

تخمین و ارزیابی ضریب نفوذ میکروکپسول‌های آلزینات-پروتئین آب پنیر حامل دی‌استیل و ارزیابی آن در شرایط مختلف دهانی

محسن زندی^۱ - محبت محبی^{۲*} - مهدی وریدی^۳ - نوید رضانیان^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۷

چکیده

در این پژوهش میکروکپسول جدیدی تحت عنوان میکروکپسول آلزینات-پروتئین آب پنیر حامل دی‌استیل تهیه و خصوصیات آن تعیین گردید. رهایش دی‌استیل در شرایط شبیه‌سازی شده دهانی در سطوح مختلف بزاق به میکروکپسول (۱:۴، ۱:۸ و ۱:۱۰) و نیروهای برشی متفاوت (۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه) مورد بررسی قرار گرفت و ضریب نفوذ با کمک معادله فیک تخمین زده شد. هدف اصلی این پژوهش توسعه مدلی به منظور پیش‌بینی فرآیند رهایش و نیز تخمین ضریب نفوذ از میکروکپسول جدید ابداعی بوده تا بتوان به کمک آن رهایش کنترل شده عطر و طعم در شرایط دهانی ایجاد نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که مدل حاصله می‌تواند با ضریب همبستگی بالای ۹۵ درصد رفتار رهایش را پیش‌بینی نموده و علاوه بر این مدل مذکور به خوبی قادر به تخمین میزان ضریب نفوذ می‌باشد. نتایج همچنین نشان داد که اعمال نیروی برشی بطور معناداری سبب افزایش ضریب نفوذ شده درحالی‌که تغییر میزان بزاق تاثیر معناداری بر آن ندارد.

واژه‌های کلیدی: ضریب نفوذ؛ قانون فیک؛ میکروکپسول آلزینات-پروتئین آب پنیر؛ دی‌استیل؛ رهایش کنترل شده

مقدمه

عطر و طعم از ویژگی مهم در ارزیابی کیفیت مواد غذایی بوده و عامل اصلی در مقبولیت مواد غذایی توسط مصرف کننده است (Bucking *et al.*, 2003). عوامل متعددی نظیر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی، غلظت و فعل و انفعالات بین ملکول‌های عطری و طعمی با ماده غذایی در تاثیر گذاری کلی این مواد بر پذیرش نهایی ماده غذایی موثر است. به همین منظور امروزه تلاش‌های متعددی برای بررسی انتقال جرم و نحوه حفظ و آزادسازی مواد طعمی و عطری متفاوت در محصولات مختلف صورت پذیرفته است؛ در این میان به منظور کاهش تخریب یا از دست دادن مواد عطری و طعمی در طی نگهداری و فرآوری و نیز کنترل آزادسازی آنها طی مصرف، انکپسولاسیون این مواد قبل از افزودن آنها به مواد غذایی یکی از

روش‌های مطلوب می‌باشد (Gunning *et al.*, 1999; Madene *et al.*, 2006). انکپسولاسیون فرآیند به دام انداختن ترکیبات فعال درون ماده حامل بوده که وسیله‌ای مناسب جهت بهبود تحویل اجزاء فعال محسوب می‌گردد (Nedovic *et al.*, 2011). انکپسولاسیون بطور بالقوه در زمینه‌های مختلفی نظیر مواد غذایی و نوشیدنی‌ها به خصوص رهایش عطر و طعم (Odonnell and McGinity, 1997; Gibbs *et al.*, 1999; Augustin *et al.*, 2001; Heinzen, 2002; Chen and Subirade, 2006)، تحویل دارو و مواد مغذی (Langer, 1998)، بیوتکنولوژی (Chang and Prakash, 2001)، کشاورزی و سایر علوم قابل استفاده است. روش‌ها و مواد متعددی برای تولید میکروکپسول‌های مختلف توسعه یافته است، که استفاده برخی از آنها به سبب سمیت در مواد غذایی محدود شده است (Odonnell and McGinity, 1997). رزینرگ و لی (Rosenberg and Lee, 2004)، چن و سابیراد (Chen and Subirade, 2006) و نیز زندی و همکاران (Zandi *et al.*, 2014) تکنیک جدیدی را بر پایه آلزینات-پروتئین آب پنیر به منظور ساخت میکروکپسول‌های غیرسمی ایجاد نموده که میکروکپسول‌ها مذکور بر مبنای تکنیک

۱- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: mohebbatm@gmail.com)

مشخص گردد. نتایج مدل‌های مختلف نشان داد که مکانیسم اصلی رهایش دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر نفوذ فیک می‌باشد. هدف اصلی از این تحقیق محاسبه ضریب نفوذ و بررسی تاثیر شرایط محیطی رهایش بر آن می‌باشد. به این منظور پس از تولید میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر حامل دی‌استیل، رهایش آن در شرایط دهانی مختلف شامل سطوح مختلف بزاق به میکروکپسول (۰:۱، ۱:۴ و ۱:۸) و نیروهای برشی متفاوت (۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق می‌تواند برای پیش‌بینی رهایش عطر و طعم از میکروکپسول‌ها مختلف و نیز تاثیر شرایط محیطی بر آنها مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر

عمل میکروکپسولاسیون با استفاده از روش بکار رفته در پژوهش زندی و همکاران (Zandi *et al*, 2014) تهیه گردید. در این روش ۲۰ میلی‌لیتر از محلول آلژینات-پروتئین آب پنیر با ۰/۰۱ گرم از دی‌استیل مخلوط شد و سپس مخلوط حاصل به آرامی به ۱۰۰ گرم روغن مایع آفتابگردان حاوی ۰/۵ گرم توئین ۸۰ که با استفاده از همزن مغناطیسی (۹۰۰ دور در دقیقه) در حال هم‌زدن بود، اضافه و سپس با اضافه کردن ۳۲ میلی‌لیتر از یک امولسیون حاوی یون کلسیم (تهیه شده از انحلال ۶۰ گرم روغن مایع کلزا، ۰/۵ گرم توئین ۸۰ و ۴۰ گرم کلورور کلسیم ۰/۱ مولار) میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر شکل گرفت. در نهایت میکروکپسول‌ها پس از جداسازی توسط قیف دکانتور و شستشو با محلول کلورور کلسیم ۰/۰۵ مولار و ۱ درصد توئین، با استفاده از فیلتر ۰/۶۵ میکرومتری و با کمک سیستم فیلتر خلاء شیشه‌ای میلی‌پور فیلتر شدند. میکروکپسول‌های حاصله وزن و به نسبت ۱ به ۹ در آب دیونیزه پراکنده گردید.

تعیین خصوصیات میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر

میکروسکوپ الکترونی روبشی

برای حصول اطمینان از تشکیل میکروکپسول‌های تولیدی و نیز تعیین ضخامت پوسته از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل LEO 1450VP) استفاده شد؛ در این میکروسکوپ، میکروکپسول در روی صفحه دستگاه به مدت یک شب در معرض هوا خشک شد، سپس پوشش دهی میکروکپسول‌ها توسط یک لایه نازک پلاتین (۴۰ میلی‌آمپر، ۶۰ ثانیه، 10^{-3} میلی بار و در محیط آرگون) انجام گرفت؛ در نهایت میکروکپسول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مشاهده گردید.

امولسیون‌سازی-ژلاتیناسیون داخلی تشکیل گردیدند. تحقیقات پیشین استفاده از پروتئین آب پنیر را به عنوان ماده انکپسوله کننده تأیید می‌نماید (Rosenberg and Young, 1993; Moreau and Rosenberg, 1999; 1993; Heelan and Corrigan, 1998; Sheu and Rosenberg, 1998; Satpathy and Rosenberg, 2003).

خوردن مرحله‌ای است که در آن مواد عطری و طعمی آزاد شده و توسط مصرف کننده حس می‌گردد (Taylor, 1996). دریافت عطر و طعم غذا در طی این فرآیند از طریق سرعت و میزان آزادسازی مواد عطری و طعمی اندازه‌گیری شده (van Ruth and Roozen, 2000) و به میزان زیادی به خصوصیات میکروکپسول (Naknean and Meenune, 2010)، ماهیت و غلظت عطر و طعم (Bakker *et al.*, 1996)، حالت فیزیکی غذا (Taylor, 1996) و نیز پارامترهای دهانی نظیر دمای دهان، ترکیب و میزان بزاق، نیروهای برشی و pH (van Ruth and Roozen, 2000) وابسته است. امروزه محققان رهایش کنترل شده را اصطلاح سرعت رهایش مواد فعال تعریف کرده که فرآیندی است که به وسیله آن جزء فعال (عطر و طعم) به دام افتاده درون شبکه‌ای برای دستیابی به اثرات مورد نظر با سرعت و یا به مقدار مشخص آزاد می‌شود. بر اساس طبقه بندی برنن-پپاس (Brannan-Peppas) مکانیسم‌های مختلفی برای رهایش وجود داشته که مهمترین آن رهایش کنترل شده از طریق انتشار است. در این نوع رهایش جزء فعال به طریقه انتشار از میان پلیمر یا خلل و فرج موجود در میکروکپسول آزاد می‌شود (Potakamory and Barbosa-Canovas, 1995). آشکارسازی رهایش عطر و طعم از شبکه پیچیده مواد غذایی کار دشواری است، در نتیجه اغلب به منظور توصیف مکانیسم آزادسازی ارتباط و واکنش متقابل بین ملکول‌های عطر و طعم و اجزاء غذایی در سیستم‌های مدل دوتایی و سه‌تایی مورد بررسی قرار می‌گیرد (Siefarth *et al.*, 2011).

دی‌استیل یا ۲،۳-بوتاندیون شاید شناخته شده‌ترین ترکیب مسئول در ایجاد عطر و طعم در کره می باشد (Jay, 1982)؛ این ترکیب با فرمول $C_4H_6O_2$ دارای نام‌های مختلفی شامل بی‌استیل، دی‌متیل دی‌کتون و ۲،۳ دی‌کتوبوتون بوده و به عنوان محصول جانبی در طی تولید وانیلین است (Pavia *et al*, 1999). دی‌استیل عمدتاً توسط برخی سویه‌ها و گونه‌های میکروبی نظیر استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و نیز میکروارگانیزم‌های دیگر تولید شده (Jay, 1982) و این ترکیب که از دسته کربونیل‌ها بوده دارای آستانه طعمی و عطری ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (Reineccius, 1994).

در مطالعه قبلی این گروه تحقیقی (Zandi *et al*, 2014) میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر حاوی دی‌استیل تهیه و رهایش آن مورد بررسی قرار داده شد تا مکانیسم اصلی رهایش

میکروسکوپ نوری

از میکروسکوپ نوری (مدل Olympus BX41) جهت مشاهده و تصویرگیری از میکروکپسول‌های حاصله استفاده و تصویرگیری با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ (مدل Olympus DP12 Digital Microscope Camera) انجام پذیرفت.

تعیین اندازه ذرات

به منظور تعیین اندازه میکروکپسول‌ها و نیز توزیع اندازه ذرات آنها، از دو روش مختلف استفاده گردید. اولین روش با کمک تصاویر حاصله از میکروسکوپ نوری و آنالیز این تصاویر با استفاده از نرم افزار Image J (نسخه ۱/۴۶۲) انجام پذیرفت. در روشی دیگر دستگاه تعیین اندازه ذرات (DLS، مدل Shimadzu-Sald 2101) به منظور سنجش توزیع اندازه ذرات میکروکپسول‌های حامل دی‌استیل مورد استفاده قرار گرفت. همچنین ضخامت پوسته نیز با کمک روش پردازش تصویر اندازه‌گیری شد.

مطالعه رهایش دی‌استیل

برای بررسی نحوه رهایش دی‌استیل انکپسوله شده از میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیتر تولیدی، رهایش این میکروکپسول‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده دهانی در حضور بزاق مصنوعی (در سه نسبت بزاق به میکروکپسول ۰، ۱، ۴ به ۱ به ۸)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در سه نیروی برشی ۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه صورت گرفت. نسبت بزاق مصرفی به میکروکپسول نیز براساس کار تحقیقی روث و کالمس تعیین گردید؛ بزاق مورد استفاده در این مدل با استفاده از روش روث و کالمس تهیه شد (Roth and Calmes, 1981). این بزاق مصنوعی حاوی بیکربنات سدیم ۲۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۱۵ میلی مولار، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم ۱۲/۲ میلی مولار، فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم ۲/۷۵ میلی مولار و آلفا آمیلاز ۲۰۰ واحد آنزیم در هر میلی لیتر بوده و pH نهایی آن ۷ است. از صفحه داغ مجهز به همزن مغناطیسی (مدل IKA Labortechnik- RH basis) برای اعمال دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و نیز نیروی برشی استفاده گردید. در هیترهای مجهز به همزن مغناطیسی سرعت همزدن تنها بر حسب دور در دقیقه قابل کنترل بوده و از اینرو باید ابتدا نیروی برشی مورد نظر با استفاده از فرمول ارائه شده توسط استف به سرعت همزدن بر حسب دور در دقیقه تبدیل گردید (Steffe, 1992):

$$\dot{\gamma} = 2N \left[\frac{D}{d} \right]^{\frac{2-n}{n}} \left(\frac{d}{h} \right)^{\frac{n}{2}} \quad (1)$$

که در آن N سرعت همزدن (معکوس ثانیه)، D قطر داخلی ظرف (متر)، d قطر مگنت، h ضخامت مگنت، n هم شاخص جریان بوده

که در میکروکپسول‌های پراکنده در آب برابر ۱ می‌باشد. بنابراین طبق این معادله نیروی برشی ۵۰ و ۱۰۰ دور در دقیقه به ترتیب تقریباً معادل سرعت همزنی ۶۵ و ۱۳۰ دور در دقیقه است. به منظور بررسی رهایش دی‌استیل، در فواصل زمانی معین با استفاده از سرنگ مقدار ۱ میلی‌لیتر از نمونه برداشته و از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد این مقدار نمونه با ۰/۰۵ میلی لیتر از شناساگر ارتو فینیل دی‌آمین (۱ درصد در اسید هیدروکلریدریک ۴ مولار) ترکیب و ۲۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد؛ پس از این زمان ۰/۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۴ مولار به محلول اضافه و به کوات سیلیکایی دستگاه اسپکتروفوتومتری (مدل WPA lightwave s2000 uv/vis) منتقل و میزان جذب آن در طول موج ۳۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Rodrigues and Barros, 1997).

راندانم آزادسازی دی‌استیل (EE) را با استفاده از مقدار کل دی-استیل اولیه‌ای که درون میکروکپسول بارگذاری شده (B) و حداکثر مقدار طعمی که در طی فرآیند رهایش آزاد شده است (A)، محاسبه نمود (Zandi et al, 2014):

$$EE = \frac{A}{B} \times 100 \quad (2)$$

مدلسازی رهایش

به منظور مدلسازی نحوه انتقال جرم در میکروکپسول‌های کلوییدوزومی تولیدی و برازش داده‌های رهایش دی‌استیل با استفاده از قانون فیک، معادله نفوذ به صورت نفوذ ناپایا برای مختصات دایره-ای حل گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای انجام آنالیز آماری داده‌ها از طرح فاکتوریل استفاده گردید و کلیه آزمون‌ها حداقل در دو تکرار انجام شد، سپس میانگین و انحراف معیار آنها بدست آمد. برای بررسی معناداری اختلافات در سطح $p > 0.05$ از آنالیز واریانس و به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد، آزمون دانکن استفاده شد. تمام مراحل تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) صورت پذیرفت.

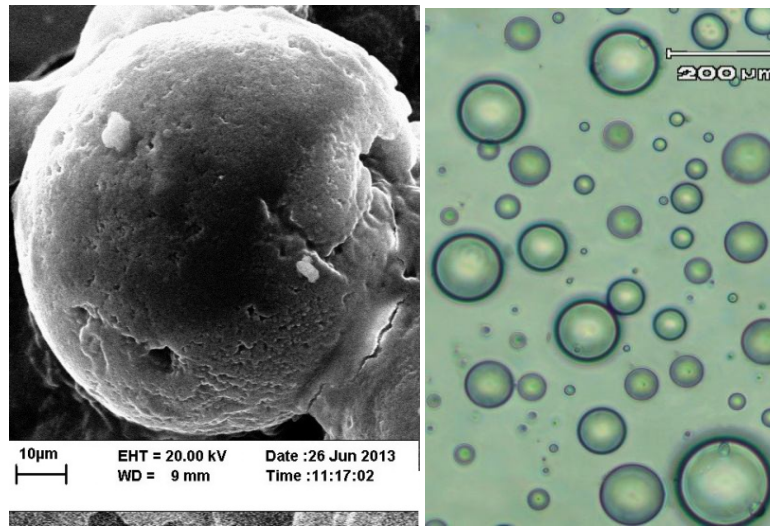
نتایج و بحث

میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیتر حامل دی‌استیل

در این مطالعه میکروکپسول‌های آلژینات-کنسانتره پروتئین آب پنیتر با استفاده از روش امولسیون‌سازی-ژلاتیناسیون داخلی تهیه و دی‌استیل در آن بارگذاری گردید. همانطور که در شکل (الف) مشاهده می‌گردد؛ میکروکپسول‌های حاصله کاملاً کروی، با سطحی صاف و محدوده اندازه‌ای بین ۱۵۰-۲۰ میکرون می‌باشند. برای مشاهده بهتر و نیز بررسی ویژگی‌های پوسته و سطح این

به ترتیب برابر 1.07 ± 0.04 و $112/8 \pm 0.9$ میکرومتر بدست آمد.

میکروکپسول‌ها تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز بررسی گردید (شکل (ب) ۱). مقدار قطر متوسط میکروکپسول‌های حاصله با استفاده از دو تکنیک پردازش تصویر و نیز دستگاه تعیین اندازه ذرات



شکل ۱- تصاویر (الف) میکروسکوپ نوری و (ب) میکروسکوپ الکترونی حاصل از میکروکپسول‌های آلژینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر.

در مرکز میکروکپسول کلئوئید وزومی نسبت به نفوذ رخ داده در دیواره کلئوئیدوزوم بسیار کند می‌باشد. نمایه غلظتی دی‌استیل از میان پوسته (C) در شعاع r توسط معادله زیر بدست می‌آید (Zandi et al, 2014):

$$c = \frac{c_{in}R(R+b)}{br} - \frac{c_{in}R}{b} \quad (3)$$

که c_{in} تغییرات غلظتی اندک در مرکز میکروکپسول می‌باشد. بر این اساس تراوش دی‌استیل (j) از میکروکپسول به صورت شعاعی ثابت بوده و از معادله زیر بدست می‌آید (Zandi et al, 2014):

$$j = 4\pi D \frac{c_{in}R(R+b)}{b} \quad (4)$$

که در این معادله D نمایانگر ضریب نفوذ (متر مربع بر ثانیه) می‌باشد. معادله ۴ تغییرات دی‌استیل با زمان در مرکز را نشان می‌دهد (Zandi et al, 2014):

$$c_{in} = c_{in(0)} \exp\left(-\frac{3D(R+b)}{R^2 \times b} t\right) \quad (5)$$

که در این معادله t برابر زمان (برحسب ثانیه) می‌باشد. از اینرو مقدار کلی رهایش دی‌استیل از هر میکروکپسول (M) به عنوان تابعی از زمان از طریق انتگرال گیری از معادلات ۳ و ۴ بدست می‌آید. نتیجه نهایی را می‌توان به صورت زیر نشان داد (Zandi et al, 2014):

$$M = \frac{4\pi R^3}{3} c_{in(0)} \left(1 - \exp\left(-\frac{3 \times D \times (R+b)}{R^2 \times b} \times t\right)\right) \quad (6)$$

طبق تحقیقات قبلی ما، دو مکانیسم عمده آزادسازی در طی فرآیند رهایش از میکروکپسول‌های آلژینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر رخ می‌دهد؛ اولین مکانیسم نشت ماده کپسوله شده (دی‌استیل) از میان حفرات و سوراخ‌های پوسته میکروکپسول و دومین آن، رهایش

نتایج نشان داد که میکروکپسول آلژینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر حاصله دارای راندمان بارگذاری $79/34$ درصدی برای رهایش دی‌استیل هستند؛ به عبارت دیگر نزدیک به 80 درصد از دی‌استیل استفاده شده اولیه درون میکروکپسول قرار گرفته و حدود 20 درصد آن طی فرآیند تولید میکروکپسول‌های حامل دی‌استیل از دست می‌رود. این امر به این سبب بوده که دی‌استیل ترکیب فرار و با وزن ملکولی پائینی است و عمدتاً در مرحله شستشوی طی فرآیند تهیه میکروکپسول‌های آلژینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر از دست می‌رود.

مدلسازی رهایش دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر

محاسبه ضریب نفوذ

در پژوهش قبلی ما (Zandi et al, 2014) مشخص گردید که رهایش دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر با مکانیسم نفوذ فیک به عنوان مکانیسم غالب و اصلی رهایش رخ می‌دهد. از اینرو برای بررسی تاثیر شرایط رهایش بر آزادسازی دی‌استیل باید ضریب نفوذ محاسبه گردد. به این منظور از قانون فیک استفاده می‌گردد. به منظور مدلسازی نحوه انتقال جرم در میکروکپسول‌های کلئوئیدوزومی تولیدی و برآزش داده‌های رهایش دی‌استیل با استفاده از قانون فیک، معادله نفوذ به صورت نفوذ ناپایا برای مختصات دایره‌ای به شعاع R (متر) و ضخامت دیواره b (متر) حل گردید. در این حالت فرض گردید که تغییرات غلظتی دی‌استیل

طی فرآیند رهایش، از طریق فرآیند نفوذ آزاد گردیده است، صورت می‌پذیرد.

ضریب نفوذ دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلزینات-پروتئین آب پنیر در شرایط شبیه‌سازی شده دهانی مختلف

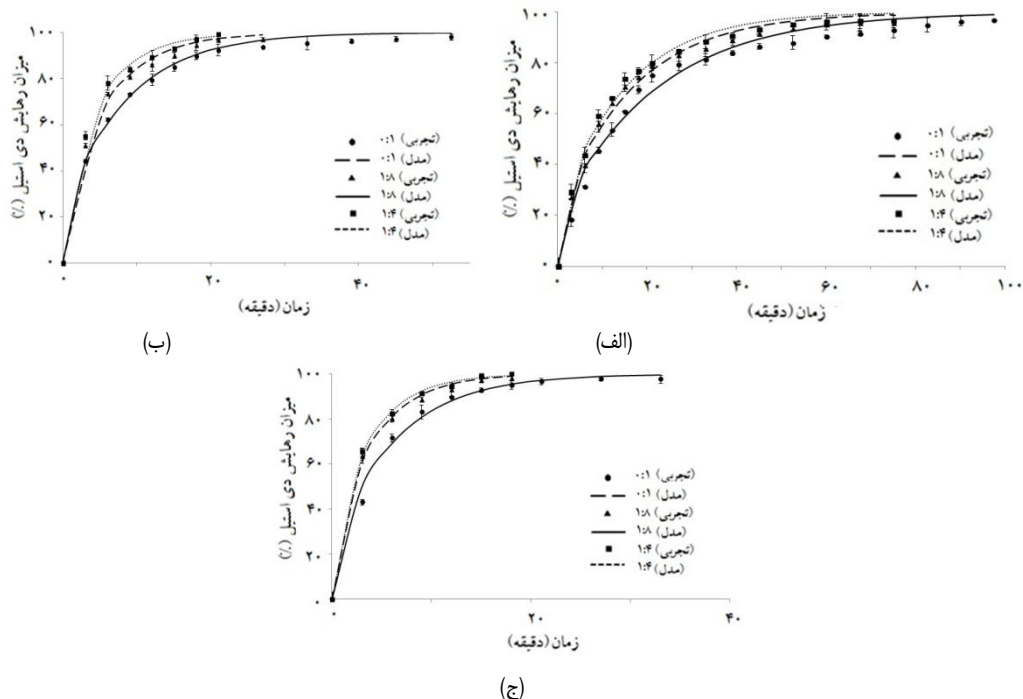
همانطور که اشاره گردید برای مدل‌سازی رهایش دی‌استیل و نیز یافتن ضریب نفوذ از مدل برآمده از قانون فیک استفاده گردید (معادله ۶)؛ در این معادله ضریب نفوذ تنها با استفاده از ۸۳ درصد دی‌استیل رهایش یافته در مرحله انتشار محاسبه گردید. نتایج حاصل از آزمایشات و مدل نشان داد که همبستگی بسیار خوبی بین این نتایج وجود دارد. بطوری که مقدار ضریب همبستگی R^2 بین نتایج تجربی و مدل در تمامی آزمایشات بالای ۹۵ درصد بود (شکل‌های ۲ و ۳).

ضریب نفوذ از طریق برازش داده‌های تجربی با معادله ۶ بدست آمد. جدول ۱ مقدار ضریب نفوذ را برای فرآیند رهایش دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلزینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر تحت نیروهای برشی متفاوت محیط (۰، ۵۰، ۱۰۰ معکوس ثانیه) و نسبت مختلف بزاق به میکروکپسول (۰ به ۱، ۱ به ۴ و ۴ به ۸) نشان می‌دهد.

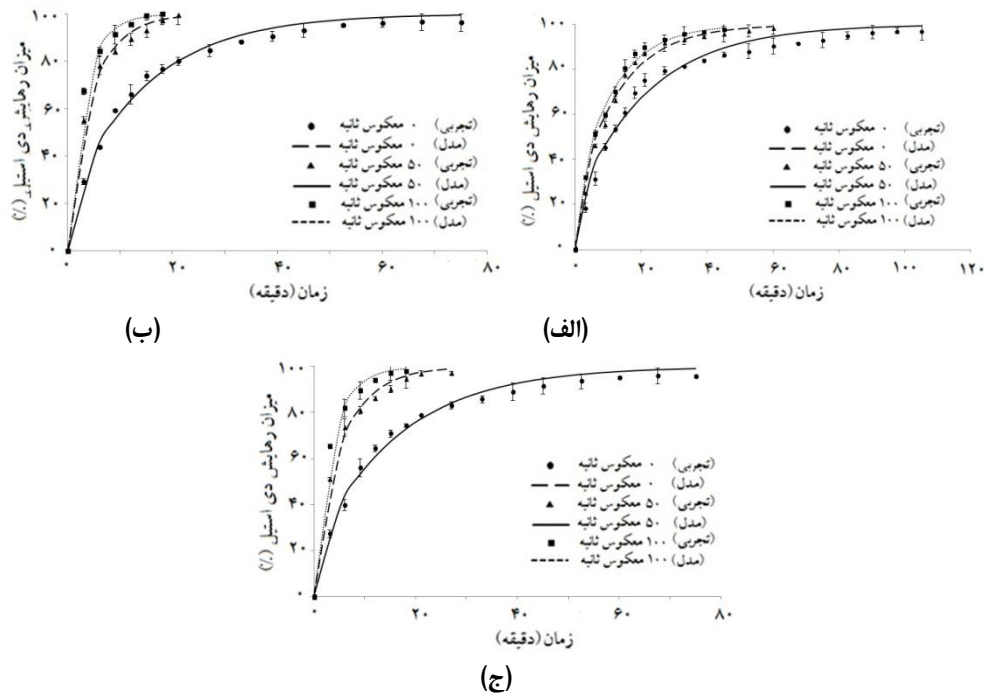
ماده انکپسوله شده با استفاده از مکانیسم نفوذ از میان پوسته میکروکپسول است. رهایش سریع اولیه (که تحت عنوان پدیده رهایش انفجاری شناخته می‌شود) به میزان حفرات و سوراخ‌های درون پوسته میکروکپسول وابسته است؛ از اینرو شیب اولیه موجود در پروفایل رهایش با افزایش درصد حفرات موجود در پوسته میکروکپسول، افزایش پیدا می‌کند. این امر همچنین باعث شده که انتشار از طریق مکانیسم نفوذ سهم کمتری را به خود اختصاص داده و در نتیجه راندمان و همچنین کارایی فرآیند انکپسولاسیون نیز کاهش پیدا نماید. از آنجائیکه نتایج تحقیقات تجربی رهایش نشان داد که حدود ۱۷ درصد از دی‌استیل بلافاصله در لحظه صفر و قبل از هرگونه اندازه‌گیری ممکن، رخ می‌دهد، می‌توان معادله ۵ را به صورت زیر اصلاح نمود (Zandi et al, 2014):

$$f(t) = \frac{M(t)}{M_0} = (0.83 \times (1 - \exp(-\frac{3 \times D \times (R+b)}{R^2 \times b} \times t))) + 0.17 \quad (Y)$$

که در این معادله M_0 و M_t به ترتیب برابر مقدار دی‌استیل رهایش یافته در زمان t و صفر می‌باشد. با استفاده از معادله فوق ۱۷ درصد دی‌استیل آزاد شده اولیه که هیچ نقشی در فرآیند نفوذ نداشته از معادله کسر و محاسبات بر روی مقداری از دی‌استیل که واقعاً در



شکل ۱- پروفایل رهایش دی‌استیل و مدل (درجه اول) برازش شده برای میکروکپسول‌های آلزینات-پروتئین آب پنیر در نیروهای برشی مختلف (۰، ۵۰ و ۱۰۰ معکوس ثانیه) برای (الف) نسبت بزاق به میکروکپسول ۰ به ۱، (ب) نسبت بزاق به میکروکپسول ۱ به ۸ و (ج) نسبت بزاق به میکروکپسول ۱ به ۴ (اعداد نمایانگر میانگین دو آزمون هستند).



شکل ۲- پروفایل رهایش دی‌استیل و مدل (درجه اول) برازش شده برای میکروکپسول‌های آلزینات- پروتئین آب پنیر در نسبت بزاق به میکروکپسول مختلف (۰ به ۱، ۸ به ۸ و ۴ به ۴) و نیروهای برشی (الف) ۰، (ب) ۵۰ و (ج) ۱۰۰ معکوس ثابته (اعداد نمایانگر میانگین دو آزمون هستند).

جدول ۱- ضریب نفوذ پوسته میکروکپسول‌های آلزینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر در سه نیروی برشی محیط و سه نسبت بزاق به میکروکپسول؛ اعداد در جدول نشان دهنده $10^{11} \times D$ متر مربع بر معکوس ثابته می‌باشند (اعداد از میانگین سه آزمون بدست آمده و به همراه انحراف معیار خود گزارش شده است).

نسبت بزاق به میکروکپسول			
۱ به ۱	۸ به ۸	۴ به ۴	نیروی برشی (معکوس ثابته)
$3/79 \pm 0/41^a$	$4/60 \pm 0/33^a$	$4/68 \pm 0/64^a$	۰
$6/04 \pm 0/54^b$	$7/17 \pm 0/53^b$	$7/65 \pm 0/51^b$	۵۰
$8/78 \pm 0/41^c$	$9/32 \pm 0/69^c$	$9/64 \pm 0/28^c$	۱۰۰

اعداد با حروف متفاوت دارای اختلاف معنادار در سطح ۹۵ درصد می‌باشند

مکانیسم نفوذ) است. نتایج مشابهی برای فرآیند جویدن بر میزان سرعت رهایش عطر و طعم توسط برخی از محققان گزارش شده است. روث و روزن (van Ruth and Roozen, 2000) و نیز براون و ویلسون (Brown and Wilson, 1996) گزارش نمودند که اعمال و افزایش فرآیند جویدن شبیه‌سازی شده سبب افزایش سرعت رهایش عطر و طعم از ماتریکس کپسوله کننده می‌گردد. از سوی دیگر افزایش میزان بزاق تأثیر معناداری بر رهایش نداشته که علت این امر به مواد تشکیل دهنده بزاق و ساختار میکروکپسول‌ها وابسته است. از آنجائیکه در پژوهش حاضر آنزیم آلفا آمیلاز ترکیب اصلی بزاق را تشکیل داده و از سوی دیگر میکروکپسول‌ها نیز از آلزینات و پروتئین آب پنیر تشکیل شده است؛ بنابراین انتظار می‌رفت که هیچ تأثیر آنزیمی از آلفا آمیلاز مشاهده نگردد. با این حال میکروکپسول‌های آلزینات-کنسانتره پروتئین آب پنیر قرار است به عنوان حامل طعم در

بمنظور دستیابی به بینش بهتری نسبت به نتایج، ضریب نفوذهای بدست آمده توسط آزمون فاکتوریل مورد آنالیز قرار داده شد. تجزیه و تحلیل‌های انجام شده آشکار نمود که در بین این دو پارامتر تنها نیروی برشی محیط تأثیر معنادار بر ضریب نفوذ داشته است. همانگونه که انتظار می‌رفت، با اعمال و افزایش نیروی برشی شبیه‌سازی شده دهان در محیط رهایش، ضریب نفوذ بطور معناداری افزایش پیدا کرد ($p > 0/05$)؛ این امر احتمالاً به سبب اثر نیروی برشی به عنوان نیروی فشاری است که بصورت فیزیکی باعث افزایش خروج دی‌استیل از حفرات و سوراخ‌های موجود در میکروکپسول می‌گردد. این احتمال زمانی قوت می‌گیرد که نتایج تحقیق قبلی ما (Zandi et al, accepted-In press) نشان داد که تأثیر نیروی برشی بر مرحله اول رهایش (مرحله نشت مواد از حفره‌ها و سوراخ‌ها) بسیار بیشتر از مرحله دوم آن (مرحله انتشار از طریق

استفاده گردید. به این منظور با استفاده از قانون فیک، معادله نفوذ به صورت نفوذ ناپایا برای مختصات دایره‌ای حل گردید و مدل مورد نظر بدست آمد. نتایج این تحقیق نشان داد که مدل توسعه یافته شده بطور موفقیت آمیزی می‌تواند (ضریب همبستگی بالای ۹۵ درصد) رفتار رهایش را پیش‌بینی نموده و بعلاوه این مدل قادر به تخمین میزان ضریب نفوذ می‌باشد. نتایج همچنین نشان داد که اعمال نیروی برشی بطور معناداری سبب افزایش ضریب نفوذ شده درحالی‌که تغییر میزان بزاق تاثیر معناداری بر آن ندارد. نتایج این تحقیق امکان استفاده موفقیت آمیز میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر را برای رهایش کنترل شده عطر و طعم نشان داده و علاوه بر این امکان بکارگیری مدل توسعه یافته در این پژوهش را برای تخمین ضریب نفوذ پوسته میکروکپسول‌های مختلف را فراهم می‌آورد.

مواد غذایی مختلف مورد استفاده قرار گیرد؛ نشاسته به عنوان جزء اصلی از اکثر شبکه‌های غذایی بوده، بنابراین آلفا آمیلاز و بزاق بر رهایش دی‌استیل از این مواد غذایی موثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این پژوهش به منظور توسعه مدلی برای محاسبه ضریب نفوذ و متعاقب آن بررسی تاثیر شرایط محیط رهایش بر ضریب نفوذ (شامل نیروهای برشی مختلف و نسبت‌های متنوع بزاق به میکروکپسول) و همچنین میزان رهایش دی‌استیل از میکروکپسول‌های آلژینات-پروتئین آب پنیر انجام گردید. با این هدف از نتایج پژوهش قبلی ما در زمینه ساخت میکروکپسول‌های جدید برای کاربرد به عنوان حامل عطر و طعم و نیز بررسی مکانیسم رهایش از این میکروکپسول‌ها

منابع

- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia*, 53, 220-223.
- Bakker, J., Brown, W., Hills, B., Boudard, N., Wilson, C., Harrison, M. (1996). *Effect of food matrix on flavour release and perception*. Cambridge: Taylor.
- Brown, W. E., Wilson, C. E. (1996). Individuality of flavour perceptions - the influence of mastication patterns. In *Flavour science recent developments* (pp. 451-455). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Bucking M., Haugen J.E., Steinhart H. (2003). Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century. *Proceedings of the 10th Weurman Flavour Research Symposium*, (pp. 528-531). Beaune, France .
- Chang, T. M. S., Prakash, S. . (2001). Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. *Mol. Biotechnol.*, 17, 249-376.
- Chen, L., Subirade, M. (2006). Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27, 4646-4654.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 50, 213-224.
- Gunning Y. M., Gunning P. A., Kemsley E. K., Parker R., Ring S. G., Wilson R. H., Blake A. (1999). Factors Affecting the Release of Flavor Encapsulated in Carbohydrate Matrixes. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5198-5205.
- Heelan, B. A., Corrigan, O. I. (1998). Preparation and evaluation of microspheres prepared from whey protein isolate. *J Microencapsulation*, 15, 93-105.
- Heinzen, C. (2002). Microencapsulation solve time dependent problems for foodmakers. *European Food and Drink Review*, 3, 27-30.
- Jay M. J. (1982). Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Applied and environmental microbiology*, 525-532.
- Keen, P. H. R., Slater, N. K. H., Routh, A. F. (2012). Encapsulation of yeast cells in colloidosomes. *Langmuir*, 28, 1169-1174.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *Nature*, 392, 5-10.
- Madene A., Jacquot M., Scher J., Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. (1993). Microstructure and fat extractability in microcapsules based on whey proteins or mixtures of whey proteins and lactose. *Food Structure*, 12, 457-468.
- Moreau, D. L., Rosenberg, M. (1999). Porosity of microcapsules with wall systems consisting of whey proteins and lactose measured by gas displacement pycnometry. *Journal of Food Science*, 64, 405-409.
- Naknean, P., Meenune, M. (2010). Factors affecting retention and release of flavour compounds in food carbohydrates. *International Food Research Journal*, 17, 23-34.
- Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.
- Odonnell, P. B., McGinity, J. W. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 28 (1), 25-42.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. (1999). *Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed.)*.
- Potakamory U. R., Barbosa-Canovas G. V. (1995). Fundamental aspects of controlled release in foods. *Trends in Food*

- Science and Technology* , 1(6), 397-406.
- Reineccius G. (1994). *Flavor*. New York: Chapman and Hall, 45-68.
- Rodrigues J. A., Barros A. A. (1997). Determination of diacetyl in beer using differential-pulse polarography. *J. Inst. Brew.* , 103, 311-314.
- Rosenberg, M. Young, S. L. (1993). Whey protein as microcapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. *Food Structures* , 12, 31-41.
- Rosenberg, M., Lee, S. J. . (2004). Calcium-alginate coated, whey protein-based microspheres: preparation, some properties and opportunities. *J Microencapsulation* , 21, 263-81.
- Roth, G.I. and Calmes, R. (1981). *Oral Biology*. St. Louis: The CV Crosby Co.
- Satpathy, G., Rosenberg, M. (2003). Encapsulation of chlorothiazide in whey proteins: effects of wall-to-core ratio and cross-linking conditions on microcapsule properties and drug release. *JMicroencapsulation* , 20, 227-245.
- Sheu, T. Y., Rosenberg, M. . (1998). Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *Journal of Food Science* , 63, 491-494.
- Siefarth C., Tyapkova O., Beauchamp J., Schweiggert U., Buettner A., Bader S. (2011). Influence of polyols and bulking agents on flavour release from low-viscosity solutions. *Food Chemistry* , 129, 1462-1468.
- Steffe, J. (1992). *Rheological methods in food process engineering*. USA: freeman press, 187-220.
- Taylor, A. J. (1996). Volatile flavor release from foods during eating. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 36, 765-784.
- van Ruth, S. M., Roozen, J. P. (2000). Influence of mastication and saliva on aroma release in a model mouth system. *Food Chemistry* , 71, 339-345.
- Zandi, M., Mohebbi, M., Varidi, M., Ramezani, N. (2014). Evaluation of diacetyl encapsulated alginate-whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions. *Food Research International journal* .
- Zydowicz, N., Nzimba-Ganyanad, E., Zydowicz, N. (2002). PMMA microcapsules containing water-soluble dyes obtained by double emulsion/solvent evaporation technique. *Polym. Bull.* , 47(5), 457-463.

Estimation and evaluation of diffusion coefficient of diacetyl encapsulated alginate-whey protein microspheres at simulated mouth conditions

M. Zandi¹- M. Mohebbi^{2*} - M. Varidi³ - N. Ramezani⁴

Received: 2013.12.03

Accepted: 2014.12.28

Introduction: Flavor release from food during consumption in the mouth plays an important role in flavor perception and influenced by the food matrix. Since, food matrix changes biochemically and physically during eating, therefore, food flavor microencapsulation results in controlled release at specific situations. On the other hand, stability and availability of flavors are affected by food processing and storage. To control the flavor release at specific condition during consumption or stability and availability during food processing and storage; it is essential to encapsulate flavor components before use in food complex. Encapsulation is the term for a collection of technique that used as delivery of active and bioactive parts. This novel technology enables isolated of gases, liquid droplets, or solid particles in the core of microscopic vesicular system with porous or non porous semi permeable shell that release occurs in response to the specific situations. Controlling release of active compound depends on microcapsule characteristics such as pore size, mechanical stability of the colloidal shell, shell thickness and shell permeability; molecular size and solubility of active parts in the shell and properties of the release media including shear force, temperature, pH, ionic strength, etc. This paper presents the formation and characterization of novel diacetyl encapsulated alginate-whey protein concentrate (AL-WPC) microcapsules. Diacetyl release was investigated at simulated mouth condition in different ratios of artificial saliva (0, 1:4 and 1:8) and three various oral shear rates (0, 50 and 100 s⁻¹) and the diffusion coefficient was estimated using Fick's law. The main aim of this work was to develop a prediction model to study the flavor release from microcapsules.

Materials and Methodes: Aiming to show the applicability of our agent-based model platforms, the release of 2,3-butanedione (diacetyl) from alginate-whey protein concentrate (AL-WPC) microcapsules was used as a case study to validate our simulation model based on NetLogo platforms. For this purpose, our previous work on evaluation of diacetyl encapsulated alginate-whey protein microspheres release kinetics and mechanism at simulated mouth conditions was used (Zandi, M., Mohebbi, M., Varidi, M., Ramezani, N., 2014). In previous our work, encapsulated diacetyl release was measured at three oral shear rates (0, 50 and 100 s⁻¹) and various ratios of saliva to microcapsule (0, 1:4 and 1:8) simulating mouth conditions. Then, experimental release data were fitted using different kinetic models. It was found that release from these microcapsules followed a classical Fickian diffusion. We use release data for calculating release rate. For model validating, diffusion equation was fitted to the experimental data, and diffusion coefficient was obtained for diacetyl release at various mouth conditions. To this purpose, the following model was obtained by solving unsteady diffusion equation in spherical coordinate:

$$\frac{M(t)}{M_0} = 100 - \exp\left(-\frac{3 \times D \times (R+b)}{R^2 \times b} \times t\right) \quad (1)$$

where M (t) and M₀ are the diacetyl release at time t and 0 respectively, R is a microcapsules radius (m), t is time, D is the diffusion coefficient and b is the shell thickness (m). We also use diffusion coefficient to calculate permeability for each specific condition by equation (2):

$$P = \frac{D \times K}{b} \quad (2)$$

Where P is the permeability coefficient, D is the diffusion coefficient and K is the partition coefficient.

Finally, the model and experimental data were analyzed using Matlab software (R2007).

Result and Discussion: In our study, AL-WPC microcapsule was fabricated by emulsification/internal gelation method, and diacetyl was loaded into microcapsule. Most of microspheres had a completely spherical shape with smooth surface, and range in size from 20-150 μm. The diacetyl encapsulated microsphere had a porous and smooth shell with some holes that caused the quicker diacetyl release initially. The mean

1- PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran
2 and 3- Associate professor and Assistant Professor Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

4- Assistant Professor, Department of Chemistry, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

(*- Corresponding Author: E-mail: mohebbatm@gmail.com)

hydrodynamic diameter $112.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (mean value \pm SD for $n=2$) was measured via particle size analyzer (DLS). the high efficiency of 79.34% was obtained for diacetyl encapsulated AL-WPC microcapsule. About 20% of diacetyl was loosed because of the solubility and volatility of the diacetyl molecule (diacetyl is a low molecular weight and water soluble component)..

Conclusion: It was showed that the shear rate of release media had a significant ($p<0.05$) effect on the release of diacetyl from AL-WPC microspheres, but saliva ratio had not any significant effect. The diacetyl release data fit well to developed model with R^2 values greater than 0.95

Keywords: Diffusion coefficient, Fick's law, Alginate-whey protein concentrate microcapsule, Diacetyl; Controlled released