

بهینه‌سازی رهایش میکروکپسول‌های لیکوپن ساخته شده با دیواره پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین توسط روش سطح پاسخ

آزاده سلیمی^{۱*}، یحیی مقصودلو^۲، سید مهدی جعفری^۳، علیرضا صادقی ماهونک^۴، مهدی کاشانی نژاد^۵، امان محمد ضیایی فر^۶

۱- استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان

۲- استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۶- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳/۰۷/۹۵ تاریخ پذیرش: ۳۰/۰۷/۹۶)

چکیده

لیکوپن رنگدانه کاروتنوئیدی با تاثیرات مثبت بر سلامتی انسان و حساس به شرایط محیطی است. یکی از روش‌های کنترل تخریب آن، ریزپوشانی توسط مواد بیوپلیمری درون میکروکپسول‌هاست. این تکنولوژی می‌تواند رهاسازی مواد فعال را کنترل نموده و در مقابل شرایط محیطی از آن‌ها محافظت نماید. در این روش لازم است در شرایط و زمان مناسب، رهایش صورت گرفته و ماده بتواند از دیواره‌های کپسول خارج شود. در این پژوهش، به منظور تولید پودرهای ریزپوشانی شده لیکوپن، از کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC) همراه با مالتودکسترین استفاده شد. بدین منظور امولسیون شامل محلول روغنی لیکوپن ۵٪ همراه با پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین تهیه شد. درصد مواد جامد و لیکوپن به ترتیب ۳۷/۰۴٪ و ۱۸/۶۶٪ و سرعت هموژنایزر ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه بود. سپس امولسیون تولید شده در خشک‌کن پاششی با دمای هوای ورودی ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و فشار نازل ۲ بار خشک شدند. در راستای یافتن بهترین شرایط رهایش در آب، از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی، استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل pH (۷ و ۱۱)، دمای آب (۲۴، ۶۲ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) و درصد نمک (۰/۵، ۱ و ۱/۵) بودند. نتایج نشان داد که با افزایش pH محیط آبی، به سمت قلیایی، رهایش مواد لیکوپن افزایش یافت. همچنین بیشترین سرعت رهایش در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و مقدار نمک ۰/۵٪ مشاهده شد و در دماهای بالاتر و پایین‌تر از آن، زمان رهایش طولانی‌تر بود. با افزایش مقدار نمک از ۰/۵٪ به ۱/۵٪ نیز سرعت آزاد سازی مواد کاهش یافت.

کلید واژگان: لیکوپن، بهینه‌سازی، رهایش، میکروکپسول، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات: a.salimi@semnan.ac.ir

۱- مقدمه

ریزپوشانی با استفاده از بیوپلیمرهای مختلف، یکی از روش‌های مورد استفاده برای افزایش مقاومت انواع مواد حساس در برابر شرایط محیطی است [۱ و ۲]. در واقع ریزپوشانی فرآیندی است که در آن ترکیبات فعال (مواد هسته)^۱ مانند رنگدانه‌ها، روغن-های حساس، مواد عامل عطر و طعم و غیره در داخل ماده ثانویه (دیواره)^۲ قرار می‌گیرند و در محل و زمان مناسب و به شکل کنترل شده، آزاد می‌شوند [۳ و ۴]. در این راستا، روش‌های مختلفی وجود دارند و می‌توان در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و شیمیایی از آن‌ها بهره برد.

اکثر میکروکپسول‌ها شامل هسته احاطه شده با دیواره می‌باشند که خود دیواره می‌تواند بصورت تک لایه یا چند لایه باشد. این تکنولوژی در مواد غذایی و نوشیدنی‌ها به کار می‌رود و رها سازی مواد فعال را کنترل نموده و در مقابل شرایط محیطی از آن‌ها محافظت می‌نماید [۵].

ماده‌ای که به عنوان دیواره استفاده می‌شود باید قادر باشد مواد هسته را در ساختاری کروی با بیشینه راندمان پوشش دهی کرده و به صورت دیواره‌ای حفاظتی، از فرآیندهای نامناسبی مانند اکسیداسیون مواد هسته در برابر اکسیژن ممانعت نماید. این امر سبب افزایش مدت ماندگاری مواد هسته می‌گردد [۶ و ۷]. در این راستا مواد گوناگونی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که در این بین بیوپلیمرها به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند خصوصیات امولسیفایری مناسب، افزایش ویسکوزیته، قابلیت تشکیل فیلم، انحلال‌پذیری در آب و خوراکی بودن بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲ و ۸].

تعدادی از بیوپلیمرهای طبیعی مانند مالتودکسترین قادرند فیلم‌های خوراکی مناسبی را اطراف مواد هسته تشکیل دهند که خود می‌توانند به صورت سدی در برابر رطوبت، اکسیژن و سایر عوامل محیطی عمل کرده و از تخریب مواد هسته تا حدود زیادی جلوگیری کنند. پروتئین‌ها نیز به علت فراوان بودن، ویژگی‌های امولسیفایری مناسب، ارزش غذایی و توانایی تشکیل فیلم، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۹]. همچنین صمغ‌ها و هیدروکلوئیدها

به دلیل توانایی جذب آب بالا، ویژگی امولسیفایری و تشکیل فیلم، قابلیت افزایش ویسکوزیته، خوراکی بودن و-غیره جزو ترکیبات طبیعی هستند که همواره در ریزپوشانی مورد توجه بوده‌اند [۶ و ۱۰-۱۴].

پروتئین آب پنیر شامل پروتئین‌های محلول موجود در ترکیب شیر می‌باشد که در مجموع ۱۸-۲۰٪ کل محتوای نیتروژن شیر را در بر می‌گیرند. بتالاکتوگلوبولین^۳ و آلفالاکتالبومین^۴ مهم‌ترین پروتئین‌های موجود در آب پنیر می‌باشند و مقداری از پروتئین-های دیگر مانند سرم آلبومین خون و ایمونوگلوبولین‌ها نیز در آن وجود دارند. گلیکوماکروپپتیدها^۵ از دیگر ترکیبات موجود در آب پنیر هستند که خواص امولسیفایری، تولید کف و حلالیت در بازه گسترده ای از pH، از خصوصیات آن‌ها می باشد. برای استحصال و جداسازی پروتئین‌های آب پنیر، معمولاً از روش‌های غشایی مانند اولترافیلتراسیون و میکروفلتراسیون استفاده می-شود [۱۵]. دلیل مورد توجه قرار گرفتن آب پنیر، ارزش غذایی بسیار بالا و جذب مناسب پروتئین‌های آن در بدن و به‌خصوص در بافت‌های ماهیچه‌ای و همچنین ویژگی‌های عملکردی بسیار کاربردی مانند قابلیت تشکیل ژل، اتصال به آب، خصوصیات امولسیفایری و تشکیل کف می‌باشد [۱۶].

پروتئین‌های آب پنیر عمدتاً به صورت کنسانتره پروتئین آب پنیر (۳۵-۸۰٪ پروتئین) و ایزوله پروتئین آب پنیر (بیش از ۹۰٪ پروتئین) به بازار عرضه می‌شوند. طبیعتاً ویژگی‌های تغذیه‌ای و عملکردی ایزوله بالاتر از کنسانتره است (به دلیل خلوص بالاتر و کمتر بودن لیپیدها، لاکتوز و نمک‌ها) اما از آنجا که تولید آن هزینه‌ی بیشتری دارد، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین شرایط فرآیند مانند دما، pH و قدرت یونی محیط نیز می‌توانند تاثیر به‌سزایی در ویژگی‌های عملکردی آن داشته باشند [۱۷].

یکی از ویژگی‌های مهم مواد ریزپوشانی شده، قابلیت رهایش^۶ آن‌ها در شرایط کنترل شده و در زمان و مکان مناسب است. در واقع اگر میکروکپسولی تولید شود که پایداری و ویژگی محافظتی مناسبی داشته باشد اما رهایش آن در محیط مورد نظر ما به‌خوبی صورت نگیرد، اهداف ریزپوشانی برآورده نشده است. بر اساس

3. β -Lactoglobulin
4. α -Lactalbumin
5. Glycomacropeptide
6. Release

1. Core Material
2. Wall Material

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کلیه مواد مورد استفاده از تولید کنندگان معتبر و باکیفیت تهیه شدند. لیکوپن خالص از شرکت آنهویی مینمتالز دولوپمنت^{۱۲} (آنهویی چین) خریداری شد؛ مالتودکسترین با دکستروز اکی والان ۲۰ از شرکت کینهانگدائو لیهو^{۱۳} (کینهگادائو، چین) تهیه شد؛ روغن سویا ماهک ساخته شده در شهرک صنعتی سلیمی (تبریز، ایران)، از بازار محلی خریداری شد؛ کنسانتره پروتئین آب پنیر (۸۰٪) از شرکت ساپوتو چیز^{۱۴} (آمریکا) تهیه گردید؛ هگزان با خلوص بالا (۹۵٪) از شرکت دکتر مجلی (ایران) و اتانول ۹۹٪ از شرکت هامون طب (ایران) تهیه شدند؛ منو سدیم فسفات و دی سدیم فسفات، اسید سیتریک و کلرید سدیم از شرکت مرک (آلمان) خریداری گردیدند.

۲-۲- دستگاه‌ها

در این پژوهش، هموژنایزر دور بالا D91126 (هایدولف^{۱۵}، آلمان)، خشک کن پاششی (آذرمخن، ایران)، سانتریفوژ (ستوریون ساینترفیک^{۱۶}، انگلستان) و ترازو TE313S (سارتوریوس^{۱۷}، آلمان) مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۳- روش‌ها

به منظور تولید امولسیون‌ها، گام اول حل کردن مواد جامد در آب بود. کنسانتره پروتئین آب پنیر و پودر مالتودکسترین به نسبت ۱ به ۴ با یکدیگر مخلوط شدند. با در نظر گرفتن اینکه درصد مخلوط مود جامد معادل ۳۷/۰۴٪ بود، برای آماده‌سازی ۱۰۰ میلی لیتر امولسیون، ۲۹/۶ گرم، مالتودکسترین در آب مقطر حل شد و برای اطمینان از انحلال کامل آن، به مدت یک شب باقی ماند تا محلول شفاف به دست آید.

کنسانتره پروتئین آب پنیر نیز به مقدار ۷/۴ گرم توزین شده و با آب مقطر مخلوط گردید. pH با استفاده بافر فسفات روی ۷ تنظیم شد. سپس تیمار حرارتی در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت

تحقیقات انجام شده، عوامل گوناگونی از جمله جنس و ماهیت مواد دیواره و ویژگی‌های محیط رهایش می‌توانند کیفیت این فرآیند را تحت تاثیر قرار دهند [۱۸ و ۱۹]. بدین ترتیب یافتن بهترین شرایط رهایش مواد، اهمیت بسزایی داشته و توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است.

بهینه‌سازی عبارت است از بهبود عملکرد یک سامانه، فرآیند یا روش تولید به منظور دستیابی به حداکثر سود از آنها. در روش‌های قدیمی، بهینه‌سازی از طریق ثابت نگه داشتن کلیه عوامل و بررسی تنها اثر تغییرات یک عامل روی پاسخ‌ها بررسی می‌شد. این روش بهینه‌سازی، روش "تک عاملی"^۷ نامیده می‌شود. بزرگ‌ترین مشکلات این روش، افزایش تعداد آزمایشات لازم و عدم بررسی اثرات متقابل بین متغیرها است. به منظور برطرف کردن این مشکلات، امروزه بهینه‌سازی با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره انجام می‌شود. از میان چندین روش موجود، روش رویه سطح پاسخ، رایج‌ترین روش موجود می‌باشد که اولین بار توسط باکس و همکاران در سال ۱۹۵۷ [۲۰] ارائه شد.

روش سطح پاسخ، مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی و آماری است که برای مدل‌سازی و تجزیه و تحلیل مسائلی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آن‌ها پاسخ مورد نظر تحت تأثیر چندین متغیر گوناگون قرار دارد. هدف از اعمال این روش، یافتن بهترین مجموعه از سطوح عامل برای رسیدن به بعضی ویژگی‌های خاص و مورد نظر می‌باشد [۲۱].

متداول‌ترین طرح‌هایی که در روش سطح پاسخ استفاده می‌شوند عبارتند از طرح‌های باکس بنکن^۸ و مرکب مرکزی^۹. طرح مرکب مرکزی می‌تواند شامل طرح چرخشی^{۱۰} که در آن نقاط آزمایشی در فاصله α از نقطه مرکزی قرار گرفته‌اند و نقاط مرکزی^{۱۱} باشد [۲۲].

هدف از این پژوهش، بررسی و بهینه‌سازی فرآیند رهایش لیکوپن ریزپوشانی شده در شرایط متغیر pH، دمای آب و درصد نمک بود.

12. Anhui Minmetals Development Co. Ltd
13. Qinhuangdao Lihua Starch Co. Ltd
14. Sapoto cheese
15. Heidolph
16. Centurion Scientific
17. Sartorius

7. One-factor-at-a-time
8. Box-Behnken
9. Central Composite
10. Rotatable
11. Face Center

و فاز رویی جدا شده و جذب آن در ۴۷۰ نانومتر خوانده شده و با کمک منحنی استاندارد مقدار لیکوپن به‌دست آمد (با استناد به روش ارائه شده برای مقدار لیکوپن توسط چپو و همکاران، ۲۰۰۷ [۱۹] و لین و همکاران، ۲۰۰۳ [۲۶]). برای محاسبه زمان جذب آب کامل پودرها، ۲ گرم از نمونه در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شده و توسط مگنت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد تا دیگر هیچ ذره‌ای از پودر حل نشده در آب دیده نشود. مدت زمانی که طول کشید تا پودرها کاملاً حل شوند، به‌عنوان زمان جذب آب ثبت گردید [۲۷]. مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل در جدول ۱ درج شده‌اند.

۲-۴- آنالیز آماری

به منظور یافتن بهترین شرایط رهایش مواد هسته، از روش سطح پاسخ استفاده شد. طرح انتخابی، طرح مرکب مرکزی با نقاط مرکزی در هر وجه و چهار نقطه مرکزی بود که بر این اساس ۱۸ تیمار توسط نرم افزار طراحی و ارائه شد. متغیرهای این بخش شامل دمای آب (حداقل ۲۴ و حداکثر ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد)، pH محیط (حداقل ۳ و حداکثر ۱۱) و درصد نمک (حداقل ۰/۵ و حداکثر ۱/۵ درصد) بودند. پاسخ‌های مورد بررسی شامل مقدار لیکوپن آزاد شده در محیط و زمان جذب آب کامل پودرها بودند. معنی‌دار بودن یا نبودن هر یک از ضرایب مدل‌های ارائه شده توسط نرم‌افزار، از طریق بررسی p -value مشخص شد و مقادیری که ارزشی بالاتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار نبوده و از مدل‌ها حذف شدند تا مدل‌های جدیدی با پارامترهای معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) به‌دست آیند. کیفیت مدل‌های مناسب از طریق بررسی ضریب همبستگی و ضریب همبستگی تنظیم شده مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین برای بررسی تصویری و گرافیکی تاثیرات متغیرهای مستقل، از طرح‌های سه‌بعدی و کانتور مدل‌های رگرسیونی استفاده شد.

۳۰ دقیقه برای دنا توره شدن و ایجاد خاصیت امولسیفایری اعمال گردید [۲۳] و در نهایت نمونه‌های آماده شده با یکدیگر ترکیب شدند.

در مرحله بعد، لیکوپن خریداری شده با روغن سویا مخلوط شد تا محلول یکنواخت ۵٪ وزنی/حجمی لیکوپن در روغن تهیه شود. بدین منظور ابتدا ۵ گرم لیکوپن با مقداری روغن ترکیب شد و در بالن ۱۰۰ به حجم رسانیده شد. سپس مخلوط خوب هم زده شد تا لیکوپن کاملاً در روغن حل گردد [۲۴]. برای تولید امولسیون‌ها، محلول روغنی لیکوپن به‌طور تدریجی به مخلوط تهیه شده از ترکیب مالتودکسترین و کنسانتره پروتئین آب پنیر اضافه شد (درصد مواد جامد و لیکوپن به ترتیب ۳۷/۰۴٪ و ۱۸/۶۶٪ در نظر گرفته شد). بدین منظور و برای مخلوط کردن دو فاز، از هموژنایزر دور بالا استفاده شد. در مرحله اول برای تولید امولسیون اولیه با ذرات درشت، از سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و سپس برای تولید نهایی امولسیون‌ها، از سرعت ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد [۲۴ و ۲۵]. برای ادامه روند ریزپوشانی، نمونه امولسیون تولید شده به یک خشک‌کن پاششی پیلوت با ارتفاع ۳ متر و قطر داخلی ۱/۵ متر که مجهز به اتمایزر از نوع نازل فشاری بود منتقل گردید. قطر سر نازل، ۰/۵ میلی‌متر، دمای هوای ورودی و خروجی به ترتیب ۱۵۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد و فشار هوای نازل ۲ بار بودند. دبی جرمی خوراک ورودی نیز ۶ kg/hr بود.

برای بدست آوردن مقدار لیکوپن آزاد شده در زمانی مشخص (۵ دقیقه)، مقدار معینی از پودر ریزپوشانی شده داخل آب مقطر ریخته شد و با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه توسط مگنت هم زده شد تا مواد دیواره به طور کامل در آب حل شوند. سپس ۴۰ میلی‌لیتر مخلوط هگزان و اتانول (نسبت ۳ به ۴) به آن اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ دقیقه با هموژنایزر با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه هم زده شد تا کاملاً یکنواخت شود. در گام بعدی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند

Table 1 Symbols, coded and real values of independent variables

Coded levels			Independent variables	Symbol
1	0	-1		
100	62	24	Water temperature (centigrade)	X ₁
11	7	3	pH	X ₂
1.5	1	0.5	Sodium chloride (%)	X ₃

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی آماری نتایج بدست آمده توسط

نرم افزار

مقدار لیکوپن آزاد شده در زمانی معین (پس از ۵ دقیقه) و همچنین مدت زمان جذب آب کامل (رهایش تمام مواد هسته)، در جدول ۲ آورده شده‌اند. در مورد هر دو پاسخ مقدار لیکوپن آزاد شده پس از ۵ دقیقه و زمان جذب آب، مقادیر بهینه شده با مدل درجه دو تعریف شدند. ضرایب همبستگی برای مقدار لیکوپن آزاد شده و زمان جذب آب، به ترتیب 0.9865 و 0.9972 بودند که پس از ساده کردن مدل‌ها به 0.9819 و 0.9966 کاهش یافتند.

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، مقادیر تجربی به‌دست آمده هم‌خوانی مناسبی با مقادیر پیش‌بینی شده توسط روش سطح

پاسخ داشتند و ضرایب همبستگی نشان می‌دهند که مدل‌های انتخاب شده به خوبی با داده‌ها هماهنگ شده‌اند.

همچنین از جدول آنالیز واریانس‌ها برای بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن پارامترهای مدل‌ها استفاده شد (جدول ۳) و بر اساس نتایج به‌دست آمده، متغیرهایی که بیشترین تاثیر را بر رهایش لیکوپن داشته‌اند، به ترتیب پارامتر خطی دمای آب و مقدار pH محیط و پارامتر درجه دوم دمای آب بودند. پس از آن‌ها، پارامتر خطی و درجه دوم مقدار نمک بیشترین تاثیر معنی‌دار را داشتند ($p < 0.05$)، سایر پارامترها تاثیر معنی‌داری نداشته و از مدل حذف شدند.

در مورد مدت زمان جذب آب، متغیرهای مستقلی که بیشترین تاثیر معنی‌دار را داشتند، پارامتر خطی و درجه دوم دمای آب و پارامتر خطی مقدار pH بودند و پس از آن‌ها، پارامتر خطی مقدار نمک و همچنین اثر متقابل pH محیط و مقدار نمک بیشترین تاثیر معنی‌دار را داشتند ($p < 0.05$). سایر پارامترهای درجه دو و اثرات متقابل، تاثیر معنی‌داری نداشته و از مدل حذف شدند.

Table 2 Experimental and predicted values of lycopene and rehydration time of encapsulated powders

Dependent values				Independent values			
Time of complete rehydration (sec)		Amount of released lycopene in 5 min (g/kg)		Amount of sodium chloride (% w/w)	pH	Water temperature (degrees centigrade)	
predicted	experimental	predicted	experimental	X ₃	X ₂	X ₁	Run
446.20	438	0.11	0.10	1.5	7	62	1
474.92	481	0.095	0.098	1.5	11	24	2
538.92	525	0.093	0.093	0.5	2	24	3
409.50	451	0.11	0.11	1	7	62	4
478.20	441	0.10	0.10	1	3	62	5
1484.08	1512	0.066	0.067	1.5	3	100	6
536.80	555	0.091	0.089	1	7	24	7
1350.93	1383	0.074	0.071	0.5	3	100	8
340	363	0.11	0.11	1	11	62	9
1286.93	1268	0.083	0.082	1.5	11	100	10
1273.28	1261	0.089	0.089	0.5	11	100	11
461.27	462	0.10	0.10	0.5	11	24	12
672.07	661	0.084	0.085	1.5	3	24	13
409.50	432	0.11	0.11	1	7	62	14
409.50	424	0.11	0.11	1	7	62	15
372.80	362	0.11	0.12	0.5	7	62	16
409.50	365	0.11	0.11	1	7	62	17
1348.80	1320	0.075	0.078	1	7	100	18

Table 3 Analysis of variance of regression coefficients of models for lycopene and rehydration time of encapsulated powders

Released lycopene			Rehydration time			variables
P-value	F-value	Regression coefficients	P-value	F-value	Regression coefficients	
		0.11			410.26	X ₀
						Linear
<0.0001	115.75	-7.88×10 ⁻⁴	<0.0001	1918.25	406	X ₁
<0.0001	80.38	6.57×10 ⁻³	<0.0001	54.92	-68.70	X ₂
0.0003	25.81	-3.72×10 ⁻³	0.0019	15.67	36.70	X ₃
						2 Factor Interaction (2FI)
0.1533	2.49	1.369×10 ⁻³	0.2152	1.81	-15.38	X ₁ X ₂
0.7604	0.100	2.739×10 ⁻⁴	0.8405	0.043	-2.38	X ₁ X ₃
0.7604	0.100	2.739×10 ⁻⁴	0.0138	8.31	-29.87	X ₂ X ₃
						Quadratic
<0.0001	341.94	-0.024	<0.0001	1471/00	534.98	X ₁ ²
0.9056	0.015	-1.82×10 ⁻⁴	0.9794	7.12×10 ⁻⁴	-0.52	X ₂ ²
0.0396	5.33	3.104×10 ⁻³	0.9009	0.017	-2.52	X ₃ ²
		0.9865			0.9972	R ²
		0.9713			0.9941	Adj-R ²

X₁: water temperature (centigrade) ; X₂: pH ; X₃: sodium chloride (w/w %)**۳-۲- معادلات نهایی بر اساس پارامترهای کد**

شده

۳-۲-۱- معادلات نهایی برای رهایش لیکوپن:

پیش از ساده‌سازی:

۳-۲-۲- معادلات نهایی برای جذب آب:

پیش از ساده‌سازی:

$$29/87X_1X_3 - 2/38X_1X_2 - 10/38X_3 - 36/70X_2 + 68/70X_1 - 406 + 410/36$$

$$X_3^2 - 0.024X_2^2 - 0.0001X_1^2 - 0.0001X_2X_3 +$$

پس از ساده‌سازی:

$$X_1^2 - 0.0001X_2X_3 + 29/87X_3 - 36/70X_2 + 68/70X_1 - 406 + 410/36$$

۳-۳- بررسی نمودارهای سه‌بعدی و کانتور**مدل‌های رگرسیونی**

برای مشهود شدن اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ‌ها، ارائه نمودار-های سه‌بعدی و کانتور بسیار موثر است. از طریق بررسی این اشکال گرافیکی، می‌توان تاثیر متغیرهای مستقل بر پاسخ را در نقاط مختلف بررسی کرد و بدین ترتیب با یافتن نقطه تقاطع بین متغیرها، می‌توان مقدار دقیق ویژگی اندازه‌گیری شده تحت عنوان پاسخ را یافته و ثبت نمود [۲۸]. برای ترسیم این نمودارها، دو متغیر مستقل و یک متغیر وابسته در حالی که سومین متغیر مستقل

$$0/11 - 7/88 \times 10^{-4} X_1 + 6/57 \times 10^{-3} X_2 - 3/72 \times 10^{-3} X_3 + 1/369 \times 10^{-2}$$

$$^3 X_1 X_2 + 2/739 \times 10^{-4} X_1 X_3 + 2/739 \times 10^{-4}$$

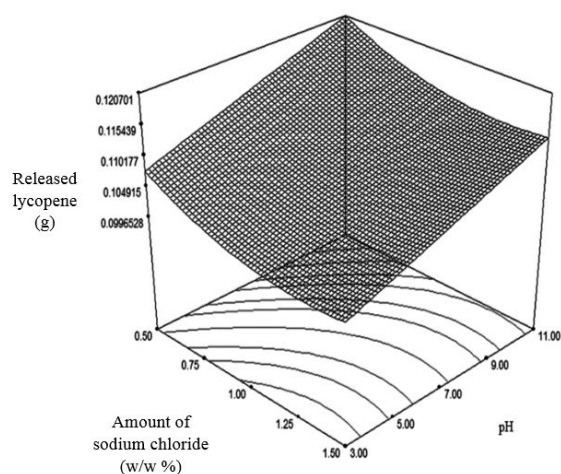
$$X_2 X_3 - 0/024 X_1^2 - 1/82 \times 10^{-4} X_2^2 + 3/104 \times 10^{-3} X_3^2$$

X₁: دمای آب (درجه سانتی‌گراد)pH : X₂X₃: کلرید سدیم (درصد وزنی/وزنی)

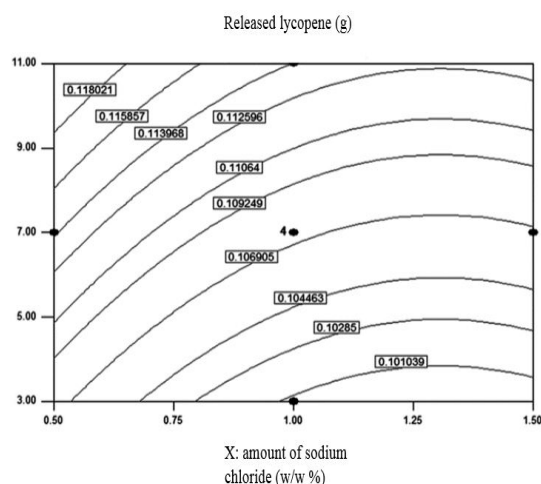
پس از ساده‌سازی:

$$-0/024 X_3^3 - 10 \times 10^{-3} X_2^3 - 10 \times 6/57 X_1 + 406 + 410 \times 7/88 - 0/11$$

$$X_3^{23} - 10 \times 3/104 X_1^2 +$$



(a)



(b)

Fig 2 effect of amount of sodium chloride and pH on released lycopene at constant water temperature (62 °C); a: 3D; b: counter

۳-۳-۲-تاثیر متغیرهای مستقل بر زمان جذب آب

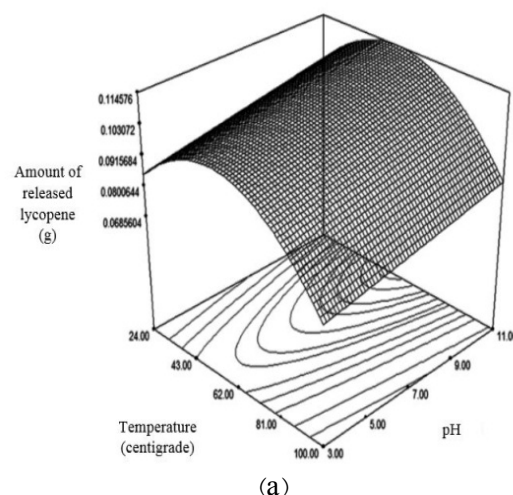
زمان جذب آب کامل پودرها که نشان دهنده زمان رهائش تمام لیکوپن موجود در میکروکپسول‌ها در محیط است، تحت تاثیر هر سه متغیر مستقل مورد بررسی قرار داشته و رابطه آن‌ها با هم، در شکل‌های ۳ و ۴ مشخص شده است.

نتایج به دست آمده در بخش رهائش مواد هسته حاکی از آن بود که شرایط محیطی می‌تواند تاثیر به سزایی بر مقدار لیکوپن آزاد شده در یک زمان مشخص و همچنین زمان جذب آب کامل و

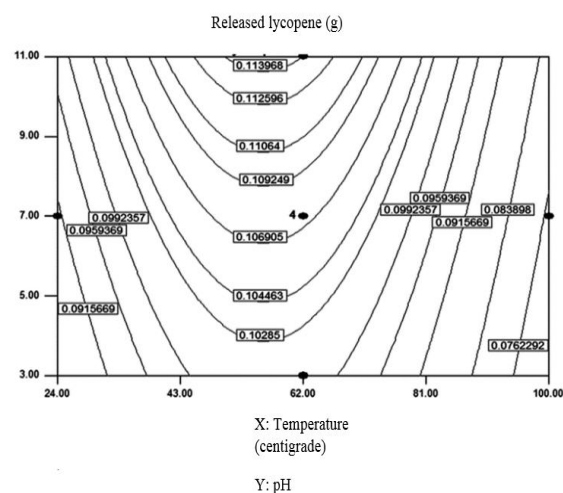
در مقدار مرکزی خود (مقدار میانی که توسط نرم افزار با داشتن مقادیر حداکثر و حداقل ارائه شده بود) ثابت نگه داشته شده بود، به تصویر کشیده شدند [۲۹].

۳-۳-۱-تاثیر متغیرهای مستقل بر مقدار لیکوپن آزاد شده

بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار لیکوپن آزاد شده، متاثر از دمای آب، مقدار pH و مقدار نمک کلرید سدیم موجود در محیط بود و میزان تغییرات رهائش لیکوپن با توجه به مقادیر متغیرهای مستقل، در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص شده است.

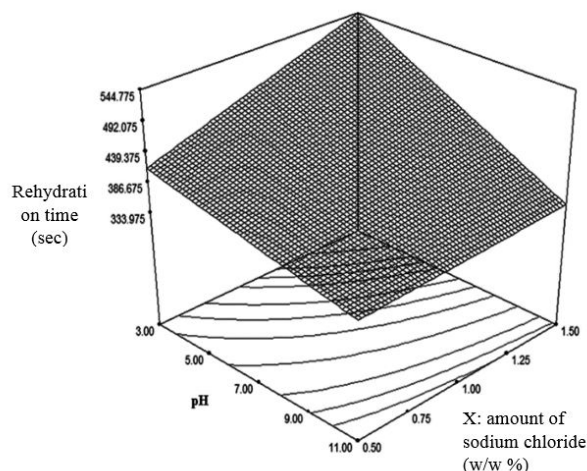


(a)

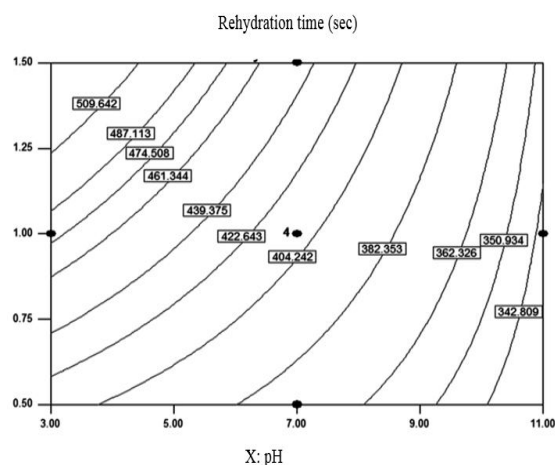


(b)

Fig 1 effect of water temperature and pH on released lycopene at constant amount of sodium chloride (1%); a: 3D; b: counter



(a)



(b)

Fig 4 effect of amount of sodium chloride and pH on rehydration time at constant water temperature (62 °C)
; a: 3D; b: counter

۴-۳- بحث و بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر

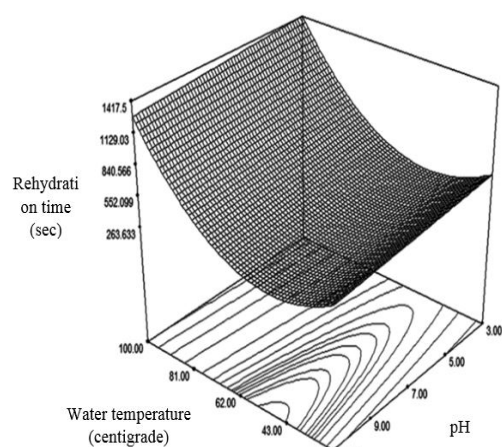
پاسخ‌ها

۴-۳-۱- اثر دما بر رهایش

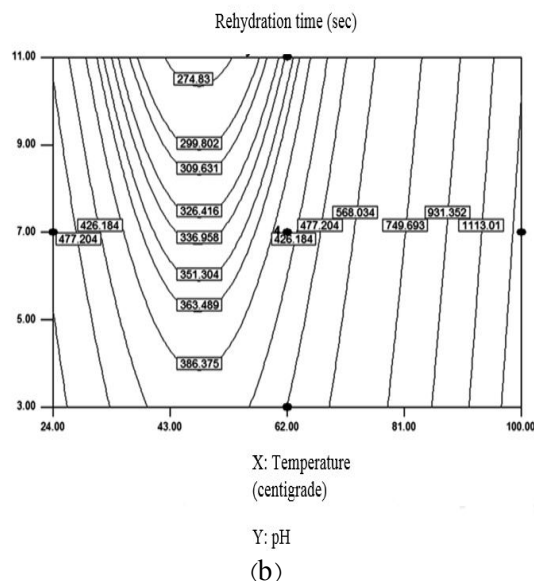
یکی از عوامل موثر بر سرعت انتقال جرم و شار نفوذ، مقدار ضریب نفوذ می‌باشد که خود به طور مستقیم با دما رابطه دارد و با افزایش دما، مقدار ضریب نفوذ نیز افزایش می‌یابد و رابطه بین دما و ضریب نفوذ رطوبت به شرح ذیل است [۳۶]:

رهایش تمام لیکوپن در محیط داشته باشند. در این بین تاثیر دمای آب بسیار زیاد بوده و پس از آن، مقدار pH محیط و درصد نمک در این زمینه تاثیرگذار بودند.

سرعت جذب آب دیواره‌ها و رهایش مواد تابع عوامل گوناگون محیطی است که از مهم‌ترین آن‌ها دمای آب محیط است [۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴ و ۳۵].



(a)



(b)

Fig 3 effect of water temperature and pH on rehydration time at constant amount of sodium chloride (1%); a: 3D; b: Counter

$$D = 0.01751 \times e^{-6152.7/T}$$

D: ضریب نفوذ (m^2/s)

T: درجه حرارت مطلق

بدین ترتیب انتظار می‌رود هنگامی که پودرها در محیط آبی با دمای بالاتر قرار گیرند، سرعت نفوذ مولکول‌های آب به داخل آن‌ها بیشتر بوده و جذب آب و رهائش مواد هسته با سرعت بیشتری رخ دهد [۳۰، ۳۱ و ۳۲]. با توجه به نتایج به‌دست آمده، این روند تا دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده شده و هم جذب آب و هم مقدار لیکوپن آزاد شده در محیط، با افزایش دما از ۲۴ درجه سانتی‌گراد به ۶۲ درجه سانتی‌گراد، به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). اما همانطور که از نتایج به‌دست آمده مشخص است، با افزایش دمای آب از ۶۲ درجه سانتی‌گراد به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، زمان جذب آب پودرها بیشتر شده و مقدار لیکوپن آزاد شده در ۵ دقیقه اول رهائش، کاهش یافت. این روند برخلاف انتظارات پیش‌بینی شده و اثر افزایش دما بر سرعت انتقال جرم بود و دلیل آن را باید در ماهیت مواد دیواره و همچنین اثرات تخریبی دماهای بالا بر بافت مواد جستجو کرد. در واقع از آنجا که بخشی از مواد دیواره مورد استفاده برای ریزپوشانی لیکوپن، کنسانتره پروتئین آب پنیر بود، باید اثر دما بر پروتئین‌ها و به‌خصوص پروتئین‌های آب پنیر را بررسی کرد.

پروتئین آب پنیر متشکل از پروتئین‌های متنوعی است که بیشترین مقدار آن را بتالاکتوگلوبولین، آلفا لاکتوبومین هستند. این دو پروتئین و به‌خصوص بتالاکتوگلوبولین، پروتئین‌هایی حساس به حرارت می‌باشند و دنا توره شدن آن‌ها از محدوده دمایی ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شده و در دماهای بالای ۸۰ درجه سانتی-گراد به‌طور کامل دنا توره می‌شوند و به‌دلیل تشکیل پیوندهای بین مولکولی بین زنجیره‌های دنا توره شده پروتئین، مولکول‌هایی با اندازه بزرگ‌تر و سنگین‌تر تشکیل می‌شوند که تمایل به جذب آب کم‌تری داشته و از لحاظ ظاهری با تشکیل محلول‌هایی با کدورت بالا مشخص می‌شوند [۱۵ و ۳۷].

دنا توره شدن خود می‌تواند موجب کاهش حلالیت پروتئین‌ها شده و در نتیجه زمان حل شدن دیواره‌ها در محیط آبی و رهائش لیکوپن افزایش می‌یابد [۳۸]. بدین ترتیب در دماهای بالایی مانند ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، مواد دیواره پروتئینی با برخورد ناگهانی با

آب داغ، سریعاً دچار انعقاد شده و به یکدیگر می‌چسبند و نسبت به دماهای پایین‌تر، دیرتر حل شده و رهائش به تعویق می‌افتد.

تاثیر دمای بالای آب بر ساختار مواد در حین جذب آب صرفاً محدود به موادی با دیواره پروتئینی نمی‌باشد و محققین چنین روندی را در میوه‌ها و سبزیجات خشک شده در حین جذب آب نیز مشاهده کرده‌اند. از جمله تنده آکیتوننده (۲۰۰۸)، در بررسی روند جذب آب فلفل دلمه‌ای در دماهای مختلف به این نتیجه رسید که دماهای بالاتر از ۹۰ درجه سانتی‌گراد، تاثیری منفی بر سرعت و میزان جذب آب نمونه‌های خشک شده دارد. وی دلیل این امر را تخریب و چروکیدگی شدن سلول‌های ماده در برخورد با آب داغ و همچنین بر هم خوردن توازن بین خصوصیات الاستیکی در بافت سلول‌ها و افزایش شدت انتقال جرم از میان خلل و فرج بافتی اعلام کرد. در واقع بر اساس نتایج وی، گرچه نمونه در حین قرار گرفتن در دماهای آب بالاتر، بنا به قانون فیک، تمایل به جذب آب سریع‌تری دارد، اما مستلزم این امر، سالم بودن بافت و عدم تخریب سلول‌هایی است که باید این آب را جذب کرده و نگه دارند. لذا در صورتی که مقدار تخریب بافتی بیشتر از مقدار نفوذ آب به داخل بافت باشد، در مجموع توانایی ماده برای جذب و نگهداری آب کاهش می‌یابد [۳۲].

بدین ترتیب همان‌طور که از نتایج این پژوهش نیز مشخص شد، دماهای بالا تاثیری تاخیری در جذب آب و رهائش لیکوپن داشتند. باید توجه داشت در بحث رهائش مواد هسته، این پدیده ممکن است مثبت باشد زیرا لیکوپن ماده‌ای حساس به حرارت بوده و هرچه دیرتر از کپسول‌ها خارج شده و کم‌تر در معرض حرارت و اکسیژن قرار بگیرد، مقدار بیشتری از آن حفظ شده و ارزش غذایی محصولی که به آن اضافه شده، افزایش می‌یابد.

۲-۴-۳- اثر pH محیط بر رهائش

نتایج به‌دست آمده نشان دادند که پس از دمای آب، مقدار pH بیشترین تاثیر را مقدار جذب آب و لیکوپن رها شده در محیط داشت. و بیشترین رهائش و کوتاه‌ترین زمان جذب آب در نمونه‌هایی مشاهده شد که در محیط قلیایی قرار گرفته بودند. برای توجیه دلیل این امر باید بیشتر به تاثیر تغییرات pH بر کنسانتره پروتئین آب پنیر توجه نمود.

تاثیر pH بر پروتئین‌ها، به‌دلیل اثرگذاری بار کلی محیط بر ویژگی‌های فیزیکی و عملکردی مواد پروتئینی، بسیار حائز

واحد سازنده بتالاکتوگلوبولین با نه رشته بتا^{۲۰} (A-I) احاطه شده است. در قسمت هسته آن، یک غلاف بتا^{۲۱} قرار دارد که از هشت رشته غیرموازی بتا (A-H) که به سمت مرکز تا خورده‌اند، تشکیل شده و دو صفحه بتا از جلو و عقب آن‌ها را در بر می‌گیرد.

صفحه بتای E تا H، به‌کمک یک ساختار مارپیچ آلفای سه پیچشی (اسیدهای آمینه ۱۳۰-۱۴۰)، در قسمت خارجی سطح واحد سازنده بتالاکتوگلوبولین مستقر شده است و به همراه آن، نهمین رشته بتا، (I)، قرار دارد که موجب کشیدگی بیشتر صفحه بتا می‌گردد.

همچنین پنج حلقه کوتاه به نام‌های BC، CD، DE، EF و FG وجود دارند که خمش‌های بتای^{۲۲} انتهایی رشته‌ها را تشکیل می‌دهند. چهار حلقه بلند به نام‌های AB (اسیدهای آمینه ۲۴-۲۷)، GH (اسیدهای آمینه ۱۰۹-۱۱۷) و پایانه‌های N و C نیز در ساختار مشاهده می‌شوند که همگی از قطعات مارپیچی کوتاه تشکیل شده‌اند. از اتصال دو مونومر از طریق یک صفحه بتای دو رشته‌ای که شامل یک رشته I نیز می‌باشد، دی‌مر بتالاکتوگلوبولین تشکیل می‌شود.

اتفاقی که در انتقال ترانفورد رخ می‌دهد، تغییر جهت مونومرهای تشکیل دهنده دی‌مر می‌باشد. در واقع با افزایش pH، یک چرخش پنج درجه‌ای در جهت‌گیری فضایی مونومرها رخ می‌دهد که موجب شکستن تعدادی از پیوندهای هیدروژنی بین دو واحد سازنده می‌گردد [۴۶].

همچنین در pHهای پایین، حلقه EF مانند سرپوشی عمل می‌کند که دسترسی به هسته داخل پروتئین را تقریباً غیرممکن می‌کند. اما در pHهای حدود ۶/۵، این حلقه مانند دربی عمل می‌کند که موجب دسترسی بیشتر به قسمت داخلی مونومر می‌گردد و در pHهای بالا، این حلقه کاملاً کنار رفته و دسترسی سوبسترا به محیط داخلی را کاملاً امکان‌پذیر می‌کند. اگر این سوبسترا آب باشد، جذب آب افزایش یافته و حلالیت بیشتر می‌شود. همچنین

اهمیت بوده است. در این بین نوع و ساختار پروتئین نیز تأثیر به‌سزایی در واکنش‌پذیری آن نسبت به شرایط گوناگون pH محیط دارد. در این بین بر اساس تحقیقات انجام شده، پروتئین بتالاکتوگلوبولین، به‌عنوان عمده‌ترین پروتئین موجود در کنسانتره پروتئین آب پنیر، شرایطی بسیار خاص و ویژه نسبت به pH دارد و محققین آن را پروتئینی پایدار در برابر شرایط اسیدی اعلام کرده‌اند و به همین دلیل ماده‌ای مناسب برای ریزپوشانی ترکیباتی که هدف، رهایش آن‌ها در محیط روده است و کپسول‌ها باید بدون تغییر محیط اسیدی معده را ترک کنند می‌باشد [۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲ و ۴۳].

این محققین دلیل این تفاوت را پدیده‌ای به نام انتقال تانفورد^{۱۸} بیان کردند که در سال ۱۹۵۹ توسط تانفورد و همکاران [۴۴] در مورد تغییرات ویژه ساختاری بتالاکتوگلوبولین ارائه شد. برای ملموس شدن این پدیده، لازم است به اختصار آشنایی با ساختار بتالاکتوگلوبولین داشته باشیم.

بتالاکتوگلوبولین پروتئینی دارای ساختار دوم و سوم پروتئینی است و ساختمان آن، متشکل از مارپیچ آلفا (۱۰-۱۵٪)، صفحه بتا (۴۳٪) و مارپیچ تصادفی (۴۷٪) می‌باشد [۴۵]. این پروتئین در pHهای خنثی به صورت دی‌مر و در pHهای زیر ۳، به صورت مونومر دیده می‌شود. هر مونومر وزن مولکولی معادل ۱۸۳۵۰ دالتون داشته و از ۱۶۲ اسید آمینه و یک سیستمین آزاد و دو پل دی سولفیدی تشکیل شده است. ساختار واحد سازنده^{۱۹} بتالاکتوگلوبولین در شکل ۴-۴۹ مشخص شده است [۴۶].

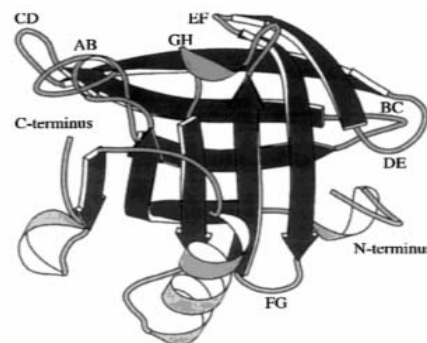


Fig 5 schematic figure of structural units of β -lactoglobulin

20. β -Strain
21. β -Barrel
22. β -Turns

18. Tanford Transition
19. Subunit

می‌تواند محیط معده را تحمل کند و برای ریزپوشانی موادی که هدف، آزاد شدن آن‌ها در روده‌ها می‌باشد، مناسب است [۳۹]. همچنین لان زیائو و گوناسکاران (۲۰۰۳) در بررسی هیدروژل‌های تولید شده از کنسانتره پروتئین آب پنیر مورد استفاده برای پوشش‌دهی کافئین اعلام کردند که در pHهای بسیار پایین (حدود ۱/۸)، به دلیل بار مثبت بسیار بالا و نیروهای دافعه الکترواستاتیکی شدید، پدیده تا خوردگی مجدد رخ داده و جذب آب هیدروژل‌ها کاهش یافته و در نتیجه سرعت رهایش کافئین کاهش یافت [۴۰].

با توجه به آنچه گفته شد، انتظار می‌رفت که نمونه‌های ریزپوشانی شده در کنسانتره پروتئین آب پنیر، به دلیل داشتن مقدار زیادی بتالاکتوگلوبولین در ساختار خود، ویژگی‌های منحصر به فردی به pH داشته و در محیط قلیایی و خنثی بهتر از محیط اسیدی رهایش داشته باشند که نتایج به دست آمده نیز این امر را تایید کردند.

۳-۴-۳ اثر درصد نمک کلرید سدیم بر رهایش

مقدار نمک موجود در محیط، یکی دیگر از عواملی است که می‌تواند مقدار حلالیت پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار داده و آن را افزایش یا کاهش دهد. همان‌طور که در نتایج این پژوهش مشخص شد، نمونه‌ها در مقدار نمک کم‌تر، سریع‌تر جذب آب کرده و مقدار بیشتری از لیکوپن را آزاد کردند. دلایلی که محققین در زمینه تاثیرگذاری مقدار نمک موجود در محیط بر میزان جذب آب و انحلال‌پذیری پروتئین‌ها و از جمله کنسانتره پروتئین آب پنیر بیان کرده‌اند، اصولاً بر دو محور پدیده جذب نمک^{۲۴} و دفع نمک^{۲۵} بنا شده است. بر اساس پدیده جذب و دفع نمک، مقدار نمک می‌تواند شرایط متفاوتی را از لحاظ انحلال‌پذیری در پروتئین‌ها به وجود آورد.

وقتی مقدار نمک در محیط کم باشد، واکنش یون‌های نمک با گروه‌های یونی پروتئین و قرار گرفتن آن‌ها در میان زنجیره‌های پروتئینی، موجب کاهش پیوندهای الکترواستاتیک پروتئین-

تغییراتی در مکان قرارگیری اسید آمینه گلوتامین ۸۹ و خارج شدن آن از حالتی دور از دسترس در pHهای پایین به حالتی در دسترس قرار گرفته در pHهای بالا نیز در ایجاد شرایط ویژه حلالیت بتالاکتوگلوبولین در بازه‌های مختلف pH تاثیر گذار است [۴۱، ۴۳ و ۴۶].

در زمینه تاثیر شرایط اسیدی و بازی بر ساختار پروتئین‌های محلول تشکیل دهنده کنسانتره پروتئین آب پنیر تحقیقات زیادی شده است، از جمله فوجدینگ و همکاران (۲۰۰۲)، بیان کردند که در pHهای بالا، به دلیل افزایش نیروهای دافعه الکترواستاتیکی و واکنش‌پذیری گروه تیول، ساختار مولکول‌های پروتئین دچار بازشدگی^{۲۳} بیشتری می‌شود [۴۷].

همچنین در پژوهشی که توسط داموداران و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، مشخص شد که در pHهای بالا، نیروهای دافعه الکترواستاتیکی درون مولکولی پروتئین آب پنیر موجب از هم باز شدن ساختار آن‌ها و تمایل بیشتر به واکنش با مولکول‌های آب و جذب آب و تورم به‌خصوص در pHهای به شدت قلیایی می‌شود [۴۸].

دی لافونته و همکاران (۲۰۰۲) با پژوهشی که در مورد تغییرات ساختاری بتالاکتوگلوبولین داشتند، اعلام کردند که در pHهای ۷ تا ۸/۵، این پروتئین دچار تغییرات ساختاری اساسی شده و فعالیت گروه‌های تیول در آن افزایش می‌یابد و متعاقباً تمایل به جذب آب بیشتر می‌شود [۴۹].

در بررسی که توسط دیسانایاکه (۲۰۱۱) در مورد ژل‌های تشکیل شده از پروتئین آب پنیر انجام شد، آن‌ها به این نتیجه رسیدند که ژل‌های تشکیل شده در pHهای بسیار پایین، ساختاری ضعیف و شکننده داشتند و دلیل آن را بارهای مثبت و ممانعت از فعالیت گروه‌های تیول اعلام کردند [۵۰].

گوناسکاران و همکاران (۲۰۰۶) نیز در بررسی پروتئین بتالاکتوگلوبولین به عنوان ماده دیواره برای ریزپوشانی اعلام کردند که این پروتئین در pHهای اسیدی بسیار با ثبات بوده و به راحتی

24. Salting In
25. Salting Out

23. Unfolding

استفاده کردند. پس از تولید نانوکپسول‌ها، به منظور بررسی رهایش مواد هسته، مقدار فعالیت آبی محیط را به‌عنوان یکی از متغیرها قرار دادند و نتایج به دست آمده حاکی از آن بود که در فعالیت‌های آبی پایین‌تر که ناشی از افزودن بیشتر نمک در محیط بود، مقدار حلالیت مواد دیواره کاهش یافته و رهایش اسید لینولئیک در محیط کمتر شد [۵۲]. همچنین در پژوهشی که حسین و همکاران در سال ۲۰۱۱a در زمینه تاثیر افزایش نمک کلرید سدیم به ایزوله پروتئین آب پنیر انجام دادند، نتایج حاکی از آن بود که با افزایش مقدار نمک از صفر به ۱۲ درصد، زمان خیس خوردن^{۲۶} نمونه‌ها افزایش یافت و حداکثر زمان جذب آب پودرها در مقادیر ۲/۲۵ و ۱۲ درصد نمک مشاهده شد [۵۳].

بدین ترتیب، با توجه به آنچه گفته شد، با افزایش مقدار نمک در محیط، زمان جذب آب نمونه‌های ریزپوشانی شده در کنسانتره پروتئین افزایش یافت و این نتایج با نتایج ارائه شده توسط محققین دیگری مانند کیوسی و همکاران (۲۰۱۲)، حسین و همکاران (۲۰۱۲، ۲۰۱۱a و ۲۰۱۱b) و دیسانایاکه (۲۰۱۱) هم‌خوانی داشت [۵۰، ۵۲، ۵۳، ۵۴ و ۵۵].

۵-۳- نقاط بهینه برای جذب آب میکروکپسول‌ها

با توجه به آنچه پیش‌تر در مورد نحوه به‌دست آوردن نقاط بهینه گفته شد، ابتدا نمودارهای کانتور برای مقدار لیکوپن آزاد شده و زمان جذب آب به‌عنوان توابعی از دمای آب و pH محیط، در یک غلظت مشخص از نمک (۱/۵٪ وزنی/وزنی) به‌دست آمدند که در شکل ۶ نشان داده شده‌اند. در این نمودارها، هر نقطه مشخص شده به‌عنوان نقطه بهینه، نشان دهنده نقطه‌ای است که در آن در دمای مشخصی از آب و مقدار تعیین شده‌ای از pH، می‌توان به حداکثر زمان جذب آب و حداقل رهایش لیکوپن در محیط دست یافت. علت تنظیم شرایط بدین حالت این است که رهایش در حداقل مقدار باشد چون در گام بعدی، لیکوپن‌های ریزپوشانی شده به سوپ اضافه شدند و از آنجا که پخت سوپ آماده حداقل ۱۵-۲۰ دقیقه طول می‌کشد، رهایش لیکوپن در

پروتئین و جلوگیری از برقرای پیوند میان آن‌ها می‌شود و در نتیجه از انقباض مولکول جلوگیری می‌شود. در این حالت سطح پروتئین افزایش یافته و پیوندهای آب-پروتئین بیشتر می‌شوند و حلالیت پروتئین نیز متعاقباً فزونی پیدا می‌کند. اما در غلظت‌های بالاتر نمک، در نهایت همه گروه‌های باردار توسط یون‌های نمک پوشانده می‌شوند و دیگر نقشی در آب‌گیری پروتئین بازی نمی‌کنند و برعکس یون‌های نمک، آب در دسترس پروتئین‌ها را خارج کرده و موجب کاهش حلالیت آن‌ها می‌شوند. در واقع، افزایش مقدار نمک و یون‌ها در محیط حلال، موجب تاثیری معکوس بر حلالیت پروتئین‌ها شده و می‌تواند حتی موجب ترسیب آن‌ها گردد. ارتباط مقدار و نوع نمک با قدرت یونی حلال در رابطه ۶ آورده شده است.

$$\sum I = \frac{1}{2} \quad C_i Z_i^2 \quad (6)$$

I: قدرت یونی

C_i: غلظت هر یک از یون‌ها در محیط

Z_i: بار یون‌ها

با توجه به این رابطه، مشخص است که افزایش غلظت یون‌ها در محیط از طریق بالا بردن مقدار نمک و همچنین بیشتر بودن بار یون‌ها مانند یون‌های دوظرفیتی در برابر یک ظرفیتی، موجب افزایش قدرت یونی می‌شود. همچنین با توجه به رابطه ۷، بیشتر شدن قدرت یونی، تاثیری منفی بر مقدار حلالیت دارد و بدین معنی است که استفاده از مقادیر بیشتر نمک و یا نمک‌هایی با ظرفیت بیشتر، حلالیت پروتئین‌ها را به مقدار بیشتری کاهش می‌دهد [۵۱].

$$\log S = B - K I \quad (7)$$

S: مقدار حلالیت پذیری

B: عدد ثابت (تابعی از نوع پروتئین، دما و...)

K: ثابت ویژه نمک

I: قدرت یونی

در این زمینه پژوهش‌هایی نیز صورت گرفته و به‌طور مثال کوآسی و همکاران در سال ۲۰۱۲، برای ریزپوشانی اسید لینولئیک، از بیوپلیمرهای پروتئین آب پنیر و کاپا کاراگینان

منتخب در نظر گرفته شدند. این مقادیر در نقطه بهینه‌ای با میزان نمک ۱/۵٪ به دست آمدند. مقایسه نقطه بهینه پیش بینی شده توسط نرم افزار و نمونه تولید شده بصورت تجربی در این نقطه، در جدول ۴ آورده شده اند.

Table 4 Comparison between responses of produced optimized sample with predicted responses

Responses Sample	Rehydration time (min)	Released lycopene
Predicted Sample	24.797 ^a	0.067 ^b
Produced Sample	25.2 ^a	0.066 ^b

Similar English letters in each column means non-significant difference at 5% level

۴- نتیجه گیری

لیکوپن رنگدانه کاروتنوئیدی و ویژگی‌های مناسب برای سلامتی مصرف کنندگان است اما به دلیل حساسیت در برابر شرایط محیطی، کاربرد آن در صنعت محدود شده است. در این تحقیق به منظور جلوگیری از تخریب آن و همچنین ایجاد شرایط رهایش کنترل شده، از ریزپوشانی تسط کنسانتره پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین استفاده شد و رهایش در آب بوسیله روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. نتایج نشان دادند که با افزایش دمای آب تا ۶۲ درجه سانتی‌گراد، سرعت جذب آب میکروکپسول‌ها و رهایش لیکوپن در محیط افزایش می‌یافت اما در دماهای بالاتر و به‌خصوص نزدیک به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت کاهش یافت که دلیل احتمالی آن، تخریب ساختاری بیوپلیمرها بیان شد. همچنین با افزایش pH از حالت اسیدی به سمت قلیایی، مقدار رهایش افزایش یافت که توجه آن تغییرات ساختاری ویژه‌ای است که در بتالاکتوگلوبولین، به‌عنوان مهم‌ترین پروتئین موجود در کنسانتره پروتئین آب پنیر رخ می‌دهد. در این زمینه، بر اساس تئوری به نام تئوری انتقال تانفورد، با افزایش pH محیط، به دلیل خمش‌ها و چرخش‌های ویژه‌ای که در ساختار این پروتئین رخ می‌دهد، قسمت‌هایی که مانند یک درب، از ورود آب به محیط داخلی جلوگیری می‌کردند، کم کم به کنار رفته و واکنش‌هایی بین محیط بیرونی و پروتئین رخ می‌دهد که نهایتاً منجر به افزایش حلالیت و رها شدن مواد هسته می‌گردد. در مورد مقدار نمک نیز، با افزایش مقدار کلرید سدیم در محیط، روندی کاهشی در مقدار جذب آب و رهایش لیکوپن مشاهده شد که دلیل آن پدیده دفع

زمان‌های انتهایی پخت، می‌توانست موجب حداقل آسیب‌رسانی به لیکوپن گردد.

با توجه به آنچه گفته شد، نقطه‌ای که در آن دمای آب، ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و pH، معادل ۳ بود، به‌عنوان شرایط مطلوب و

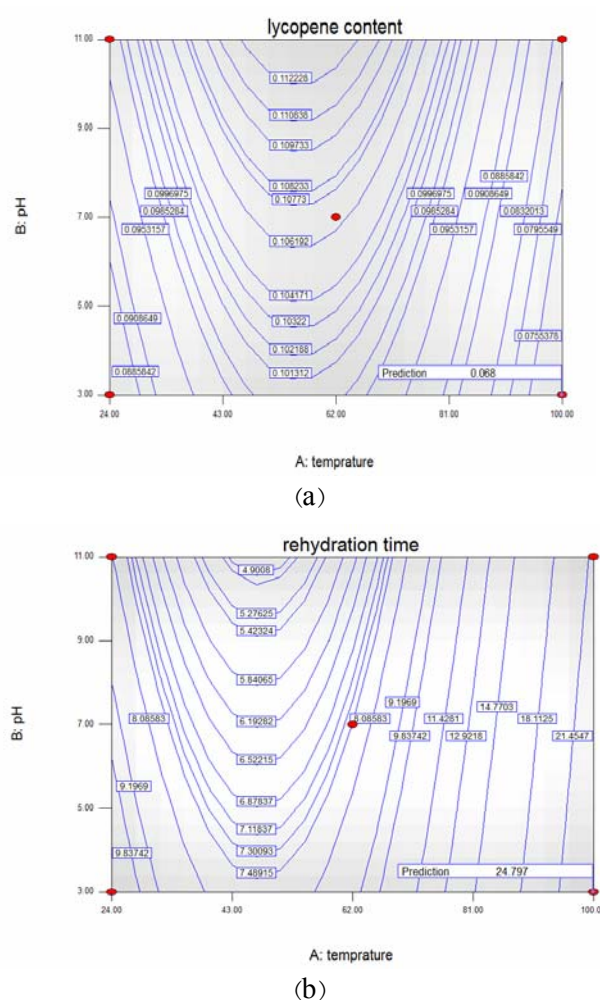


Fig 6 counter diagrams for released lycopene (a) and rehydration time (b) as functions of interaction effect of water temperature and pH in order to find optimum values at constant amount of sodium chloride (1.5 w/w %)

- ingredients. *Food Research International*, 40: 1107-112.
- [8] Sun, C., Gunasekaran, S. and Richards, M. P. 2007. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 21: 555-564.
- [9] Limpisophon, K., Tanaka, M., Weng, Y., Abe, S. and Osako, K. 2009. Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids*, 23(7): 1993-2000.
- [10] Rubio, A. L. and Lagaron, J. M. 2011. Improved incorporation and stabilization of β -carotene in hydrocolloids using glycerol. *Food Chemistry*, 125: 997-1004.
- [11] Li, X. Y., Hui-ming, Z., Xing-hong, L., bao-shan, H. and Xiao-Xian, H. 2010. Study on the morphology, particle size and thermal properties of vitamin A microencapsulated by starch octenylsuccinate. *Journal of Agricultural Science in China*, 9: 1058-1064.
- [12] Sefert, Y., Drusch, S. and Schwarz, K. 2009. Chemical stabilization of oil rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenization, microencapsulation and storage. *Food Chemistry*, 113: 1106-1112.
- [13] Fernandez, A., Giner, S. T., Lagaron, J. M. 2009. Novel route to stabilization of bioactive antioxidants by encapsulation in electrospun fibers of zein prolamine. *Food Hydrocolloids*, 23: 1427-1432.
- [14] Velasco, J., Marmesat, S., Dobarganes, C. and Marquez-Ruiz, G. 2006. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 1722-1729.
- [15] Jovanovic, S., Barac, M. and Macej, O. 2005. Whey Proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*. 55(3): 215-233.
- [16] Caessens, P. W. J. R., Visser, S., and Gruppen, H. 1997. Method for the isolation of bovine β -lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product. *International Dairy Journal*, 7(4): 229-235.
- [17] Demetriades, K., Coupland, J. N. and McClements, D. J. 1997. Physicochemical properties of whey protein-stabilized emulsions as affected by heating and ionic نمک و تاثیر دوگانه مقدار نمک‌ها و یون‌های موجود در محیط بر افزایش یا کاهش حلالیت ترکیبات پروتئینی بیان شد.
- با توجه به آنچه در مورد شرایط حلالیت میکروکپسول‌ها و رهایش لیکوپن گفته شد، در صورتی که هدف افزایش زمان رهایش باشد، بهتر است از دماهای بالای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، نمک بیشتر از ۰/۵ درصد و pH اسیدی استفاده شود و در صورتی که هدف تسریع رهایش باشد، برعکس باید از دماهای پایین‌تر از ۶۲ درجه سانتی‌گراد و نمک بیشتر در محیط‌هایی با pH غیر اسیدی استفاده کرد.
- ### ۵- منابع
- [1] Blanch, G.P., Castillo, M.L. R., Caja, M. M., Me'ndez, M. P., and Corte's, S. S., 2007. Stabilization of all Trans lycopene from tomato by encapsulation using cyclodextrins. *Food Chemistry*, Vol. 105, pp. 1335-1341.
- [2] Shu, B., Yu, W., Zhao, Y., and Liu, X., 2006. Study on microencapsulation of lycopene by spray drying. *Food Engineering*, Vol. 76, pp. 664-669.
- [3] Jafari, S. M., Assadpoor, E., B. and He, Y. 2008a. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41: 172-183.
- [4] Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N. Matsuda, K., Kometani, T. and Matsumura, Y. 2003. Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of food science*, 68(7): 2248-2255.
- [5] Klaypradit, W. and Huang, Y. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *Food Science and Technology*, 41: 1133-1139.
- [6] Lim, H. K., Tan, C. P., Bakar, J. and Ng, S. P. 2011. Effects of Different Wall Materials on the Physicochemical Properties and Oxidative Stability of Spray-Dried Microencapsulated Red-Fleshed Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) Seed Oil. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 1220-1227.
- [7] Gharsallaoui, A. Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food

- [28] Gharibzahedi, S. M. T., Mousavi, S. M., Hamed, M., Ghasemlou, M. 2012. Response surface modeling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut oil in-water beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 26: 293-301.
- [29] Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L. and Zhao, J. 2008. Optimization of conditions for the preparation of b-carotene Nano emulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107: 1300-1306.
- [30] Salimi, H. A., Maghsoudlou, Y. and Jafari, S. M. 2010. Application of Peleg model to study effect of water temperature and storage time on rehydration kinetics of air dried potato cubes. *Latin American Applied Research*, 40: 131-136.
- [31] Salimi, H. A., Maghsoudlou, Y. and Jafari, S. M. 2011. Effect of water temperature, variety and shelf life on rehydration kinetics of microwave dried potato cubes. *Latin American Applied Research*, 41: 249-254.
- [32] Tunde Akintunde, T. Y. 2008. Effect of soaking water temperature and time on some rehydration characteristics and nutrient loss in dried bell pepper. *Agricultural Engineering International: the CIGR journal*, 10: 8-13.
- [33] Resio, A.C., Aguerre, R. J. and Suarez, C. 2006. Hydration kinetics of amaranth grain, *Journal of Food Engineering*, 72: 247-253.
- [34] Planinic, D., Velic, S. T., Bilic, M. and Bucic, A. 2005. Modelling of drying and rehydration of carrots using Peleg's model. *Journal of European Food Research and Technology*, 221: 446-451.
- [35] Krokida, M. K. and Marinos-Kouris, D. 2003. Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 57: 1-7.
- [36] Islam, M. S., Haque, M. A. and Islam, M. N. 2012. Effects of drying parameters on dehydration of green banana (*Musa sapientum*) and its use in potato (*Solanum tuberosum*) chips formulation. *A Scientific Journal of Krishi Foundation*, 10(1):87-97.
- [37] Ruttarattanamongkol, K. 2012. Functionalization of whey proteins by reactive supercritical fluid extrusion: a review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 34(4): 395-402.
- strength. *Journal of Food Science*, 62: 342-347.
- [18] Lee, K. Y., Park, W. H. and Ha, W. S. 1996. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, 63: 425-432.
- [19] Chiu, Y. T., Chiu, C. P., Chien, J. T., Ho, G. H., Yang, J. and Chen, B. H. 2007. Encapsulation of lycopene extract from tomato pulp waste with gelatin and poly (γ -glutamic acid) as carrier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5123-5130.
- [20] Box, G., Hunter, J. S. 1957. Multifactor experimental designs for exploring response surfaces. *Analysis of Mathematics and Statistics*, 28: 195-241.
- [21] Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri, T. 2010. Application of Central Composite Design Based Response Surface Methodology in Parameter Optimization and on Cellulase Production Using Agricultural Waste. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 3(2): 97-104.
- [22] Khuri, A. I. and Mukhopadhyay, S. 2010. Response surface methodology. advanced review. *WIREs Computational Statistics*, 2: 128-149.
- [23] Chen, L. and Subirade, M. 2006. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27: 4646-4654.
- [24] Rocha, G. A., Trindade, C. S. F. and Grosso, C. R. F. 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bio products processing*, 90: 37-42.
- [25] Nunes, I. L. and Mercadante, A. Z. 2007. Encapsulation of Lycopene Using Spray-Drying and Molecular Inclusion Processes. *International Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(5): 893-900.
- [26] Lin, C. H. and Chen, B. H. 2003. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 1012:103-109.
- 27- Goula, A. M. and Adamopoulos, K. G. 2012. A New Technique for Spray-Dried Encapsulation of Lycopene. *Drying Technology*, 30(6): 641-652.

- [48- Damodaran, S., Parkin, K. L. and Fennema, O. R. 2008. *Fennema's Food Chemistry*. 4th ed., CRC Press, Taylor and Francis Gp, Boca Raton, FL, p.1144.
- [49] De laFuente, M. A., Singh, H. and Hemar, Y. 2002. Recent advances in the characterization of heat induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Food Science and Technology*, 13: 262- 274.
- [50] Dissanayake, M. 2011. Modulation of functional properties of whey proteins by microparticulation. Submitted in fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy. School of Biomedical and Health Sciences, Faculty of Health, Engineering and Science Victoria University, p. 285.
- [51] Inyang, U. E. and Iduh, A. O. 1996. Influence of pH and salt concentration on protein solubility, emulsifying and foaming properties of sesame protein concentrate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12): 1663-1667.
- [52] Kouassi, G. k., Teriveedhi, V. K., Milby, C. L., Ahmad, T., Boley, M. S., Gowda, N. M. and Terry, R. J. 2012. Nano-Microencapsulation and Controlled Release of Linoleic Acid in Biopolymer Matrices: Effects of the Physical State, Water Activity, and Quercetin on Oxidative Stability. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 2: 1-10.
- [53] Hussain, R., Gaiani, C., Aberkane, L., Ghanbaja, J. and Scher, J. 2011a. Multiscale characterization of casein micelles under NaCl range conditions. *Food Biophysics*, 6(4): 503-511.
- [54] Hussain, R., Gaiani, C., Aberkane, L., Scher, J., 2011b. Characterization of high-milk protein powders upon rehydration under various salt concentrations. *Journal of Dairy Science* 94(1): 14-23.
- [55] Hussain, R., Gaiani, C. and Scher, J. 2012. From high milk protein powders to the rehydrated dispersions in variable ionic environments: A review. *Journal of Food Engineering*, 113: 486-503.
- [38] Pelegrine, D. H. G. and Gomes, M. T. M. S. 2008. Whey proteins solubility curves at several temperatures values. *Ciencia e Natura UFSM*, 30(1): 17-25.
- [39] Gunasekaran, S., Xiao, L. and Ould Eleya, M. M. 2006. Whey protein concentrate hydrogels a bioactive carrier, *Journal of Applied Polymer Sciences*, 99: 2470-2476.
- [40] Lan Xiao, M. M. and Gunasekaran, S. 2003. Rheology and Swelling behavior of Whey Protein-Based hydrogels. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich, Switzerland, February 9-13.
- [41] Taulier, N. and Chalikian, T. V. 2001. Characterization of pH-induced transitions of β -Lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, 314: 873-889.
- [42] Pearez, M. D. and Calvo, M. 1995. Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, 78: 978-988.
- [43] Blanch, E. W., Hetch, L. and Barron, L. D. 1999. New insight into the pH dependent conformational changes in bovine β -lactoglobulin from Raman optical activity. *Protein Science*, 8: 1362-1367.
- [44] Tanford, C., Bunville, L. G. and Nozaki, Y. 1959. The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemists Society*, 81:4032-4036.
- [45] Boye, J. I., Ismail, A. A. and Alli, I. 1996. Effects of physicochemical factors on the secondary structure of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Research*, 63(1): 97-109.
- [46] Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T. and Sawyer, L. 1997. Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5: 481-495.
- [47] Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D. and McGuffey, M. K. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Food Science and Technology*, 13: 151-159.

Optimization of release process of lycopene microcapsules made by whey protein and maltodextrin using Response Surface Methodology

Salimi, A. ^{1*}, Maghsoudlou, Y. ², Jafari, S. M. ³, Sadegh Mahounak, A. R. ⁴,
Kashani nejad, M. ⁵, Ziaiiifar, A. M. ⁶

1. Assistant professor of food science and technology, veterinary department, Semnan university, Semnan, Iran
2. Professor of food science and technology, food industry department, Agricultural sciences and natural resources university of Gorgan, Gorgan, Iran
3. Associate professor of food science and technology, food industry department, Agricultural sciences and natural resources university of Gorgan, Gorgan, Iran
4. Associate professor of food science and technology, food industry department, Agricultural sciences and natural resources university of Gorgan, Gorgan, Iran
5. Professor of food science and technology, food industry department, Agricultural sciences and natural resources university of Gorgan, Gorgan, Iran
6. Associate professor of food science and technology, food industry department, Agricultural sciences and natural resources university of Gorgan, Gorgan, Iran

(Received: 2016/10/04 Accepted:2017/10/22)

Lycopene is a useful carotenoid pigment for human health but is very sensitive to environmental conditions. A useful method to control lycopene degradation is microencapsulation by biopolymers. This technology can control release progress of active materials and protect them in different conditions by covering and releasing them in proper place and time. In this investigation, whey protein concentrate (WPC) and maltodextrin were used to encapsulate lycopene. In order to do that, an emulsion of oily lycopene 5% with whey protein concentrate and maltodextrin was prepared. Percentage of solid materials and lycopene were 37.04% and 18.66% respectively and homogenizer speed was set on 18000 rpm. Then emulsion was dried in a spray dryer with inlet air temperature of 150 °C and air pressure of 2 bar at entrance of nuzzle funnel. In order to find the best conditions of releasing of capsules in water, response surface methodology and central composite design were used. Independent variables were pH (3, 7, and 11), water temperature (24, 62 and 100 °C) and percentage of sodium chloride (0.5, 1 and 1.5%). Results showed that alkaline pH resulted to higher rate of rehydration and release of core materials; also the highest rate of release was achieved at water temperature of 62 °C and salt concentration of 0.5%, but higher and lower temperatures and higher levels of salt resulted to a significant decrease of rehydration and rate of core release.

Key words: Lycopene, Optimization, Release, Microcapsule, Response surface methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: a.salimi@semnan.ac.ir