویی آروماتیک بادوام است و برگ آن به علت طعم و آرومای لیمویی به طور

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

گسترده در غذا استفاده می شود [۱٤]. با وجود پیشرفت های قابل توجه در زمینه فناوری های آنالیزی، اکثر دستگاه های تجزیه ای نمی توانند به طور مستقیم برای آنالیز ماتریس نمونه های پیچیده به کار روند. در نتیجه مرحله آماده سازی نمونه، قبل از آنالیز دستگاهی الزامی می باشد. از جمله روش های استخراجی که برای تعیین و شناسایی آنالیت مورد استفاده قرار گرفته است استخراج مایع - مایع[۲] و نیز استخراج فاز جامد[۳] می باشند. امروزه روش های استخراجی فوق به دلیل مصرف زیاد حلال آلی و نیاز به حلال پراکنی آن و در نتیجه امکان هدر رفت آنالیت و همچنین طولانی بودن مدت زمان انجام آزمایش، کمتر مورد استفاده قرار می گیرند. تحقیقات در جهت حذف و یا تقلیل معایب فوق، منجر به استفاده از روش های میکرو استخراجی از جمله تکنیک میکرو استخراج مایع - مایع بخشی[٤] به منظور استخراج و تعیین دقیق مقادیر بسیار کم انواع گونه ها در بافت های مختلف نمونه شده است [۱۵]. استخراج مایع - مایع پخشی، اولین بار توسط رضایی و اسدی در سال (۲۰۰٦) ارائه شده است. این روش به منظور شناسایی ترکیبات آلی در آب مورد استفاده قرار گرفته است. این روش، روشی ساده و سریع بوده و در آن سه فاز مایع مورد استفاده قرار می گیرد: ۱- فاز استخراج کننده دارای دانسیته متفاوتی نسبت به آب است مانند تترا کلرو اتیلن , کلروفرم، تترا کلرید کلرین (سنگین تر از آب) اکتانول، اندودکانول (سبک تر از آب) ۲- حلال پخش کننده: باید حلالیت بالایی در هر دو فاز استخراج کننده و فاز آبی را دارا باشد مانند متانول، اتانول, استون، استونیتریل ۳- فاز آبی که گونه مورد نظر در آن قرار دارد. هنگامی که فاز استخراج کننده و پخش کننده مخلوط شده و با سرعت به درون محلول نمونه تزریق شوند، حلال استخراج کننده به واسطه حلال پخش کننده به طور یکنواخت و کامل در فاز آبی پخش می شود و قطره های بسیار ریز حلال استخراج کننده منجر به کدر شدن محلول نمونه می شود. در این حالت سطح تماس بین حلال استخراج کننده و فاز آبی بسیار بزرگ شده در اثر ایجاد تعادل سریع، زمان استخراج بسیار کوتاه و در حد چند ثانیه می شود. سپس حلال استخراج کننده حاوی آنالیت به راحتی توسط سانتریفیوژ جداسازی و آنالیز می شود. از جمله مزایای این تکنیک می توان به حساسیت و گزینش پذیری بالای روش، بازده بالای استخراج، سرعت زیاد و استفاده از حجم کم حلال آلی اشاره کرد. با توجه به مزایای ذکر شده، این تکنیک می تواند کاربرد وسیعی را در زمینه آنالیز مواد غذایی داشته باشد [۱٦]. گسترش مواد غذایی فراسودمند با افزودن ترکیبات زیست فعال دارای چالش های تکنولوژیکی بسیار زیادی می باشد. هدف از این مطالعه معرفی بررسی رهایش اسانس بادرنجبویه انکپسوله شده در ماست بوسیله روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی می باشد. با استفاده از نانو ریزپوشانی ترکیبات و افزودنی های غذایی، پیشرفت قابل ملاحظه ای در فناوری تهیه مواد محافظت کننده، ترکیبات طعم زا و عوامل پوشاننده طعم، افزایش دسترسی زیستی، افزایش توان بالقوه، رهایش کنترل شده و توزیع بهتر در سیستم های آبی برای ترکیبات و افزودنی های غذایی محلول در آب صورت گرفته است [۱۷و ۱و ۱۸].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

ایزوله پروتئین آب پنیر حاوی ۸۵٪ پروتئین (ارلا فود دانمارک), سدیم کازئینات (سیگما آمریکا), اسانس بادرنجبویه از شرکت آدونیس گل دارو(ترکیبات تشکیل دهنده طبق جدول٤) تهیه شد. استارتر FD-DVS YC - CH_1، کریستین هانسن، دانمارک، از شرکت پیشگامان پخش صدیق تهران تهیه شدند.

۲-۲- دستگاه ها

دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent7890 A Wilmington, DE, USA,) مجهز به شناساگر یونیزاسیون شعله ای و دریچه تزریق انشعابی/ غیر انشعابی استفاده شد. از نرم افزار chemistation برای ثبت پیک ها و آنالیز داده ها استفاده شد. برای جداسازی مواد فرار نمونه های ماست دمای اولیه ستون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه درجه سلسیوس قرار گرفت سپس با سرعت ۲ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۸۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۵ دقیقه در آن دما نگه داشته شد. دمای دریچه تزریق و آشکار ساز به ترتیب در ۲۵۰ و ۲۰۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید. سرعت جریان گاز حامل نیتروژن ۲ میلی لیتر در دقیقه و سرعت گاز نیتروژن به عنوان گاز کمکی ۲۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد.

2. Liquid Liquid Extraction
3. Solid Phase Extraction
4. Dispersive liquid-liquid microextraction

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

ستون استفاده شده برای جداسازی ستون موئینه سیلیسی – HPساخت کشور آمریکا بوده و طول ستون ۳۰ متر و قطر آن ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز جامد ۱۳۲ میکرومتر می باشد.

۲-۳- آماده سازی و تولید ماست

شیر پاستوریزه و هموژنیزه با درصد ماده خشک ۷/۵ و درصد چربی ۲/۵ به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۰ درجه حرارت داده شد. سپس بعد از خنک شدن تا دمای ٤٥ درجه سانتی گراد استارتر تجاری ماست را طبق دستورالعمل شرکت سازنده به شیر افزوده و به خوبی مخلوط شدند و سپس درون ظروف پلی اتیلنی ریخته شدند و سپس برای هر نمونه مطابق طرح مرکب مرکزی (CCD) (جدول ۲) درصدهای مختلف اسانس بادرنجبویه انکپسوله شده (۰, ۰/۷۵, ۱/۵ گرم در لیتر) افزوده و بعد از درب بندی به انکوباتور ٤۲ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند. بعد از ۳ ساعت نمونه ها از انکوباتور خارج شدند و سپس نمونه ها به سردخانه ٤ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

۲-٤- روش انکپسولاسیون اسانس بادرنجبویه

اسانس بادرنجبویه به ترتیب زیر انکپسوله گردید:

۱- توزین مواد دیواره (سدیم کازینات و ایزوله پروتیین آب پنیر) به صورت وزنی/ وزنی ۲- حل کردن مواد دیواره در آب مقطر با استفاده از همزن مغناطیسی و قرار دادن نمونه ها در دمای اتاق به مدت یک روز به منظور هیدراسیون کامل مواد دیواره ۳- توزین اسانس و اختلاط آن با محلول های آماده شده به صورت وزنی/ وزنی در نسبت های مختلف اسانس به بیوپلیمر (۱۰ تا ۱۰۰ درصد) و اضافه کردن امولسیفایر (توئین ۸۰) جهت انحلال اسانس (دو قطره) ٤- استفاده از هموژنایزر به منظور همگن کردن نمونه ها و تشکیل امولسیون ٥- قرار دادن هر یک از نمونه ها در دستگاه اولتراسوند فرکانس ۲۰ کیلوهرتز در توان های مختلف (۵۰ تا ۱۵۰ وات) به مدت ۵ دقیقه به منظور تکمیل عمل درون پوشانی [۱۹].

۲-٥- آماده سازی نمونه ها برای تزریق به کروماتوگرافی گازی به روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی

مقدار ۱۰ گرم ماست وزن شده و سپس نمونه ماست همگن کرده و وارد لوله های آزمایش می شود. سپس نمونه های تهیه شده را سانتریفوژ کرده و مقدار ماده مایع آن را با فیلتر سر سرنگی عبور داده و ٤ میلی لیتر از آب ماست سانتریفوژ شده را در یک لوله آزمایشگاهی شیشه ای ۱۰ میلی لیتر مخروطی (مخصوص روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی) وارد می کنیم و سپس ۱ سی سی استون (به عنوان حلال دیسپرس کننده) و ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم (به عنوان حلال استخراجی) را با هم مخلوط کرده و سپس نمونه مخلوط شده را وارد لوله آزمایش حاوی آب ماست می کنیم و بعد از آن مخلوط به آرامی تکان داده می شود. یک محلول ابری (آب، استون و کلروفرم) تشکیل شد. سپس مخلوط به مدت ۲ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بر این اساس، ذرات پراکنده فاز استخراج در پایین لوله آزمایشگاهی مخروطی قرار گرفتند (شکل ۱). ۲/۵ میکرولیتر از فاز جدا شده با استفاده از سرنگ هامیلتونی ۵ میکرو لیتری برداشته شد و به کروماتوگرافی گازی تزریق شد. برای آنالیز و رسم نمودارها از نرم افزار Design Expertاستفاده گردید. شکل ۲ کروماتوگرام اسانس بادرنجبویه رها شده به داخل ماست را که بوسیله روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی استخراج شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شده است را نشان می دهد.

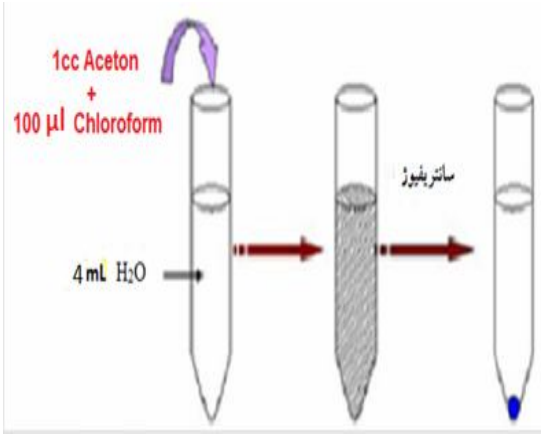

Fig 1 A simple schematic of Dispersive liquid-liquid microextraction

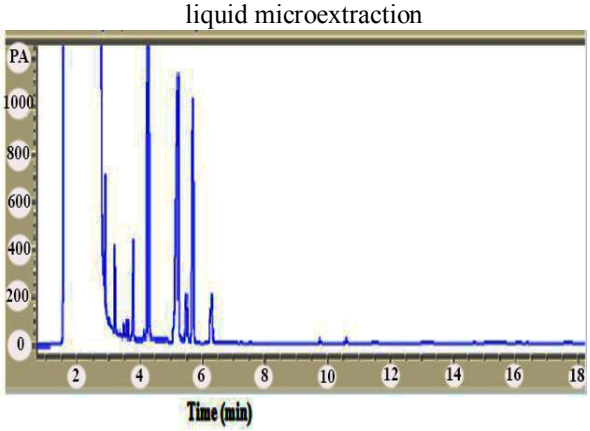

Fig 2 The chromatogram is the essential oil release in yogurt

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۲-۶- بررسی میزان رهایش اسانس به داخل ماست

برای بررسی میزان رهایش اسانس به داخل ماست ابتدا ماست کنترلی تهیه گردید. ماست کنترلی ماست حاوی اسانس بادرنجبویه انکپسوله نشده می باشد. با روش ذکر شده در قسمت ۲-٤ مواد فرار ماست کنترلی استخراج شده و به دستگاه تزریق شده و سطح زیر کلی پیک های به دست آمده ثبت گردید. سطح زیر پیک کلی برای کروماتوگرام سایر نمونه های ماست که طبق جدول ۱ تهیه شده بودند نیز به دست آمد.

در نهایت میزان رهایش برای هر نمونه از رابطه زیر بدست آمد:

$$\text{Release (\%)} = (PA_c - PA_s / PA_c) \times 100 \quad (۱)$$

در این رابطه PA_c سطح زیر پیک کلی ماست حاوی اسانس انکپسوله نشده و PA_s سطح زیر پیک کلی ماست حاوی اسانس انکپسوله شده می باشد.

Table 1 The Variables and Values Used for Increased Factorial Design

	Codded factor levels		
Variable	**Low (-1)**	**0**	**High (+1)**
F1: encapsule powder (gr)	0	0/75	1.5
F2: storage days (day)	1	11	21

۲-۷- طرح آماری

برای بررسی پارامتر های مستقل از طرح آماری مرکب مرکزی استفاده شد. هدف از طراحی این آزمایش بررسی اثر زمان نگهداری و درصد انکپسوله بر روی میزان رهایش اسانس انکپسوله شده در ماست می باشد. دو متغیر مستقل شامل زمان نگهداری (F_1) و درصد اسانس انکپسوله شده (F_2) در سه سطح مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس طراحی صورت گرفته ۱۲ آزمایش به صورت تصادفی انجام گرفت. سطح هر یک از فاکتورهای مستقل بر اساس آزمایش های اولیه مشخص شد. برای هر یک از دو متغیر مورد مطالعه یک سطح بالا (با کد ۱+) و یک سطح پائین (با کد ۱-) در نظر گرفته شد. اطلاعات مربوط به سطح هر یک از متغیرها در جدول ۱ نشان داده شده است. جدول ۲ پاسخ های بدست آمده شامل: مجموع سطح زیر پیک، مجموع ارتفاع پیک و سرعت رهایش می باشد. پاسخ های به دست آمده در مدل های چند جمله ای درجه ۲ برازش گردیدند (معادله ۱) که این مدل ها پاسخ های به دست آمده را به عنوان تابعی از دو فاکتور زمان نگهداری و درصد انکپسوله در ماست گزارش می کنند.

$$Y = b_0 + \sum bixi + \sum biixi^2 + \sum \text{bij}x_i x_j \quad (۲)$$

در این معادله X_i و X_j فاکتورهای مستقل و b_0, b_i, b_{ij} ضرایب رگرسیون به دست آمده از حداقل مربعات می باشند. مدل های به دست آمده برای پاسخ های مختلف (A = زمان نگهداری, B = درصد انکپسوله) همراه با ضریب تبین در جدول ۳ گزارش شده است.

Table 2 List of experiments and responses based on CCd

Run	A: storage time (day)	B: Encapsulated Essential oil	Total Peak Area	Total Peak Height	Essential oil Release percentage
1	11	0/75	906903	177740	44/23
2	1	0/75	1679250	281706	6/004
3	11	0	1165490	194728	0
4	21	0/75	960944	182664	46/21
5	11	0/75	934371	187437	47/69
6	11	0/75	1070490	188321	40/07
7	21	0	1390310	370805	0
8	1	1/5	1296840	280821	27/41
9	11	0/75	1312020	203675	46/56
10	21	1/5	10051/3	212382	90/43
11	1	0	740486	168137	0
12	11	1/5	1049290	193358	41/26

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

Table 3 Some Characteristics of the Constructed Models for Responses

Response	R-Squared	Adj R-Squared
Peak Area =1043037.10 -225878.45*A-156684.11*B-484153.17*A*B	0.84	0.74
Peak Height =185776.33+5864.5*A-7851.5* B -67776.75* A* B+53442.5*A^2+15300.5*B^2	0.84	0.80
Release = 32.49+17.20* A+26.51* B+15.75*A*B =81.8744139+1.706790489A–160.1043184B+0.36856404AB-0.068266262A ^{2}+75.011 B^2	0.85	0.80

Table 4 Components of Melissa officinalis Essential oil

%	Components	
0/21	1 – Octen – 3 – ol	**1**
0/08	6 – Methyl - 5 – hepten – 2 – one	**2**
0/76	Linalool	**3**
0/13	Nonanal	**4**
0/14	Comphor	**5**
0/24	Trans – chrysanthema	**6**
0/24	Citronellal	**7**
0/15	α- Thujone	**8**
0/57	Decanal	**9**
0/28	β- Cyclocitral	**10**
0/31	Nerol	**11**
2/67	Z – Citral	**12**
0/35	Geraniol	**13**
3/8	Geraniol	**14**
0/07	2 – Methylnaphthalene	**15**
0/16	(E , E) – 2.4 - Decadienal	**16**
0/09	α- Cubebene	**17**
1/19	α- Copaene	**18**
2/95	β- Bourbonene	**20**
0/35	β- Cubebene	**21**
6/02	Thymul	**22**
17/33	Caryophyllene	**23**
0/3	Geranyl aceton	**24**
2/22	α- Humulene	**25**

۳ – نتایج و بحث

۳-۱- سطح زیر پیک

شکل ۳ سطح زیر پیک کروماتوگرام را به عنوان تابعی از زمان نگهداری و در صد انکپسوله در ماست را نشان می دهد. با مقایسه سطح زیر پیک می توان دریافت که با افزایش زمان نگهداری، زمانی که مقدار اسانس افزوده شده به ماست صفر گرم باشد سطح زیر پیک افزایش می یابد و با افزایش در صد انکپسوله زمانیکه مقدار اسانس افزوده شده به ماست ۱/۵ گرم بوده سطح زیر پیک افزایش می یابد. همچنین با افزایش زمان نگهداری و درصد انکپسوله سطح زیر پیک افزایش می یابد. اثر درصد انکپسوله و زمان نگهداری بر روی سطح زیر پیک معنی دار می باشد (P<۰/۰۵). Kamankesh و همکاران (۲۰۱۳)، با روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی و HPLC برای تعیین بنزوات و سوربیت در ماست نوشیدنی دریافتند که با افزایش مواد جامد سطح زیر پیک به طور معنی داری افزایش می یابد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد[20]. Xu و همکاران (۲۰۱۱)، برای تعیین فرمالدئید در نوشیدنی ها با استفاده از مایکروویو و با روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی و HPLC دریافتند که با افزایش توان مایکروویو سطح زیر پیک بطور معنی داری افزایش می یابد که با نتایج این طرح مطابقت دارد[۲۱].

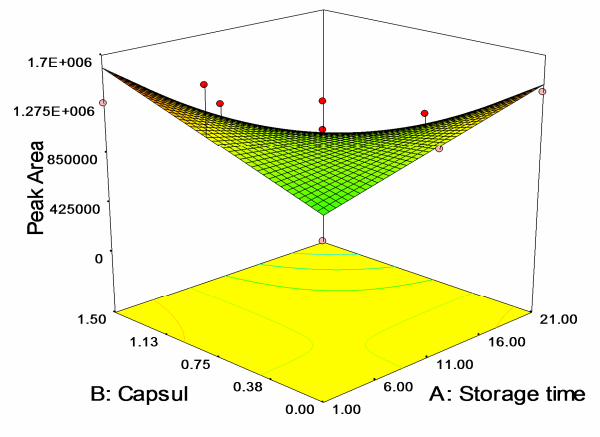

Fig 3 3D response surface plots for Peak Area, A, storage time; B, Capsule percent

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۳-۲- ارتفاع پیک

شکل ٤ ارتفاع پیک کروماتوگرام را به عنوان تابعی از زمان نگهداری و در صد انکپسوله در ماست را نشان می دهد. با مقایسه ارتفاع پیک می توان دریافت که با افزایش زمان نگهداری زمانی که مقدار اسانس افزوده شده به ماست صفر گرم می باشد ارتفاع پیک افزایش می یابد و با افزایش درصد انکپسوله زمانی که مقدار اسانس افزوده شده به ماست ۱/۵ گرم بوده ارتفاع پیک افزایش می یابد. همچنین با افزایش زمان نگهداری و درصد انکپسوله ارتفاع پیک افزایش می یابد. اثر درصد اسانس انکپسوله و زمان نگهداری بر روی ارتفاع پیک معنی دار می باشد (P<۰/۰۵).

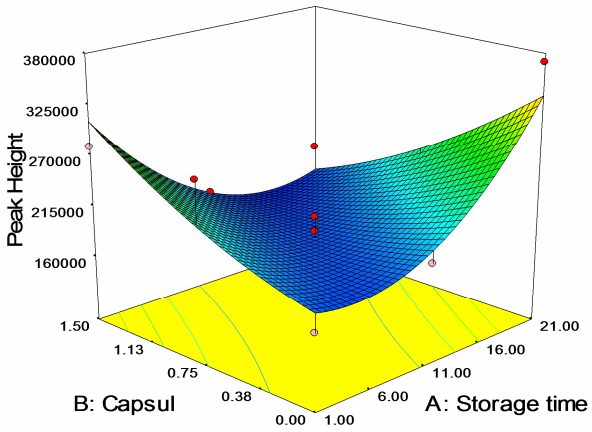

Fig 4 3D response surface plots for Peak Height, A, storage time; B, Capsule percent

۳-۳- سرعت رهایش

شکل (۵) سرعت رهایش کروماتوگرام را به عنوان تابعی از زمان نگهداری و در صد انکپسوله در ماست را نشان می دهد. با مقایسه سرعت رهایش می توان دریافت که با افزایش زمان نگهداری زمانی که مقدار اسانس افزوده شده به ماست صفر گرم می باشد سرعت رهایش تقریبا ثابت می باشد و با افزایش در صد انکپسوله زمانیکه مقدار اسانس افزوده شده به ماست ۱/۵ گرم بوده سرعت رهایش افزایش می یابد. همچنین با افزایش زمان نگهداری و در صد انکپسوله سرعت رهایش افزایش می یابد. اثر در صد انکپسوله و زمان نگهداری بر روی سرعت رهایش معنی دار می باشد (P<۰/۰۵).

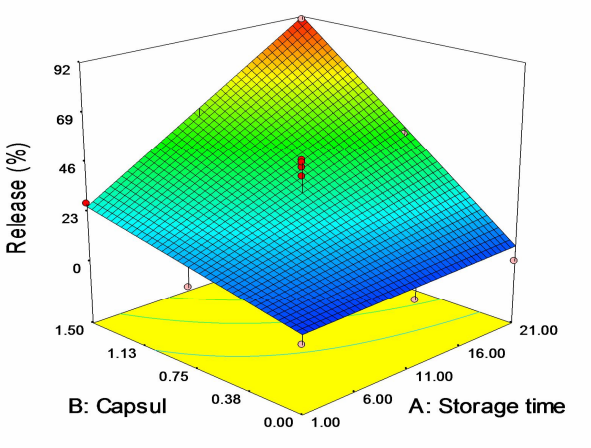

Fig 5 3D response surface plots for release rate, A, storage time; B, Capsule percent

,

٤- نتیجه گیری

در این مطالعه نمونه های ماست با درصد های مختلف اسانس انکپسوله شده تهیه شدند. اثر دو فاکتور زمان نگهداری و درصد انکپسوله با استفاده از طرح آماری مرکب مرکزی بر روی فاکتورهای کروماتوگرافی گازی شامل مجموع سطح زیر پیک و مجموع ارتفاع پیک و نیز میزان رهایش اسانس به داخل ماست بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که روش ریز استخراج مایع – مایع پخشی به عنوان یک روش ریز استخراج بسیار کارآمد و مناسب با سرعت بالا و هزینه پایین توانایی استخراج اسانس از درون مواد غذایی مانند ماست را دارد و همچنین با استفاده از این روش در کوپل با دستگاه های آنالیزی مانند کروماتوگرافی گازی به راحتی می توان درصد رهایش مواد انکپسوله شده و نیز سینتیک رهایش آنها را مورد مطالعه قرار داد. با افزایش درصد انکپسوله سطح زیر پیک و ارتفاع پیک افزایش یافت و همچنین نتایج به دست آمده نشان می دهد که ارتباط معنی داری بین سطح زیر پیک و ارتفاع پیک وجود دارد که بیانگر این است که با آنالیز کروماتوگرافی گازی می توان اسانس رهایش یافته به ماست را بررسی کرد.

٥- منابع

[1] Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A., ... & Olabarrieta, I. (2013). Methods for the nanoencapsulation of β-carotene in the food sector. *Trends in food science & technology*, *32*(2), 73-83.

[2] Drusch, S., & Mannino, S. (2009). Patent-based review on industrial approaches for the

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(6-7), 237.

[3] Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). Amino acids, peptides, proteins. In Food chemistry (pp. 8-91). Springer, Berlin, Heidelberg.

[4] Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, *23*(7), 1361-1394.

[5] Kamyshny, A., & Magdassi, S. (2006). Nanoparticles in confined structures: formation and application. *Colloid Stability: The Role of Surface Forces–Part I*, *1*, 207-233.

[6] Cho, Y. H., Shin, D. S., & Park, J. Y. (2000). Optimization of emulsification and spray drying process for the microencapsulation of flavor compounds. *Korean journal of food science and technology*, *32*(1), 132-139.

[7] Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, *13*(1), 3-13.

[8] Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International journal of food microbiology*, *80*(3), 223-230.

[9] Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., & Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food chemistry*, *83*(2), 255-262.

[10] Hayashi, K., Kamiya, M., & Hayashi, T. (1995). Virucidal effects of the steam distillate from Houttuynia cordata and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta medica*, *61*(03), 237-241.

[11] Meyers, M., (2007). Lemon Balm: An herb society of America guide.

[12] Farhani, T. and Najafi, F. (2012). Medicinal Plants (Balm). Rashedin Publication, Tehran, 34-37.

[13] Herodež, Š. S., Hadolin, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (Melissa officinalis L.) leaves. *Food Chemistry*, *80*(2), 275-282.

[14] Safaiekhoram, M., jafarnia, S. and khosroshahi, S. (2010). The world's most important medicinal plants. Iran's green farm training complex. 132-133.

[15] Rezaee, M., Yamini, Y., & Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, *1217*(16), 2342-2357.

[16] Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L. M., González-Curbelo, M. Á., & Hernández-Borges, J. (2011). Liquid phase microextraction applications in food analysis. Journal of Chromatography A, 1218(42), 7415-7437.

[17] Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry–Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*, *24*(1), 30-46.

[18] Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (Salvia hispanica L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, *111*(1), 102-109.

[19] Karimi Sani, I., Alizadeh, M., Pirsa, S., & Moghaddas Kia, E. (2018). Impact of operating parameters and wall material components on the characteristics of microencapsulated Melissa officinalis essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*.

[20] Kamankesh, M., Mohammadi, A., Tehrani, Z.M., Ferdowsi, R. and Hosseini, H., (2013). Dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design. Talanta, 109, pp.46-51.

[21] Xu, X., Su, R., Zhao, X., Liu, Z., Li, D., Li, X., Zhang, H. and Wang, Z.(2011). Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. Talanta, 85(5), pp.2632-2638.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

An investigation about the release of microencapsulated Melissa officinalis oil in the yogurt using DLLME/gas chromatography

Karimi Sani, I. [1], Alizadeh, M. [1*], Pirsa, S.[1], Moghaddas Kia, E. [2]

1. Food science and Technology department, Agriculture faculty, Urmia University, Urmia, Iran
2. Food science and Technology department, Maragheh University of Medical Sciences, Maragheh, Iran

(Received: 2018/05/17 Accepted:2019/01/29)

Today, Melissa essential oil has been drawn a lot of attention in food researches. This essential oil has good antioxidant and antimicrobial activity, so it is a good candidate to incorporate in the nutritional and biological systems. The aim of this study was to investigate the release of Melissa essential oil (encapsulated via isolated proteins and sodium caseinate) in yoghurt by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) /gas chromatography technique. In this study, yogurt samples with different percentages of essential oil (0, 0/75, 1/5 g/l) were prepared by sonication method. The effect of two factors, including storage time (1, 11, 21 days) and the percentage of encapsulated essential oil on the gas chromatography profile were studied based on the central composite design (CCD). 10 grams of yogurt samples containing various percentages of essential oil was centrifuged and the liquid part was passed through a sterilization filter. The released essential in the yogurt was extracted (from the liquid part) by DLLME method and was injected into the gas chromatography and its chromatographic profile (total peak area and total peak height) was investigated. The results show that there is a significant relationship between the total peak area and the amount of essential oil released into the yogurt. By studying total peak area in chromatography, it is possible to estimate the amount of essential oil released into the yogurt sample, and it is possible to study the rate of release.

Key words: Melissa essential oil, Encapsulation, Release, Dispersive liquid-liquid microextraction**,** Gas chromatography

* Corresponding Author E-Mail Address: malizadeh@outlook.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]