

## رویکرد جدید جهت درون‌پوشانی آنتوسیانین‌های تمشک سیاه وحشی به روش کواسرواسیون کمپلکس با استفاده از ژلاتین و صمغ عربی به عنوان مواد دیواره

بهرام فتحی آچاچلوئی<sup>۱\*</sup>، رضوان شاددل<sup>۲،۳</sup>، جواد حصاری<sup>۲</sup>، صدیف آزادمرد دمیرچی<sup>۲</sup>، صفورا اکبری علویجه<sup>۴</sup>

۱-دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲-دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز

۳-گروه صنایع غذایی، رانگرز، دانشگاه ایالتی نیوجرسی، آمریکا

۴-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

### چکیده

در این تحقیق، به منظور کاهش ناپایداری آنتوسیانین‌های تمشک بخصوص در شرایط نامطلوب، از میکروانکپسولاسیون به روش کواسرواسیون کمپلکس بعد از تهیه امولسیون دوگانه‌ی آنتوسیانین‌ها و با استفاده از مواد دیواره‌ی صمغ عربی و ژلاتین استفاده شد. فرآیند کواسرواسیون به عنوان تابعی از غلظت ژلاتین، صمغ عربی و ماده‌ی هسته در نسبت‌های ۰/۵:۱:۱ و ۱:۱:۱، غلظت‌های محلول پلیمر ۵/۰ و ۷/۵ درصد وزنی-حجمی و همچنین pH (۳/۵، ۴/۰، ۴/۵ و ۵/۰) مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه مورفولوژی، اندازه‌ی ذرات، رطوبت، انحلال‌پذیری، هیگروسکوپ، ظرفیت بارگیری، پایداری و اسپکتروسکوپی فرسرخ (FTIR) ارزیابی شدند. میکروکپسول‌ها رطوبت، هیگروسکوپ و انحلال‌پذیری کمتری در مقایسه با فرم آزاد آنتوسیانین نشان دادند. آن‌ها اندازه‌ی ذرات بین  $0.97 \pm 0.45/25$  تا  $7.18 \pm 87.92/92$  میکرومتر و ظرفیت بارگیری بالایی ( $0.31 \pm 33/05$  تا  $0.30 \pm 41/72$ ) داشتند. بر طبق نتایج HPLC، روش انتخابی به طور قابل ملاحظه‌ای پایداری آنتوسیانین‌ها را تا ۳۶٪ بعد از دو ماه نگهداری در  $37^\circ \text{C}$  افزایش داد. طیف FTIR وقوع فرآیند کواسرواسیون کمپلکس را به اثبات رسانید. علاوه بر این، میکروکپسول بهینه‌ی انتخاب شده رنگ قرمز شدیدی را بعد از مدت زمان نگهداری نشان داد که تأیید کننده‌ی مؤثر بودن روش انتخابی در محافظت از آنتوسیانین‌هاست.

کلید واژگان: آنتوسیانین‌های تمشک سیاه، ژلاتین، صمغ عربی، درون‌پوشانی، مواد غذا-دارو، پایداری.

\*مسئول مکاتبات: bahram1356@yahoo.com

## ۱- مقدمه

آنتوسیانین ها یکی از مهمترین ترکیبات عملگرا هستند که به عنوان رنگدانه های طبیعی، گروهی از آنتی اکسیدان ها می باشند که در ریشه ها، برگ ها، میوه ها و گل های گیاهان مختلف وجود دارند. آنتوسیانین ها، مهمترین ترکیبات پلی فنلی میوه ها بخصوص انواع توت ها هستند [۱].

تمشک سیاه وحشی با نام علمی *Rubus occidentalis* گیاهی است بوته ای با ریشه ی دائمی و شاخه های چوبی دو ساله و با برگ های ۳ تا ۵ برگچه ای و خارهایی که بر روی دم برگ برگ ها واقع هستند [۲]. تمشک در حاشیه شمال کشور در جنگل های گیلان به حالت خودرو رویش دارد و برگ و میوه آن دارای خواص دارویی است. تمشک، حاوی غلظت های بالایی از آنتوسیانین ها و الاژیتانن ها است که فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی دارند [۳]. سیانیدین-۳-گلوکوزید به عنوان آنتوسیانین اصلی تمشک، بیشترین ترکیب آنتوسیانینی با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی قوی را دارد [۴].

با وجود ویژگی های منحصر به فرد تمشک، مواد زیست فعال موجود در آن نسبت به فرایندهای حرارتی مثل پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون حساسند. همچنین، اکسیژن، نور، تغییرات pH و سایر عوامل محیطی موجب از بین رفتن ترکیبات مؤثره آنها می گردد. درون پوشانی می تواند به عنوان یک گزینه جهت به حداقل رساندن این مشکلات باشد. در یک دهه اخیر، مطالعات گسترده ای در مورد ریزپوشانی آنتوسیانین ها و سایر ترکیبات پلی- فنلی انجام شده و تأثیر ریزپوشانی بر روی افزایش پایداری اکسیداتیو مواد فعال مختلف به اثبات رسیده است [۵-۱۰]. با این وجود، تاکنون هیچ گزارشی در مورد استفاده از روش کواسرواسیون کمپلکس (جدایی فاز) در ریزپوشانی مواد فعال تمشک منتشر نشده است.

ماده حاصل از روش کواسرواسیون بوسیله مکانیسم جدایی فاز محلول آبی به یک فاز غنی از پلیمر (بنام کواسرویت) و یک فاز دارای پلیمر اندک، تفکیک می گردد. این فرایند بر اساس تعداد انواع پلیمر موجود می تواند به صورت ساده؛ وقتی تنها یک نوع پلیمر استفاده شده باشد یا کمپلکس؛ وقتی دو یا چند نوع پلیمر با بار مخالف حضور داشته باشند، تعریف شود. مواد کواس رویت

شده که برای کپسول کردن عامل فعال استفاده می شوند، اغلب از نوع کمپلکس هستند. در بیشتر موارد، پوسته آنها شامل صمغ عربی و ژلاتین است [۱۱].

در مطالعه حاضر، عصاره اتانولی تمشک به روش کواسرواسیون کمپلکس با استفاده از عوامل پوشینه ساز صمغ عربی و ژلاتین درون پوشانی شده و از نظر ویژگی های مختلف و پایداری ترکیبات مؤثره مورد مطالعه قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- مواد

نمونه های تمشک اوایل تیرماه ۱۳۹۵ از جنگل های گردنه حیران استان اردبیل تهیه شده و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد (به حالت انجماد) نگهداری شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک و شرکت کالدون خریداری شدند.

### ۲-۲- روش ها

#### ۲-۲-۱- تهیه عصاره اتانولی

عصاره اتانولی با روش لی و ویکر [۱۲] تهیه شد. خشک کردن نهایی عصاره ها با استفاده از وزیدن گاز نیتروژن انجام گرفت.

#### ۲-۲-۲- درون پوشانی به روش کواسرواسیون و خشک کردن انجمادی

میکروکپسول ها مطابق با روش کومیونانو همکاران [۱۳] با اندکی اصلاحات تشکیل شدند. ابتدا امولسیون (W/O) با استفاده از محلول عصاره تمشک (۳۰٪ وزنی-حجمی) و روغن سویا در نسبت ۱:۲ (وزنی-حجمی) همراه با ۳٪ (وزنی-وزنی) امولسیفایر لیپوفیلیک پلی گلیسرول پلی ریسینولات ۴۱۵۰ (PGPR ۴۱۵۰، شرکت Palsgaard، نیوجرسی، آمریکا) تشکیل شد. امولسیون های اولیه (W/O) با افزودن محلول های ژلاتین حاوی ۱ درصد توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر هیدروفیل امولسیفیه شدند تا امولسیون های W/O/W بدست آید. امولسیون ها (هر دو امولسیون ساده و دوگانه) به ترتیب در ۱۲۵۰۰ rpm به مدت ۴ min و ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۴ min در Ultraturrax آماده شدند. پایداری هر دو امولسیون اولیه و

گرم میکروکپسول افزوده شده و سپس جهت تخریب دیواره‌ی میکروکپسول خرد گردیدند. در ادامه، ۴ میلی‌لیتر اتانول افزوده شد. در نهایت دیواره‌ی میکروکپسول‌ها با سونیکاسیون و سانتریفوژ در ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در  $20^{\circ}\text{C}$  تخریب شد.

#### ۲-۲-۳-۴- اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین و میزان بارگیری میکروکپسول‌های خشک شده ی پودری با HPLC-DAD

به منظور اندازه‌گیری دقیق میزان آنتوسیانین کل و سطحی نمونه‌ها از دستگاه HPLC-DAD استفاده شد [19]. بدین منظور از دستگاه HPLC-DAD مدل Dionex مجهز به آشکارساز UV مدل طیف نورسنج استفاده شد. ستون مورد استفاده ستون بکمن (Ultrasphere- $250\text{mmODS}$ ,  $4/6 \times 5\mu\text{m}$ ) بود. جداسازی به روش گرادیان و با استفاده از فاز متحرک  $0.1\%$  (حجمی-حجمی) فسفوریک اسید در آب (A) و استونیتریل (B) صورت گرفت. روش گرادیان بدین ترتیب تنظیم شد:  $6-20$  دقیقه،  $15\%$  حلال B؛  $6-20$  دقیقه،  $15-22\%$  حلال B؛ و  $20-35$  دقیقه،  $22-30\%$  حلال B. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم تزریق  $20\mu\text{m}$ ، دمای ستون  $35^{\circ}\text{C}$  و طول موج آشکارساز  $525$  نانومتر بود. منحنی کالیبراسیون سیانیدین- $3-O$ -گلیکوزید با ضریب تبیین بزرگتر از  $0.999$  به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد.

$0.5$  میلی‌لیتر از هر نمونه بعد از باز کردن کپسول بطور جداگانه به نسبت  $1:2$  (حجمی-حجمی) با محلول  $0.1$  درصد (حجمی-حجمی) از HCl آماده شده در متانول مخلوط شد. نمونه‌ها با استفاده از فیلترهای سرنگی  $0.45$  میکرومتر قبل از تزریق به دستگاه HPLC فیلتر شدند. آماده‌سازی و تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC در همان روز انجام گرفت. میزان آنتوسیانین‌ها بر حسب میلی‌گرم سیانیدین- $3-O$ -گلیکوزید بر هر کیلوگرم ماده‌ی خشک بعد از حذف وزن مواد دیواره گزارش شد. میزان آنتوسیانین ریزپوشینه‌ها در روزهای صفر،  $30$  و  $60$  بعد از نگهداری در  $37^{\circ}\text{C}$  اندازه‌گیری شد. همچنین، میزان بارگیری ( $\%$  LC) با معادله‌ی (۱) محاسبه گردید:

$$\%LC = W_1/W_2 \times 100$$

ثانویه با استفاده از مشاهدات چشمی و میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

در ادامه محلول صمغ عربی به امولسیون دو گانه در  $40^{\circ}\text{C}$  با کمک همزن مغناطیسی به آرامی اضافه شد. سپس، تنظیم pH به کمک محلول اسید کلریدریک یک مولار، در  $40^{\circ}\text{C}$  به کمک همزن مغناطیسی تا پی اچ ۴ انجام گرفت. دما به تدریج به  $10^{\circ}\text{C}$  کاهش داده شد. ماده کواسر شده در  $7^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت جهت تسریع جداشدن دو فاز نگه داشته شد. پس از آن ماده کواسر شده با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Labconco, Freeze drying system/Freezone 4.5) خشک گردید.

۴ فرمولاسیون میکروکپسول (A تا D) با غلظت‌های مختلف عوامل درون‌شانی (ژلاتین و صمغ عربی) و ماده‌ی هسته (امولسیون اولیه تهیه شده با آنتوسیانین‌های تمشک سیاه وحشی) در نسبت‌های  $0.5:1$ ،  $1:1$  و  $1:1$  به عنوان تابعی از جرم کل پلیمر بدست آمدند. محلول‌های آبی پلیمرها در غلظت‌های  $0.05$  و  $0.075$  گرم بر میلی‌لیتر استفاده شدند.

#### ۲-۲-۳- اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی میکروکپسول‌ها

##### ۲-۲-۳-۱- مورفولوژی و اندازه میکروکپسول‌ها

مورفولوژی میکروکپسول‌ها قبل از فرآیند خشک کردن انجمادی با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse TE2000- $U$  inverted optical microscope، ژاپن) مجهز به نرم-افزار Simple PCI 6 برای بدست آوردن تصاویر مشاهده شد. جهت محاسبه قطر، قطر حداقل  $400$  میکروکپسول با استفاده از نرم افزار ImageJ 1.50i اندازه‌گیری شدند [14].

##### ۲-۲-۳-۲- رطوبت، انحلال‌پذیری و هیگروسکوپ

میزان رطوبت [15]، انحلال‌پذیری [16] و هیگروسکوپ [17] میکروکپسول‌ها عوامل ریزپوشانی‌کننده (ژلاتین و صمغ عربی) و نمونه‌ی کنترل اندازه‌گیری شدند.

##### ۲-۲-۳-۳- تخریب ریزپوشینه‌ها

برای تعیین میزان آنتوسیانین‌های کپسوله شده، بازده ریزپوشانی و همچنین تعیین میزان آنتوسیانین کل در طول مدت نگهداری، تخریب میکروکپسول‌ها به روش ذیل انجام گرفت [18]. برای اندازه‌گیری میزان آنتوسیانین کل یک میلی‌لیتر آب مقطر به  $0.2$

میزان آنتوسیانین کل عصاره‌های اتانولی تمشک سیاه برابر با  $1446/94$  میلی‌گرم CGE بر  $100$  گرم عصاره‌ی خشک ( $97/77$  میلی‌گرم CGE بر  $100$  گرم میوه تازه) بود.

### ۲-۳- مورفولوژی میکروکپسول‌ها

به منظور آغاز فرآیند کواسرواسیون کمپلکس، پایداری امولسیون‌های اولیه و ثانویه در طول مدت زمان نگهداری را می‌توان به عنوان عمده‌ترین چالش در نظر گرفت. میکروگراف‌های امولسیون‌های دوگانه (شکل ۱-۱) و کواسرویت‌های کمپلکس (شکل ۲-۱) نشان دادند که عمده‌ی میکروکپسول‌ها پیوسته بوده و به طور منظمی در آب پخش شده‌اند که تایید کننده‌ی موفقیت فرآیند کواسرواسیون می‌باشد. علاوه بر این، آن‌ها شکل گرد و سطح نسبتاً صافی داشتند. یکپارچگی و استحکام ماده‌ی دیواره که می‌تواند با ماده‌ی هسته‌ای احاطه شده مشاهده گردد منجر به انتشار تدریجی ماده‌ی هسته‌ی میکروکپسول می‌گردد. ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابه توسط کومیونیان و همکاران [۱۳] و روچا-سلمی و همکاران [۲۰] گزارش شده است.

$W_1$  میزان آنتوسیانین ریزپوشانی شده در وزن مشخصی از میکروکپسول‌ها؛  $W_2$  وزن کل آنتوسیانین بکار رفته در مرحله‌ی آماده‌سازی میکروکپسول‌ها.

### ۲-۳-۵- طیف سنجی فروسرخ (FTIR)

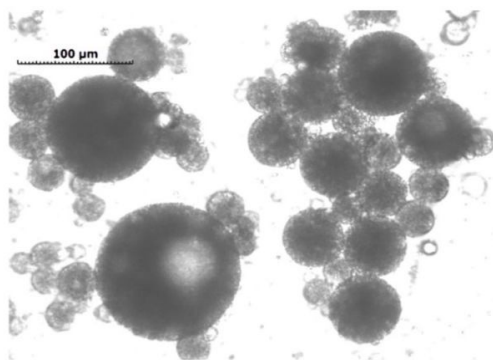
طیف سنجی فروسرخ نمونه‌ها بطور جداگانه در دستگاه FTIR مدل Perkin Elmer (آمریکا) مجهز به نرم افزار OMNIC FT-IR گرفته شد. طیف سنجی فروسرخ در دامنه‌ی طول موج  $4000$  تا  $500$   $cm^{-1}$  انجام گرفت.

### ۲-۳-۴- تجزیه و تحلیل داده‌ها

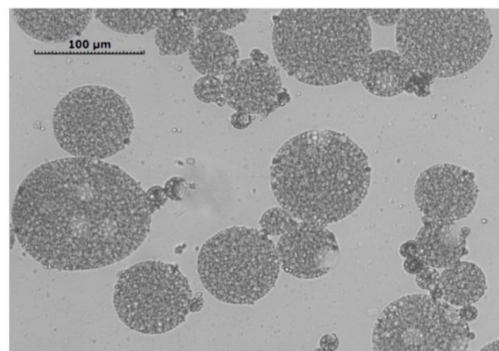
آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با حداقل سه تکرار انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش توکی در سطح  $5\%$  صورت گرفت و تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۶ انجام شد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- میزان آنتوسیانین عصاره‌ی اتانولی خشک شده‌ی تمشک



(A)



(B)

**Fig 1** (A) Micrograph of the double emulsion of treatment H obtained by optical microscopy (40×); (B) Micrograph of the coacervated microcapsule (prior to freeze-drying) of treatment H obtained by optical microscopy (40×).

دوگانه و کواسرواسیون کمپلکس به ترتیب در دامنه‌ی بین  $26/97 \pm 3/24$  و  $65/86 \pm 3/24$  میکرون و  $45/25 \pm 0/97$  و  $109/49 \pm 4/77$  بودند (جدول ۱). با مقایسه‌ی نتایج، می‌توان

### ۳-۳- آنالیز اندازه‌ی ذرات

قطر متوسط قطرات امولسیون ساده  $1/84 \pm 0/79$  میکرون بود. اندازه‌ی متوسط ذرات میکروکپسول‌های تولید شده با امولسیون

دانست، چرا که افزایش غلظت پروتئین منجر به کاهش اندازه‌ی قطرات امولسیون می‌شود که باعث بهبود بازده درون‌پوشانی و پایداری قطرات می‌گردد [۲۱]. اندازه‌ی کپسول و ویژگی‌های آن می‌تواند با تغییر pH، قدرت یونی، نوع ماتریس، غلظت و نسبت، نوع ماده‌ی هسته و میزان بارگیری [۲۲] و همچنین سرعت همزنی، سرعت سرد کردن و خشک کردن تغییر کند.

نتیجه گرفت که میکروکپسول‌های کواسرویت شده متوسط اندازه-ی ذرات بزرگتری از امولسیون‌های دوگانه داشتند. متوسط اندازه-ی ذرات میکروکپسول‌ها با افزایش غلظت پلیمرها کاهش یافت؛ بطوریکه قطر متوسط میکروکپسول‌های فرمولاسیون‌های A و B بیشتر از فرمولاسیون‌های C و D بود. نتایج ما مطابق با نتایج کومیونانو همکاران [۱۳] و روجا-سلمی و همکاران [۲۰] بود. علت آن را می‌توان مربوط به خواص سورفاکتانی پروتئین

**Table 1** Average diameters of the droplets and capsules corresponding to the double emulsions and the coacervates of black raspberry ethanolic extracts prior to freeze drying\*.

Treatments	Composition of the various treatments			Average diameters	
	GE <sup>1</sup> (%V/V)	GA (%V/V)	Core solution (%w/w) <sup>2</sup>	Droplets corresponding to the double emulsion (µm)	Coacervated microcapsules (µm)
A	5.0	5.0	75	45.05±3.12 <sup>a</sup>	63.97±2.23 <sup>ab</sup>
B	7.5	7.5	75	28.46±1.96 <sup>c</sup>	49.83±3.51 <sup>cd</sup>
C	5.0	5.0	100	41.18±3.71 <sup>b</sup>	56.59±2.43 <sup>bc</sup>
D	7.5	7.5	100	31.53±2.81 <sup>c</sup>	45.25±0.97 <sup>d</sup>

There were no significant differences among the samples with the same letters in the same column ( $P < 0.05$ )

1 Polymer solution concentration (%V/V).

2 Core solution concentration percentage in relation of total polymer concentration (%w/w) GE= Gelatin; GA= Gum Arabic.

همه‌ی نمونه‌های میکروکپسول شده میزان رطوبت کمتری نسبت به نمونه‌ی کنترل دارند که تایید کننده‌ی پایداری بالای آن‌ها از نظر میکروبی و شیمیایی است.

### ۳-۴- رطوبت، انحلال‌پذیری و هیگروسکوپی

**Table 2** Physicochemical properties mean values for various formulations of microcapsules, gelatin, gum Arabic and unencapsulated black raspberry anthocyanins as control\*.

Treatments	Moisture (%)	Solubility (%)	Hygroscopicity (%)	Loading capacity (%)	Stability of ANCs stored for 60 days at temperature of 37 °C
A	3.72±0.60 <sup>ab</sup>	46.16±1.75 <sup>a</sup>	42.25±1.18 <sup>a</sup>	38.15±0.41 <sup>b</sup>	35.92±0.50 <sup>a</sup>
B	4.40±1.02 <sup>a</sup>	30.96±0.65 <sup>c</sup>	41.20±0.67 <sup>a</sup>	39.86±0.37 <sup>ab</sup>	29.91±0.25 <sup>b</sup>
C	1.39±0.12 <sup>c</sup>	39.84±1.89 <sup>b</sup>	36.00±0.88 <sup>b</sup>	40.24±0.28 <sup>ab</sup>	35.77±0.18 <sup>a</sup>
D	2.75±0.55 <sup>bc</sup>	23.44±0.46 <sup>d</sup>	41.80±0.54 <sup>a</sup>	41.72±0.30 <sup>a</sup>	31.20±0.35 <sup>b</sup>
Gelatin	10.61±0.75	13.52±0.23	17.16±0.08	-	-
Gum Arabic	9.95±0.28	72.96±1.96	46.51±1.21	-	-
Control	23.39±1.78	74.08±1.07	85.22±1.02	-	0

There were no significant differences among the samples with the same letters in the same column ( $P < 0.05$ )

میزان هیگروسکوپی میکروکپسول‌ها به طور قابل توجهی کمتر از نمونه‌ی کنترل بود (جدول ۲). نتایج هیگروسکوپی ما بیشتر از هیگروسکوپی گزارش شده در ریزپوشانی لیکوپن با روش کواسرواسیون کمپلکس ژلاتین-پکتین بودند [۲۳]. اعداد هیگروسکوپی بالای ماده‌ی هسته بدلیل ماهیت آبدوستی بالای

با مقایسه‌ی نتایج انحلال‌پذیری (جدول ۲)، کاهش قابل توجهی در میزان انحلال‌پذیری بین نمونه‌ی کنترل و نمونه‌های میکروکپسول شده وجود داشت. با کاهش میزان انحلال‌پذیری عامل فعال در طی فرآیند درون‌پوشانی، ماده فعال می‌تواند به آرامی رهاش یابد که تایید کننده‌ی پایداری بیشتر در طول زمان است.

روند مشابهی در مورد نمونه‌های میکروکپسوله شده با شدت کمتر مشاهده گردید؛ در این دما ۲۹/۹۱ تا ۳۵/۷۷ درصد از غلظت اولیه‌ی آنتوسیانین‌ها باقی ماند که ثابت کننده‌ی اثر مخرب دما روی ماده‌ی درون‌پوشانی شده می‌باشد. این نتایج، ویژگی‌های فوق‌العاده‌ی روش ریزپوشانی و عوامل درون‌پوشانی انتخاب شده از نقطه نظر پایداری آنتوسیانین‌ها را تایید می‌کند. میکروکپسول‌ها رنگ قرمز شدیدی را بعد از مدت زمان نگهداری در مقایسه با نمونه‌ی کنترل نشان دادند که تأیید کننده‌ی مؤثر بودن روش انتخابی در محافظت از آنتوسیانین‌هاست. در واقع، میکروکپسول‌ها می‌تواند مانع محافظتی در مقابل اکسیژن، نور، حرارت و رطوبت ایجاد کند که عمده‌ترین دلایل ناپایداری آنتوسیانین‌ها هستند [۲۵].

به طور کلی، افزایش غلظت مواد درون‌پوشانی نتیجه‌ای در افزایش قابل توجه در محافظت از آنتوسیانین‌ها نداشت، بطوریکه میکروکپسول‌های تولید شده با ۵ درصد عوامل درون‌پوشانی میکروکپسول‌هایی با بیشترین پایداری آنتوسیانین‌ها را نشان دادند.

### ۳-۷- طیف‌سنجی فرو سرخ (FT-IR)

بطور خلاصه، هر دوی ژلاتین و صمغ عربی پیک‌های FTIR حدود  $3300 \text{ cm}^{-1}$  نشان دادند، که شاخصی از گروه‌های آمینی است (شکل ۲). پیک مشاهده شده با شدت کم در حدود  $2900 \text{ cm}^{-1}$  اسپکترای ژلاتین مربوط به گروه‌های کربوکسیل آزاد است. در نگاه اول، ظهور پیک‌های جدید و همچنین انتقال برخی از پیک‌های موجود در اسپکترای میکروکپسول در مقایسه با عوامل درون‌پوشانی می‌تواند گواهی از انجام برهمکنش شیمیایی باشد. بدلیل محیط اسیدی فرآیند کواکراسیون، گروه‌های آمینی ژلاتین به عنوان گروه مثبت با گروه‌های کربوکسیل آزاد صمغ عربی با بار منفی برهمکنش داده و گروه‌های آمیدی تشکیل می‌دهند که می‌تواند در حدود  $1453 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به اسپکترای FTIR میکروکپسول مشاهده کرد. اما وجود پیک‌های آمینی و کربوکسیلی در اسپکترای میکروکپسول نشان‌دهنده‌ی عدم شرکت همه‌ی گروه‌های یونیزه‌ی ژلاتین و صمغ عربی در فرآیند کواکراسیون بود.

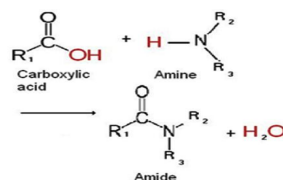
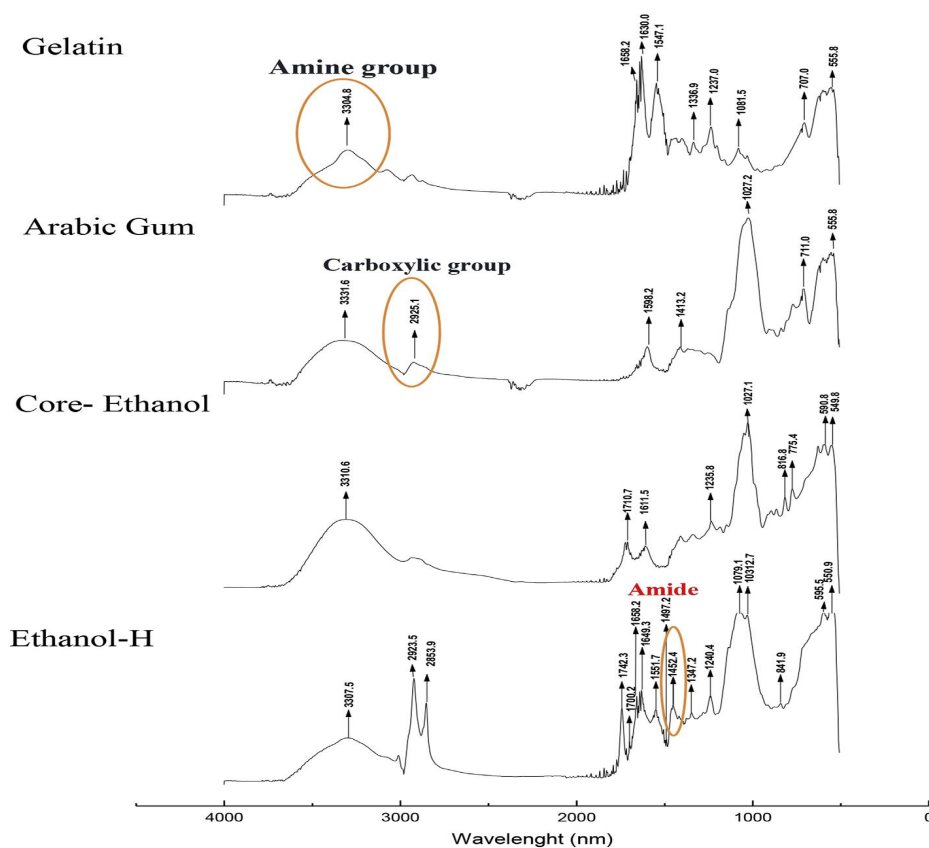
آنتوسیانین‌های هسته دور از انتظار نبود. بدلیل هیگروسکوپ‌ی بالا، حمل و نقل و بسته‌بندی میکروکپسول‌ها بخصوص در مناطق مرطوب بایستی با استفاده از ظروف مخصوص طراحی شده که غیر قابل نفوذ به آب هستند انجام گیرد.

### ۳-۵- میزان بارگیری

ظرفیت بارگیری میکروکپسول‌های کواکراسیون شده بین  $38/15 \pm 0/41$  و  $41/72 \pm 0/30$  بود (جدول ۲)، که بدلیل ماهیت آبدوستی بالای آنتوسیانین‌ها قابل قبول است. بر خلاف نتایج گزارش شده توسط روچا-سلمیو همکاران [۲۰]، ظرفیت بارگیری میکروکپسول‌ها در مطالعه‌ی ما با افزایش غلظت هسته افزایش یافت. این تفاوت ممکن است به دلیل اثر سینرژیستی توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر هیدروفیل باشد که می‌تواند به طور مؤثرتری در سطح بین امولسیون‌های اولیه و ثانویه در مقایسه با تنها ژلاتین عمل کند که از کاهش ماده‌ی هسته ممانعت می‌کند. از طرف دیگر، ظرفیت بارگیری با افزایش ظرفیت پلیمر تا ۵ درصد افزایش یافت. بنابراین، فرمولاسیون C می‌تواند به عنوان بهترین فرمولاسیون از نظر ظرفیت بارگیری انتخاب گردد چرا که بازده ریزپوشانی بالا ( $40/0 \pm 24/28$ ) داشته و مقدار مواد کمتری جهت تهیه آن در مقایسه با فرمولاسیون‌های B و D مورد نیاز است. طیف وسیعی از ظرفیت بارگیری در منابع گزارش شده است که ممکن است بدلیل تفاوت در ماده هسته، گونه‌های ماکرومولکول‌ها و نسبت مواد دیواره باشد؛ ظرفیت بارگیری نیسین و عصاره‌ی پوست آووکادو به ترتیب بین ۳/۰۵ و ۱۳/۵۹ و بین ۴/۵۸ تا ۲۰/۵۴ درصد گزارش شده است [۲۴]. آن‌ها نیسین را در ترکیب با عصاره‌ی آنتی‌اکسیدانی آووکادو به روش کواکراسیون کمپلکس ریزپوشانی کردند.

### ۳-۶- میزان پایداری در طول مدت نگهداری

هر دوی مواد درون‌پوشانی شده و درون‌پوشانی نشده با سرعت‌های مختلفی دچار تخریب شدند. تخریب آنتوسیانین‌ها در نمونه‌ی کنترل (عصاره‌ی اتانولی لیوفیلیزه شده‌ی تمشک سیاه بدون درون‌پوشانی) در طی نگهداری قابل توجه بود ( $P < 0/05$ )، بطوریکه بعد از ۶۰ روز نگهداری در  $37^\circ \text{C}$  کاملاً تخریب شد.



**Fig 2** FT-IR spectra of the gelatin, gum Arabic, unencapsulated black raspberry concentrated extract and the coacervated microcapsule of treatment C.

این میکروکپسول به عنوان میکروکپسول بهینه جهت اهداف غنی سازی می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

#### ۴- نتیجه گیری

با در نظر گرفتن هدف این مطالعه آنتوسیانین های تمشک سیاه وحشی با موفقیت با روش کواسرواسیون کمپلکس ریزپوشانی شدند. گر چه همهی فرمولاسیون های بهینه ی تعیین شده را می توان مورد استفاده قرار داد، ولی با توجه به ویژگی های مناسب میکروکپسول های حاصل فرمولاسیون C (با نسبت ۱:۱ ژلاتین، صمغ عربی و آنتوسیانین تمشک با ۰/۰۵ g/mL پلیمر) و همچنین میزان بالای آنتوسیانین های آن پس از دو ماه مدت زمان انبارمانی،

#### ۵- منابع

- [1] Jakobek, L., Seruga, M., Medvidovic-Kosanovic, M., & Novak, I. (2007). "Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices". *DtschLebensmittRundsch*, Vol.103, PP.58-64
- [2] Yilmaz, K.U., Yasar, Z., Ercisli, S., Serce, S., Gunduz, K., Sengul, M., & Asma, B.M. (2009). "Some selected physico-chemical characteristics of wild and cultivated blackberry fruits

- products or processes and methods to make them". Springer, book chapter, chapter 2, pp 3-28
- [12] Lee, H.A., & Wicker, L. (1991). "Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit". *Journal of Food Science*, Vol.56, No.2, PP.466-468
- [13] Comunian, T. A., Thomazini, M., Alves, A. J. G., de Matos Junior, F. E., de Carvalho Balieiro, J. C., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). "Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release". *Food Research International*, Vol.52, No.1, PP.373-379
- [14] Nori, M.P., Favaro-Trindade, C.S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., de Camargo Balieiro, J.C., & Contreras Castillo, C.J. (2011). "Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation". *LWT - Food Science and Technology*, Vol.44, PP.429-435
- [15] Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). "Encapsulation of polyphenols - a review". *Trends in Food Science & Technology*, Vol.21, PP.510-523
- [16] Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). "Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Vol.6, No.4, PP.420-428
- [17] Cai, Y.Z., & Corke, H. (2000). "Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments". *Journal of Food Science*, Vol.65, No.6, PP.1248-1252
- [18] Idham, Z., Muhamad, I. I., & Sarmidi, M. R. (2012). "Degradation kinetics and color stability of spray - dried encapsulated anthocyanins from *hibiscus sabdariffa* l". *Journal of Food Process Engineering*, Vol.35, No.4, PP.522-542
- [19] Zhang, Z., Kou, X., Fugal, K., & McLaughlin, J. (2004). "Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.52, No.4, PP. 688-691
- [20] Rocha-Selmi, G. A., Theodoro, A. C., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). "Double emulsion stage prior to complex coacervation process formicroencapsulation of sweetener (*Rubusfruticosus* L.) from Turkey". *Romanian Biotechnological Letters*, Vol.14, PP.4152-4163
- [3] Wu, R., Feri, B., Kennedy, A.J., & Zhao, Y. (2010). "Effect of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries". *LWT- Food Science and Technology*, Vol.43, No.8, PP.1253-1264
- [4] Wang, W. D., Xu, & Sh. Y. (2007). "Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate". *Journal of Food Engineering*, Vol.82, No.3, PP.271-275
- [5] Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). "Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punicagranatum*) by spray drying". *International Journal of Food Science and Technology*, Vol.45, PP.1386-1394
- [6] Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). "Microencapsulation of anthocyanin pigments of blackcarrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier". *Journal of Food Engineering*, Vol.80, PP.805-812
- [7] Syamaladevi, R.M., Insan, S.K., Dhawan, S., Andrews, P., & Sablani, S.S. (2012). "Physicochemical properties of encapsulated red raspberry (*Rubusidaeus*) powder: influence of high-pressure homogenization". *Drying Technology*, Vol.30, PP.484-493
- [8] Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Schwarz, K., & Richling, E. (2012). "Preparation and comparative release characteristics of threeanthocyanin encapsulation systems". *Journal of Agriculturaland Food Chemistry*, Vol.60, PP.844-851
- [9] Betz, M., & Kulozik, U. (2011). "Microencapsulation of bioactivebilberry anthocyanins by means of whey protein gels". *Procedia Food Science*, Vol.1, PP.2047-2056
- [10] Flores, F.P., Singh, R.K., Kerr, W.L., Pegg, R.B., & Kong, F. (2014). "Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion". *Food Chemistry*, Vol.153, PP.272-278
- [11] Zuidam N.J., & Shimoni, E. (2010). "Overview of microencapsulates for use in food



- gelatin-pectin complex coacervation". *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol.36, No.2, PP.185-190
- [24] 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*, Vol.62, PP.49-57
- [25] Jackman, R. L., Yada, R. Y., Tung, M. A., & Speers, R. (1987). "Anthocyanins as food colorants-a review". *Journal of Food Biochemistry*, Vol.11, No.3, PP.201-247
- sucralose". *Journal of Food Engineering*, Vol.119, No.1, 28-32
- [21] Nesterenko, A., Alic, I., Françoise Silvestre, & Durrieu, V. (2013). "Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness". *Industrial Crops and Products*, Vol.42, PP.469-479
- [22] Klassen, D. R., & Nickerson, M. T. (2012). "Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides". *Food Research International*, Vol.46, PP.167-176
- [23] Silva, D. F., Favaro-Trindade, C. S., Rocha, G. A., & Thomazini, M. (2012). "Microencapsulation of lycopene by

## A novel approach for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation method using gelatin and gum Arabic as wall materials

Fathi-Achachlouei, B.<sup>1\*</sup>, Shaddel, R.<sup>2,3</sup>, Hesari, J.<sup>2</sup>, Azadmard-Damirchi, S.<sup>2</sup>, Akbari-Alavijeh, S.<sup>4</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Department of Food Science, Rutgers, The State University of New Jersey, USA
4. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan

In this work, we microencapsulated black raspberry extracts by double emulsion technique prior to complex coacervation using gelatin and gum Arabic to diminish the instability of their anthocyanins (ANCs), particularly under harsh conditions. The coacervation process was investigated as a function of gelatin, gum Arabic and the core material concentrations at ratios of 1:1:0.5 and 1:1:1, the concentration of polymer solutions (5.0 and 7.5%, w/v) as well as pH (3.5, 4.0, 4.5 and 5.0). Subsequently, morphology, particle size, moisture, solubility, hygroscopicity, loading capacity, stability, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were evaluated. The microcapsules presented the lower moisture, hygroscopicity and solubility values as comparing the free form of ANCs. They showed the average sizes ranging from  $45.25 \pm 0.97$  to  $87.92 \pm 7.18$   $\mu\text{m}$  and high loading capacity ( $33.05 \pm 0.31$  to  $41.72 \pm 0.30\%$ ). According to the HPLC results, the selected method significantly increased the stability of ANCs up to 36% after 2 months of storage at  $37 \pm 2$  °C. FT-IR spectra confirmed the occurrence of coacervation process. Furthermore, the selected optimal microcapsules revealed intense red color over the time of storage, implying the effectiveness of the method chosen to preserve anthocyanins.

**Keywords:** Black raspberry anthocyanins, Gelatin, Gum Arabic, Microencapsulation, Nutraceutical, Stability

---

\* Corresponding Author's E-mail Address: bahram1356@yahoo.com