

بهینه سازی شرایط استخراج بربرین از زرشک بی دانه و ریزپوشانی عصاره آن به روش الحاق ترکیبی با استفاده از ژلاتین / کتیرا (*Astragalus rahensis*)

مریم کشتکاران^۱، مریم میزانی^۲، محمدعلی ابراهیم زاده موسوی^۳، محمد امین محمدی فر^۴، رضا عزیز زاده^۵

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: m.mizani@srbiau.ac.ir

۳- استاد گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، گروه تحقیقاتی مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی دانمارک، کپنهاک، دانمارک

۵- استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۱

چکیده

سابقه و هدف: زرشک بی دانه *Berberis vulgaris* محصول بومی ایران حاوی ترکیبات ارزشمندی با اثرات درمانی، سلامتی بخش و تغذیه‌ای از جمله بربرین می‌باشد که بخش عمده‌ای از این گیاه به صورت ضایعات به هدر می‌رود. هدف تحقیق حاضر بهینه‌سازی شرایط استخراج بربرین از گیاه کامل با بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ریزپوشانی عصاره به روش الحاق ترکیبی با استفاده از دو بیوپلیمر در دسترس، ژلاتین/کتیرا پرک (*Astragalus rahensis*) و بررسی ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول مرطوب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی به روش سطح پاسخ بر پایه سه فاکتور از فرآیند استخراج شامل زمان، دما و درصد حلال/آب در سه سطح با ۵ نقطه مرکزی انجام و غلظت بربرین در عصاره به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن آنالیز تا شرایط بهینه تعیین گردد. عصاره بهینه به روش الحاق ترکیبی از دو ترکیب ژلاتین/کتیرا با سه نسبت ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳ w/w ریزپوشانی شده و پارامترهای بازده، کارایی، اندازه ذرات، حلالیت و ساختار میکروسکوپی میکروکپسول‌های مرطوب و میزان رهايش بربرین از آنها مورد بررسی واقع شد.

یافته‌ها: شرایط بهینه استخراج، در مدت زمان ۰/۵ ساعت، دمای ۲۲/۹ °C و با نسبت ۷۵٪ حلال/آب با مطلوبیت ۰/۸۸ تعیین شد. میانگین سطحی قطر میکروکپسول‌ها در محدود ۷۱/۳۱-۹۰/۱۵ میکرون می‌باشد. کپسول با نسبت ۱:۲ w/w پروتئین/پلی ساکراید دارای بیشترین بازده ۹۵/۱٪ و کپسول با نسبت ۲:۱ دارای بیشترین حلالیت ۱۰٪ و میزان کارایی در تمام نمونه‌ها یکسان و حدود ۹۶±۱٪ است.

نتیجه‌گیری: روش الحاق ترکیبی با بکارگیری ژلاتین/کتیرا با نسبت ۱:۲، جهت تولید میکروکپسول مرطوب عصاره بهینه بربرین با بیشترین بازدهی و کارایی، حلالیت کم و اندازه کمتر از ۱۰۰ میکرون پیشنهاد و توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: عصاره بربرین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ریزپوشانی، میکروکپسول مرطوب، بازدهی و کارایی، حلالیت

• مقدمه

(۱). مطالعات بسیاری بر ویژگی‌های شیمیایی و سلامتی بخشی زرشک انجام شده است. بربرین ایزوکوئینولین آلکالوئیدی با بلورهای سوزنی شکل زرد رنگ، فرمول شیمیایی $C_{20}H_{18}NO_4$ ، وزن مولکولی ۳۳۶/۴، نقطه ذوب ۱۴۵ درجه سانتی‌گراد، محلول در الکل و آب گرم و کم محلول در آب سرد یکی از مهمترین ترکیبات فعال زرشک بی دانه است (۲).

امروزه افزایش ایمنی بدن به کمک گیاهان دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد توجه محققین قرار دارد. زرشک بی‌دانه گونه *Berberis vulgaris* متعلق به خانواده *Berberidaceae* یکی از مهمترین محصولات بومی با اثرات غذایی/دارویی/درمانی به ویژه منطقه قائن ایران است که میزان برداشت آن در سال ۹۹، معادل ۲۱ هزار تن گزارش شده است

ساختار کپسول‌ها شده و در نتیجه شرایط مناسبی را برای اکسیداسیون کپسول فراهم می‌آورد (۱۵) و از سوی دیگر خشک کردن کپسول موجب صرف هزینه و زمان بیشتر برای فرآیند و تغییر در ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول می‌گردد. تحقیقات نشان داده که استفاده از میکروکپسول مرطوب در مقایسه با نوع خشک شده آن در محصولات غذایی نظیر کیک، به بهبود رنگ محصول هم کمک می‌کند (۱۶).

اهداف اصلی از تحقیق حاضر شامل:

- ۱- بهینه‌سازی فرآیند استخراج ترکیب بربرین از گیاه کامل زرشک بی‌دانه بر اساس میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با بکارگیری سه پارامتر مدت زمان (۲۴-۰/۵ ساعت)، دما (C ۵۰-۵) و نسبت حلال اتانول به آب (۷۵-۰/۰).
- ۲- ریزپوشانی عصاره بهینه بربرین، به روش الحاق ترکیبی توسط دو بیوپلیمر ژلاتین و صمغ کتیرا (*Astragalus rahensis*) که در فرآیند ریزپوشانی مشاهده نشده است.
- ۳- بررسی ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول مرطوب جهت صرفه جویی در صرف زمان و هزینه فرآیند خشک کردن کپسول

• مواد و روش‌ها

مواد: گیاه زرشک بی‌دانه گونه *Berberis vulgaris* از باغ‌های شهر قائن، کتیرای پرک گونه اسفراین (*Astragalus rahensis*) از انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی ایران، دانشگاه شهید بهشتی، متانول با درجه کیفی HPLC و اتانول خالص (CAS No:64-17-5) به عنوان حلال استخراج (شرکت مرک، آلمان)، بربرین کلراید (>90% Purity B3225) به عنوان ترکیب استاندارد، 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)، و ژلاتین پوست گاو نوع B (شرکت سیگما آلدریج) و ترانس گلوتامیناز میکروبی (TEGEN 220 DM) از شرکت بنسون ترکیه تهیه شد.

استخراج بربرین: ساقه، برگ و میوه زرشک بی‌دانه تهیه و به مدت یک هفته در سایه خشک و با استفاده از آسیاب برقی خرد و با استفاده از الک با شماره مش ۳۵ نمونه پودری با اندازه ذرات معادل ۰/۲ الی ۰/۵ میلی‌متر آماده شد. این نمونه در آون تحت خلا (MEMERT VO29 ساخت آلمان) با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت تا رسیدن به رطوبت حدود ۰/۲٪ خشک شد. بهینه‌سازی عملیات استخراج به روش آماری سطح پاسخ با ۱۷ تیمار براساس سه فاکتور غلظت حلال (۷۵، ۲۷/۵ و صفر درصد)، مدت زمان (۲۴، ۱۲/۲۵، ۰/۵ ساعت) و دمای فرایند استخراج (۵۰، ۳۷/۵، ۵ درجه سانتی‌گراد) (جدول ۱) طراحی شد. فرآیند استخراج بربرین از سه گرم نمونه پودری با استفاده از حلال اتانول انجام گرفت.

بربرین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد صفرا، م‌سهل، در مان بیماری‌های کبدی، کلیوی و مجاری ادراری، ضد روماتیسمی، ضد التهاب، درمان قندخون، درمان چربی خون و ضد آریتمی، ضد باکتری و ضد قارچ می‌باشد (۳). تاکنون استخراج مواد مؤثره و فعال گیاهی از جمله زرشک با روش‌های متفاوت و گاهی پرهزینه با کمک حلال‌های قطبی و غیر قطبی انجام شده است (۴-۶). برای انتخاب نوع حلال، دو نکته اساسی باید مورد توجه قرار گیرد: دستیابی به بیشترین میزان استخراج و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تولید کمترین میزان بقایای سمی حلال به لحاظ حفظ سلامتی انسان و مشکلات زیست محیطی (۷). تحقیقات پیشین نشان داده که متانول و اتانول یکی از بهترین حلال‌ها برای استخراج مواد فعال است که از میان این دو، اتانول با کمترین خطرزایی برای سلامت و محیط زیست مناسب‌تر است (۸). از سوی دیگر در انتخاب روش استخراج، پرهیز از بکارگیری دستگاه‌های پرهزینه در فرآیند استخراج، می‌تواند گامی بزرگ در اجرایی شدن تحقیق در صنعت باشد.

ریزپوشانی از روش‌های متداول جهت حفظ خواص ترکیبات فعال مانند آنتی‌اکسیدان‌ها، آلكالوئیدها، مواد فنلی، مواد معطر، اولئورزین‌ها، اسیدهای چرب، پروبیوتیک‌ها و مواد رنگی در برابر آسیب‌های محیطی است. فرآیند الحاق ترکیبی مرکب یکی از روش‌های ریزپوشانی بر پایه برهمکنش‌های الکترواستاتیکی پروتئین و پلی‌ساکارید با بارهای مخالف است. در این فرآیند، از پلی‌ساکاریدهای آنیونی و یا کاتیونی طبیعی نظیر صمغ عربی، کیتوزان، و کتیرا استفاده می‌شود (۹). صمغ بومی و طبیعی کتیرا دارای دو بخش اصلی محلول در آب (تراگانانتیک اسید) و نامحلول در آب (باسورین) است و هر دو بخش نامحلول در اتانول می‌باشند که دارای گونه‌های متفاوت با ویژگی‌های عملکردی مختلف می‌باشد (۱۰). در محیط اسیدی، ترکیبات پروتئینی نظیر کازئین با بارالکتریکی مثبت با هیدروکلوئید آنیونی کتیرا ایجاد کمپلکس می‌کند (۱۱). گونه‌های *Astragalus gossypinus* و *Astragalus compactus* در میکروانکپسول‌اسیون (۱۲)، نانوانکپسول‌اسیون (۱۳) و کمپلکس کواکسرویشن (۱۱) بکار گرفته شده است. در میان گونه‌های مختلف صمغ کتیرا، گونه *Astragalus rahensis*، از نوع پرک، با کمترین هزینه نسبت به دیگر گونه‌ها، دارای ویژگی‌های کاربردی مناسب و بومی منطقه اسفراین می‌باشد (۱۴).

تحقیق‌های پیشین نشان می‌دهد که میکروکپسول‌های تولیدی پس از فرآیند الحاق ترکیبی معمولاً توسط خشک‌کن انجمادی خشک می‌شوند که از یکسو باعث ایجاد تخلخل در

به مدت ۵ دقیقه با ۶۰۰ rpm آغاز شد و توسط اولتراتوراکس (T25 digital Ultra-Turrax® Homogenizer IKA, Germany) به مدت ۳ دقیقه با ۱۰۰۰۰ rpm هموزن گردیدند. ۱۰ میلی لیتر از عصاره حاوی بربرین به دیسپرسیون حاصل افزوده شد. pH مخلوط توسط اسید استیک (w/w) ۱۰٪ به حدود 4 ± 0.1 رسانده و پس از گذشت ۲ ساعت ۰/۱ گرم ترانس گلوتامیناز (۱۲۰ u/g) به منظور ایجاد اتصال عرضی در دیواره افزوده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. مخلوط حاصل در سانتریفیوژ با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مایع رویی جداسازی، فیلتر و در بن ماری (MEMERT WB29) با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه و ویژگی‌های سطحی میکروسکوپی نمونه های مرطوب میکروکپسول توسط میکروسکوپ نوری (Motic® BA300) (Barcelona, Spain) با بزرگنمایی $40 \times$ بررسی شد (۱۱).

بازده و کارایی فرایند ریزپوشانی: نمونه های میکروکپسول مرطوب در آون در دمای 100°C به مدت ۸ ساعت خشک شد و میزان بازده ریزپوشانی مطابق فرمول زیر محاسبه می‌گردد:

$$EY = \frac{E2}{E1} \times 100$$

EY: بازده فرایند ریزپوشانی، E₂: وزن میکروکپسول حاصل پس از ریزپوشانی، E₁: میزان مواد جامد موجود در سوسپانسیون (۱۱).

به منظور بررسی میزان کارایی، ۳ میلی گرم از نمونه میکروکپسول در ۱۰ میلی لیتر اتانول بدون آب حل و به مدت ۲ ساعت در محیط تاریک قرار داده شد. غلظت بربرین در محلول فوقانی توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد و کارایی ریزپوشانی براساس فرمول زیر محاسبه شد (۲۰):

$$(\%) \text{ میزان} = 100 \times (\text{وزن بربرین کل} / \text{وزن بربرین کپسوله شده})$$

کارایی

حلالیت: ده میلی گرم از هر نمونه میکروکپسول در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر دیسپرس شده و به مدت ۵ دقیقه در شیکر قرار داده و سپس بخش نامحلول توسط سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه و با ۷۵۰۰ rpm) جداسازی شد. ۲/۵ میلیتر از مایع رویی در پلیت از قبل توزین شده، ریخته و در آون 105°C به مدت ۲ ساعت خشک و پس از خنک شدن مجدداً توزین و میزان حلالیت در آب از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۱):

$$S\% = M_2 - M_1 / 0.25 \times 100$$

M₂ = وزن پلیت و ترکیبات حل شده

M₁ = وزن پلیت خالی

عصاره حاصل در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه به تعادل دمایی رسید و سپس با ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره فوقانی با کاغذ صافی واتمن سایز ۴۱ صاف و حلال موجود در آن به روش تغلیط تحت خلا (HS-2005 S-N HAN SHIN ساخت کره جنوبی) در دمای $55-60^\circ\text{C}$ و 500 میلی مترجیوه جداسازی و غلظت بربرین در آن با استفاده از روش HPLC تعیین گردید. نمونه بهینه براساس بیشترین راندمان استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی توسط نرم افزار مشخص گردید (۱۷).

آزمون‌های ارزیابی غلظت بربرین در نمونه های عصاره و فعالیت آنتی اکسیدانی آن: به منظور رسم منحنی استاندارد بربرین، محلول‌هایی با غلظت‌های در محدوده $25 \mu\text{g/ml}$ - ۰/۷ ترکیب استاندارد بربرین در حلال متانول تهیه و منحنی استاندارد با ضریب همبستگی $R^2 = 0.995$ ترسیم شد. در این روش از ستون کروماتوگرافی C18 5-100 با قطر و ارتفاع به ترتیب ۴/۶ میلی متر و ۲۵ سانتی متر، پمپ مخصوص آن از نوع ۱۰۰۰ و مجهز به دکتور ماوراءبنفش با طول موج ۲۳۲ نانومتر استفاده گردید. فاز متحرک مورد استفاده مخلوط استونیتریل/تری فلورواستیک اسید/ آب به نسبت v/v/v ۶۰/۱/۴۰ و حجم هر تزریق به دستگاه ۲۰ میکرولیتر با نرخ جریان ml/min ۱ و دمای 25°C تنظیم شد (۱۸).

فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های حاوی بربرین به روش DPPH براساس احیاء رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل اندازه گیری شد. ۱ میلی لیتر از هر نمونه به ۳ میلی لیتر از محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مول (معادل ۰/۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول) مخلوط و در اینکوباتور تاریک با دمای محیط درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه قرار گرفت و به طور مجزا با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۵۱۷ نانومتر بررسی شد. ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر اسید آسکوربیک نیز به عنوان کنترل در حلال اتانول تهیه شد. فعالیت رادیکال آزاد با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\% \text{فعالیت آنتی اکسیدان} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac = میزان جذب در نمونه شاهد

As = میزان جذب در نمونه (۱۹).

ریزپوشانی بربرین: فرایند ریزپوشانی بربرین به روش الحاق ترکیبی با به کارگیری پلیمر ژلاتین/ صمغ کتیرا انجام شد. محلول‌های ژلاتین و کتیرا به نسبت (w/w) ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه در دمای 45°C به صورت مجزا (w/w) ۲/۵: ۲/۵، ۳/۲۵: ۱/۷۵، ۳/۲۵: ۱/۷۵) تهیه و با همزن مغناطیسی

بربرین در جدول ۱ و تأثیر متغیر مستقل بر استخراج بربرین و فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین به ترتیب در معادلات ۱ و ۲ آورده شده است.

معادله ۱.

$$Y_1 = 7/23 - 0/12A + 2/58B + 5/79C + 3/15AB - 0/45AC + 1/44B \\ C + 0/12A^2 + 0/97B^2 + 0/12C^2$$

معادله ۲.

$$Y_2 = 65/25 - 7/12A + 2/86B + 3/36C + 1/58B - 2/52AC - 3/80B \\ C + 9/92A^2 + 0/45B^2 + 0/93C^2$$

Y_1 و Y_2 به ترتیب غلظت بربرین و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره، A، B و C به ترتیب زمان، دما و درصد حلال را نشان می دهند.

ضریب منفی زمان و اثر متقابل زمان و درصد حلال در معادله ۱ حاکی از آن است که هر دو عامل سبب کاهش میزان استخراج بربرین می شوند و براساس معادله ۲ علاوه بر موارد فوق اثر متقابل دما-درصد حلال نیز موجب کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بربرین می گردد.

اثر متقابل زمان- دما، زمان-درصد حلال و دما- درصد حلال بر میزان استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین به ترتیب در نمودارهای سه بعدی ۱ و ۲ (الف-ج) نمایش داده شده است. بیشترین و کمترین غلظت بربرین (۱۷/۲۹ و ۰/۵ میکروگرم/ میلی لیتر) به ترتیب در نمونه های ۱۳ و ۱۴ و در دماهای ۵۰ و ۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۱۲/۲۵ و ۰/۵ ساعت و تو سط در صد های حلال ۷۵ و ۱۰، استخراج شده است. میزان استخراج بربرین در شرایط یکسان دما و زمان در نمونه های (۳ و ۱۶)، (۷ و ۱۴)، (۸ و ۱۵) با افزایش درصد حلال به ترتیب تا حدود ۶، ۹ و ۱۰/۳ برابر افزایش می یابند. همچنین افزایش درصد اتانول حدود ۱/۵ درصد میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین از ۵۸/۰۴۸ به ۸۲/۹۰۹٪ را افزایش می دهد. در نمونه های ۴ و ۹ در دمای ۵ درجه سانتیگراد و ۳۷/۵٪ حلال، با افزایش زمان از ۰/۵ ساعت به ۲۴ ساعت میزان بربرین حدود ۴/۵ برابر کاهش می یابد. اثر متقابل دما- زمان نشان می دهد که با درصد حلال ثابت میزان استخراج بربرین در دمای ۵ درجه و ۰/۵ ساعت ماکزیمم است که با افزایش زمان تا ۲۴ ساعت میزان آن ۵۰٪ کاهش می یابد. در ۰/۵ ساعت زمان، با افزایش دما ابتدا میزان بربرین استحصالی ثابت و سپس به تدریج تا ۱۵/۱۸ میکروگرم/ میلی گرم افزایش می یابد. اثر متقابل زمان-درصد حلال بر میزان بربرین در دمای ثابت به تدریج افزایش می یابد و از ۲/۸۶ به ۱۶/۵۴ میکروگرم/

توزیع اندازه ذرات: منحنی توزیع اندازه ذرات میکروکپسول ها به صورت دیسپرسیون ۱ میکروگرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای اتاق با استفاده از دستگاه (Laser diffraction particle size analyzer master sizer-2000, Malvern Instruments.UK) بررسی گردید. پارامترهای $d(0.9)$ ، $d(0.5)$ ، $d(0.1)$ و $D[3,2]$ تعیین و میزان پراکندگی ذرات حول میانگین مطابق مدل فرانوفر محاسبه شد (۲۲):

$$\text{Span} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)}$$

روند رهايش بربرين: ۶ میلی گرم از نمونه ها همراه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر در لوله های آزمایش شیشه ای درب دار ریخته و در فاصله زمانی ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد (دمای پاستوریزاسیون) حرارت داده شد. سپس میکروکپسول های موجود در نمونه ها با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر جدا سازی گردید. میزان جذب مایع آزاد شده از میکروکپسول ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر خوانده و مقدار بربرین موجود از طریق برازش جذب منحنی استاندارد بربرین اندازه گیری شد. برای بدست آوردن منحنی استاندارد، غلظت های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم بربرین استاندارد در ۱۰ میلی لیتر اتانول در لوله فالكون حل شد و با استفاده از فرمول $m_1v_1 = m_2v_2$ میزان جذب ۰/۰۱ میلی لیتر از محلول های فوق در طول موج ۴۷۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر خوانده و منحنی در نرم افزار اکسل ترسیم گردید. میزان رهايش بربرين به صورت درصد رهايش و براساس مقدار کل بربرين اوليه موجود در نمونه ها گزارش شد (۱۱).

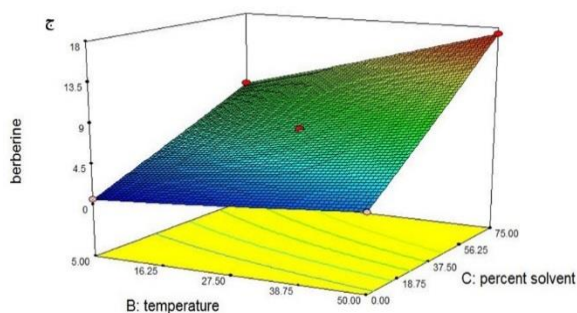
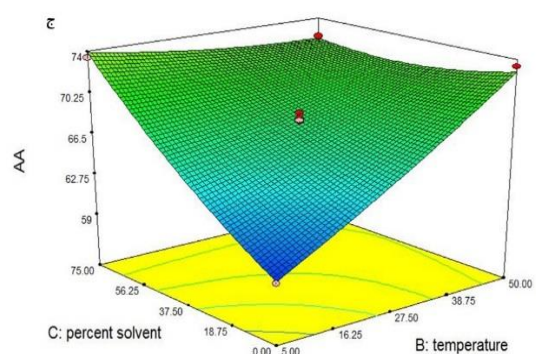
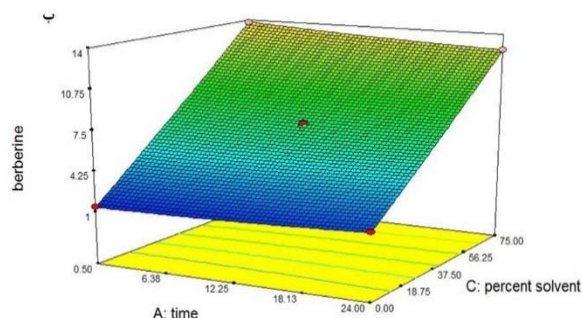
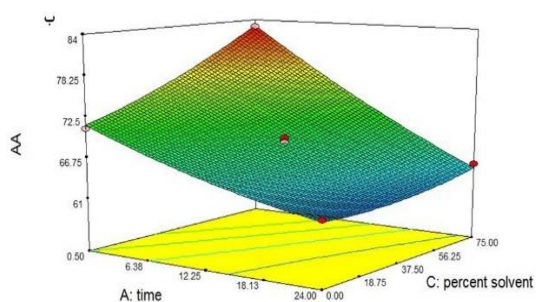
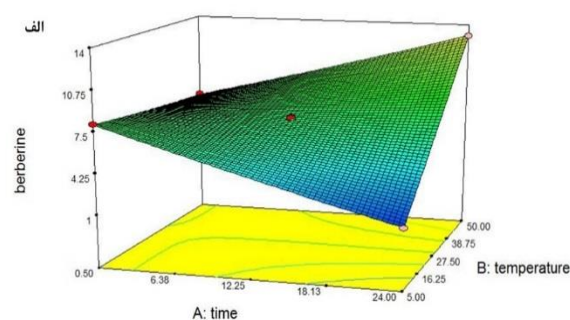
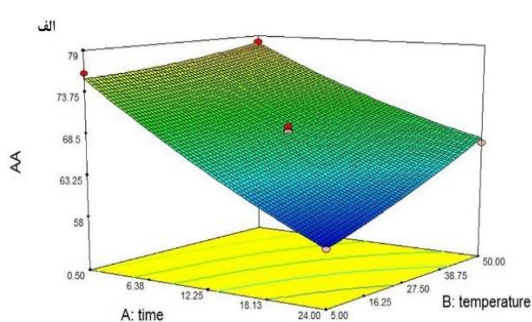
تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از نرم افزار Design Expert (Stat Ease Corp., USA)، بهینه سازی فرآیند استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین در قالب طرح Box- Behnken با سه فاکتور زمان، دما، درصد حلال در سه سطح با ۱۷ نمونه همراه با ۵ نقطه مرکزی طراحی و مورد ارزیابی قرار گرفت. وجود تفاوت معنی دار در بین نتایج و اثرات متقابل فاکتورها به روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) ($P < 0/05$) با استفاده از نرم افزار SPSS® 22 بررسی شد.

• یافته ها

بهینه سازی فرآیند استخراج بربرین و میزان فعالیت آنتی اکسیدانی آن: منحنی استاندارد بربرین به صورت $Y = 52197x - 46125$ ($R^2 = 0/996$) بدست آمد. نتایج حاصل از تأثیر سه سطح از سه متغیر زمان، دما و درصد حلال بر میزان استخراج بربرین و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره

متقابل زمان-درصد حلال زمانی که درصد حلال ۷۵٪ و ۵۰٪ ساعت ۳۴/۷۸٪ است درحالی که افزایش زمان تا ۲۴ ساعت حتی با افزایش درصد حلال فعالیت آنتی اکسیدانی را تا ۶۵/۴۱٪ کاهش می‌دهد. بالاترین درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در نمودار اثر متقابل دما-درصد حلال در ۷۵٪ حلال و ۵۰ درجه سانتی‌گراد ۶۸/۱۳٪ است درحالی که کمترین مقدار آن در ۵ درجه سانتی‌گراد و ۰٪ حلال، ۵۷/۲۱٪ مشاهده می‌شود.

میلی لیتر می‌رسد. اثر متقابل دما-درصد حلال در زمان ثابت، با افزایش دو پارامتر دما و درصد حلال میزان بربرین از ۱/۵۷ به ۱۶/۲۳ میکرومتر/میلی لیتر افزایش می‌یابد. اثر متقابل دما-زمان بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بربرین با درصد حلال ثابت نشان می‌دهد که با افزایش دما و زمان، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی مشاهده می‌شود درحالی که کاهش دما با افزایش زمان، کاهش درصد فعالیت آنتی اکسیدانی تا ۵۹/۶۴٪ را به دنبال دارد، بیشترین درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در اثر



شکل ۲. منحنی سطح پاسخ اثرات متقابل الف) دما-زمان، ب) زمان-درصد حلال و ج) دما-درصد حلال بر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بربرین

شکل ۱. منحنی سطح پاسخ اثرات متقابل الف) دما-زمان، ب) زمان-درصد حلال و ج) دما-درصد حلال بر میزان استخراج بربرین

جدول ۱. طرح آزمایش و اثر متغیرهای دما، زمان و درصد حلال بر میزان استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین با استفاده از مدل سطح پاسخ

نمونه	دما (°C)	زمان (h)	درصد حلال به آب (%)	میزان بربرین (µg/ml)	فعالیت آنتی اکسیدان (%)
۱	۲۷/۵	۱۲/۲۵	۳۷/۵	۷/۳۲±۰/۰۲	۶۸/۲۲±۱/۲
۲	۲۷/۵	۱۲/۲۵	۳۷/۵	۷/۲۱±۰/۰۲	۶۸/۴۳±۱/۵
۳	۲۷/۵	۲۴	۷۵	۱۲/۶۸±۰/۰۱	۶۴/۵±۱/۲
۴	۵	۲۴	۳۷/۵	۱/۷۵±۰/۰۱	۵۸/۰۵±۲/۳
۵	۵۰	۲۴	۳۷/۵	۱۳/۰۵±۰/۰۱	۶۶/۲۵±۱/۳
۶	۲۷/۵	۱۲/۲۵	۳۷/۵	۷/۲۵±۰/۰۲	۶۸/۹۴±۱/۴
۷	۵	۱۲/۲۵	۷۵	۹/۲۵±۰/۰۱	۷۳/۴۳±۱/۴
۸	۲۷/۵	۰/۵	۰	۱/۳۶±۰/۰۱	۷۰/۸۳±۲/۱
۹	۵	۰/۵	۳۷/۵	۸/۱۵±۰/۰۲	۷۶/۱۴±۱/۷
۱۰	۲۷/۵	۱۲/۲۵	۳۷/۵	۷/۱۲±۰/۰۲	۶۷/۴۱±۱/۲
۱۱	۲۷/۵	۱۲/۲۵	۳۷/۵	۷/۲۷±۰/۰۲	۶۸/۲۴±۲/۲
۱۲	۵۰	۰/۵	۳۷/۵	۷/۰۳±۰/۰۲	۷۲/۲۱±۲/۴
۱۳	۵۰	۱۲/۲۵	۷۵	۱۷/۲۹±۰/۰۱	۷۸/۲۱±۱/۸
۱۴	۵	۱۲/۲۵	۰	۰/۵۰±۰/۰۲	۵۹/۴۴±۲/۷
۱۵	۲۷/۵	۰/۵	۷۵	۱۳/۷۷±۰/۰۱	۸۲/۹۱±۱/۷
۱۶	۲۷/۵	۲۴	۰	۲/۰۸±۰/۰۲	۶۲/۳۴±۲/۳
۱۷	۵۰	۱۲/۲۵	۰	۲/۷۶±۰/۰۲	۷۳/۴۳±۱/۳
	۲۲/۹	۰/۵	۷۵	۱۵/۰۰±۰/۰۲	۸۲/۰۰±۲/۱
	۲۲/۹	۰/۵	۷۵	۱۶/۱۰±۰/۰۲	۸۵/۲۰±۱/۱

بهینه مدل
اندازه گیری شده

آخرین مرحله مدل آماری شامل ارائه گرافیکی رابطه‌ی مدل و تعیین شرایط عملیاتی بهینه‌سازی انجام شد. شرایط بهینه طراحی شده نرم‌افزار برای استخراج بربرین با بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی، ۷۵٪ حلال در مدت ۰/۵ ساعت و ۲۲/۹ C دما با ۱۵ میکروگرم/ میلی لیتر بربرین و فعالیت آنتی اکسیدانی ۸۲٪ و مطلوبیت ۰/۸۸ تعیین شد. میزان بربرین استحصالی از مایه گاهی ۱۶/۱ میکروگرم/ میلی لیتر با ۸۵/۲٪ فعالیت آنتی اکسیدانی است که با مقادیر پیش‌بینی شده تفاوت معنی‌داری ($p < 0/05$) نداشته و نشان از صحت بهینه‌سازی دارد.

تنا سب مدل و آنالیز آماری: بهینه‌سازی شرایط استخراج بربرین در سه سطح محدود به سطح بالا و پایین از سه پارامتر متغیر دما، زمان و درصد اتانول انجام شد. ۱۷ نمونه با پنج نقطه مرکزی با شرایط دمایی ۲۷/۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۲/۲۵ ساعت و ۳۷/۵٪ اتانول طراحی و با مربع خطای خالص محاسبه شد. برای برر سی کیفیت مدل‌ها، نتایج جداول ۲ و ۳ نشان می‌دهد که در میان تمام مدل‌ها، مدل درجه دوم (quadratic) بالاترین مقادیر R^2 را برای استخراج بربرین و فعالیت آنتی اکسیدانی دارد.

جدول ۲. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر زمان، دما و درصد حلال بر میزان استخراج بربرین

منابع	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F-value	p-value
مدل	۹	۳۷۰/۳۵	۴۱/۱۵	۷۸۷۱/۳۳	۰/۰۰۰۱ <
زمان-A	۱	۰/۱۱	۰/۱۱	۲۰/۶۸	۰/۰۰۲۶ <
دما-B	۱	۵۳/۳۵	۵۳/۳۵	۱۰۲۰۵/۸۰	۰/۰۰۰۱ <
درصد حلال-C	۱	۲۶۷/۸۵	۲۶۷/۸۵	۵۱۲۳۴/۲۸	۰/۰۰۰۱ <
AB	۱	۳۹/۶۹	۳۹/۶۹	۷۵۹۲/۰۲	۰/۰۰۰۱ <
AC	۱	۰/۸۲	۰/۸۲	۱۵۶/۶۷	۰/۰۰۰۱ <
BC	۱	۸/۳۵	۸/۳۵	۱۵۹۷/۶۱	۰/۰۰۰۱ <
A ²	۱	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۱/۴۵	۰/۰۱۱۷ <
B ²	۱	۰/۰۳۹	۰/۰۳۹	۷/۵۴	۰/۰۲۸۷ <
C ²	۱	۰/۰۶۰	۰/۰۶۰	۱۱/۴۵	۰/۰۱۱۷ <
باقیمانده‌ها	۷	۰/۰۳۷	۵/۲۲۸×۱۰ ^{-۳}		
عدم تطابق	۳	۰/۱۹	۴/۶۲۹×۱۰ ^{-۳}	۰/۸۳	۰/۰۵۴۱۳ <
خطای خالص	۴	۰/۰۲۳	۵/۶۳۰×۱۰ ^{-۳}		
کل	۱۶	۳۷۰/۳۸			

جدول ۳. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر زمان، دما و درصد حلال بر فعالیت آنی اکسیدانی عصاره بربرین

منابع	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F-value	p-value
مدل	۹	۶۶۲/۹۱	۷۳/۶۶	۱۵۶/۱۴	< ۰/۰۰۰۱
زمان-A	۱	۴۰۵/۳۴	۴۰۵/۳۴	۸۵۹/۲۸	< ۰/۰۰۰۱
دما-B	۱	۶۵/۴۱	۶۵/۴۱	۱۳۸/۶۶	< ۰/۰۰۰۱
درصد حلال-C	۱	۹۰/۱۳	۹۰/۱۳	۱۹۱/۰۶	< ۰/۰۰۰۱
AB	۱	۹/۹۳	۹/۹۳	۲۱/۰۴	۰/۰۰۲۵
AC	۱	۲۵/۴۲	۲۵/۴۲	۵۳/۸۹	< ۰/۰۰۰۱
BC	۱	۵۷/۷۸	۵۷/۷۸	۱۲۲/۴۸	۰/۰۲۸۱
A ²	۱	۳/۵۹	۳/۵۹	۷/۶۱	۰/۲۲۲۵
B ²	۱	۰/۸۵	۰/۸۵	۱/۷۹	۰/۰۲۷۵
C ²	۱	۳/۶۳	۳/۶۳	۷/۷۰	
باقیمانده ها	۷	۳/۳۰	۰/۴۷		
عدم تطابق	۳	۲/۰۹	۰/۷۰	۲/۳۱	۰/۲۱۸
خطای خالص	۴	۱/۲۱	۰/۳۰		
کل	۱۶	۶۶۶/۲۱			

ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول بربرین: تصاویر

میکروسکوپی میکروکپسول‌های مرطوب ژلاتین/کتیرا با سه نسبت ۱:۱، ۲:۱ و ۱:۲ در شکل ۳ الف و بازده و کارایی ریز-پوشانی، حلالیت و اندازه ذرات میکروکپسول در جدول ۴ نشان داده شده است.

بیشترین میزان بازده در نمونه با نسبت ۱:۲ پروتئین/پلی ساکارید و حدود ۹۵٪ می‌باشد. میزان کارایی معادل (۹۵±۱) بدست آمده که در سه نمونه تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. بنابراین این فاکتور در نمونه‌های مرطوب به نسبت پروتئین/پلی ساکارید بستگی ندارد. نمونه میکروکپسول‌هایی که با نسبت ۲:۱

پروتئین/پلی ساکارید تهیه شده اند در مقایسه با سایر نمونه‌ها حلالیت در آب بیشتری (۰/۵±۱۰) و نمونه‌های با نسبت ۱:۱ و ۱:۲ پروتئین/پلی ساکارید تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. در هر سه نمونه Span دهند و دارای مقدار حدود ۲٪ می‌باشند. در D[4,3] میکروکپسول تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد و نمونه با نسبت ۲:۱ دارای بیشترین مقدار ۱۷۲ میکرومتر بوده و در دو نمونه دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. شکل ۳ "ب" میزان رهایش بربرین از میکروکپسول‌های مرطوب را نشان می‌دهد. بیشترین میزان رهایش به ترتیب در نسبت‌های ۱:۲، ۲:۱ و ۱:۱ مشاهده گردید.

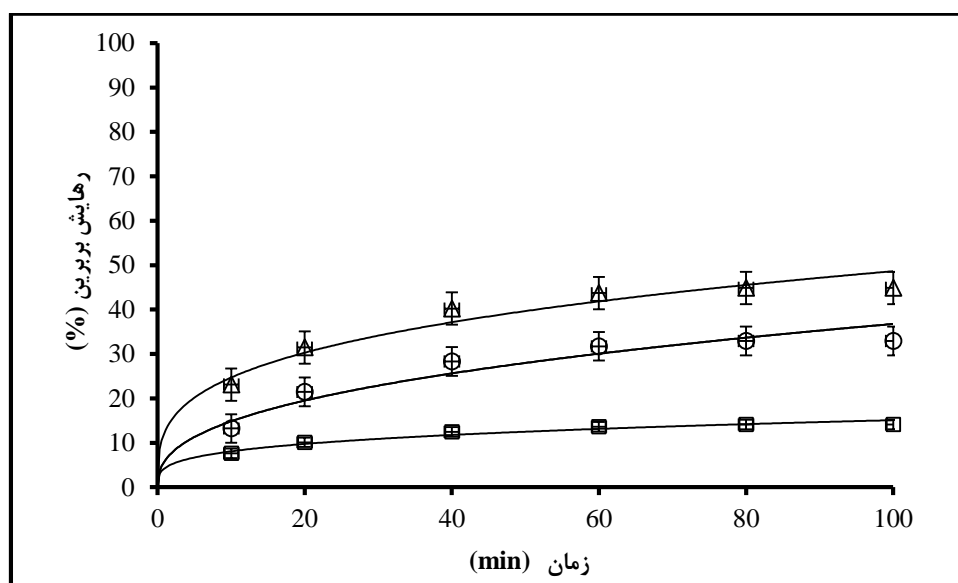
جدول ۴. مقایسه ویژگی‌های میکروکپسول‌های مرطوب تولیدی با نسبت‌های مختلف ژلاتین/کتیرا

D[4,3]μm	Span	حلالیت (%)	کارایی (%)	بازده (%)	نسبت ژلاتین/کتیرا
۱۵۹/۳۴±۲/۱۶ ^b	۱/۶۰±۰/۳۱ ^a	۲/۰۰±۰/۰۱ ^b	۹۶/۹۰±۱/۲۱ ^a	۸۰/۷۶±۰/۳۱ ^c	۱:۱
۱۷۲/۳۱±۳/۳۴ ^a	۱/۶۵±۰/۴۵ ^a	۲/۰۰±۰/۰۲ ^b	۹۵/۱۰±۱/۳۲ ^a	۹۵/۱۰±۰/۴۵ ^a	۱:۲
۱۵۸/۱۲±۲/۲۱ ^b	۱/۷۱±۰/۶۲ ^a	۱۰/۰۰±۰/۰۵ ^a	۹۶/۸۹±۱/۳۴ ^a	۸۵/۷۳±۰/۶۲ ^b	۲:۱

Span: میزان پراکندگی ذرات حول میانگین، D [4, 3]: میانگین حجمی قطر ذرات



شکل ۳ الف. تصاویر میکروسکوپ نوری میکروکپسول‌های مرطوب با نسبت پروتئین/پلی ساکارید (A) ۱:۱، (B) ۱:۲ و (C) ۲:۱



شکل ۳ ب. روند رهایش بربرین از کپسول مرطوب در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد، □: الف، Δ: ب، ○: ج

• بحث

بهینه سازی استخراج بربرین و فعالیت آنتی اکسیدانی

آن: با توجه به داده ها در جدول ۱، کمترین میزان بربرین در نمونه های ۸، ۱۴، ۱۶ و ۱۷ مشاهده می شود درحالی که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره ها قابل توجه است. ترکیب بربرین به عنوان یک ترکیب آلکالوئیدی در اتانول بخوبی حل می شود. بر طبق نتایج حاصله با کاهش میزان اتانول و افزایش درصد آب میزان راندمان استخراج ترکیب بربرین کاهش یافته است اما نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی این روند کاهشی را نشان نداده است. لذا بنظر می رسد در عصاره زرشک علاوه بر بربرین ترکیبات آنتی اکسیدانی دیگری نیز وجود دارد که محلول در آب هستند (۲۴، ۲۳). میزان استخراج و فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین به شرایط آزمون وابسته است که براساس نتایج این تحقیق مهم ترین آنها درصد اتانول بوده است (۱۷، ۴). ترکیبات فعالی مانند آلکالوئید قطبی بربرین، در حلال های قطبی مانند متانول و اتانول محلول هستند و افزایش درصد حلال سبب تسریع استخراج مواد مؤثره و کاهش زمان عملیات می شود (۲۷-۲۵). استفاده از دمای بالای حدود 50°C نقش مثبتی را در استخراج بربرین به عهده دارد که افزایش استخراج را می توان به دلیل تضعیف بافت گیاهی و تسهیل استخراج ماده مؤثره نسبت داد (۲۶، ۲۵). نکته حائز اهمیت در نتایج این است که در دما و درصد حلال کم، زمانی که زمان فرآیند از ۵/۰ به ۲۴ ساعت میرسد، کاهش قابل توجه در راندمان استخراج مشاهده می شود. این موضوع را می توان به ماهیت

بربرین به عنوان یک ترکیب آلکالوئید پروتو بربرینی مربوط دانست که در حلال اتانول محلول است و با گذشت زمان طولانی در این محیط تجزیه می شود (۲۸، ۲). البته با افزایش درصد حلال اتانول تا ۷۵٪، میزان استخراج بربرین در دمای ۵ درجه سانتیگراد بهبود یافته که دلیل آن را می توان به نقش حفاظتی اتانول برای بربرین و جلوگیری از تجزیه شدن آن نسبت داد (۲). استفاده از زمان استخراج طولانی تر با کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی نیز همراه است که به حساسیت ترکیب فعال بربرین در برابر آسیب های محیطی همچون اکسیژن و نور مربوط می شود. چراکه زمان لازم را جهت انجام برهم کنش یون های اکسیژن و هیدروژن و رادیکال های آزاد در ترکیبات فعال فراهم گردیده و منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین می شود (۲۹). نکته مهم دیگر اینکه فعالیت آنتی اکسیدانی بربرین در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد (۷۶٪) حدود ۱/۳ برابر آن در دمای ۵ درجه سانتیگراد (۵۸٪) است که علت آن را می توان به کاهش میزان اکسیژن در دسترس در دماهای بالاتر مربوط دانست (۳۱، ۳۰).

ویژگی های میکرو کپسول ها: تصاویر میکروسکوپی میکرو کپسول های مرطوب با میزان پروتئین/ پلی ساکارید ۱:۱w/w، ۱:۲ و ۲:۱ نشان دهنده فرم کروی آنها با اندازه متفاوت می باشد.

بازده: با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول ۴ بازده فرایند ریزپوشانی در نمونه با نسبت ۱:۲ پروتئین/ پلی ساکارید بیشترین مقدار را نشان می دهد. در روش کمپلکس کواسترویشن به دلیل برهم کنش های الکترواستاتیک بین

اندازه ذرات: نسبت‌های متفاوت پروتئین/پلی ساکارید بر اندازه ذرات، یکنواختی و شکل میکروکپسول‌ها مؤثر است. براساس نتایج، تفاوت معنی‌داری در میزان پراکندگی ذرات حول میانگین در بین نمونه‌ها، مشاهده نشد. در حالی که اندازه ذرات میکروکپسول با نسبت ۱/۲ براساس فاکتور میانگین سطحی قطر ذرات در مقایسه با سایر نمونه‌ها مقدار کمتری را نشان می‌دهد. تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که با استفاده از نسبت ۱:۲ پروتئین/پلی ساکارید نظیر کازئین/ صمغ کتیرا و یا پروتئین آب پنیر/ صمغ آکاسیا، میکروکپسول‌های کوچک‌تر با بازدهی بیشتر تولید می‌شود (۱۱، ۹) و نتایج تحقیق حاضر نیز مؤید همین موضوع است.

میزان رهایش بر برین: بررسی رهایش بر برین از میکروکپسول‌ها نشان می‌دهد رهایش اولیه بر برین در تمام نمونه‌های میکروکپسول در زمان اولیه به صورت burst مشاهده شده و سپس به صورت آهسته و ثابت در می‌آید. رهایش به شیوه burst می‌تواند در تهیه محصولات فوری سودمند باشد زیرا رهایش اولیه بالا تأثیر آنی را ایجاد می‌کند که سپس با انتشار کندتر اما مداوم از ترکیب فعال، می‌تواند برای مدت طولانی ادامه یابد. به نظر می‌رسد مرحله سریع اولیه رهایش، عمدتاً با انحلال و انتشار ترکیب فعال واقع در مجاورت سطح و یا در سطح ریز ذرات رخ می‌دهد. دومین مرحله رهایش شامل انتشار ترکیبات فعال درگیر در قسمت داخلی ماتریس پلیمر با استفاده از کانال‌های آبی شبکه‌ای منافذ می‌باشد. تحقیقات گذشته نشان می‌دهد، پروفایل رها سازی burst اولیه در موارد زیر مشاهده می‌شود: (الف) زمانی که حلالیت ترکیب فعال زیاد است (ب) دوز بارگیری در ماتریس زیاد است (ج) پلیمر فاقد غلظت بحرانی است. نکته حائز اهمیت در تحقیق حاضر این است که با قرار گرفتن میکروکپسول‌ها در محیط آبی در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، هیدراته و متورم می‌شوند و این امر منجر به بروز آزاد سازی اولیه سریع بر برین می‌گردد (۱۱، ۹).

در مطالعه حاضر شرایط بهینه استخراج بر برین با حداکثر راندمان و ویژگی آنتی‌اکسیدانی و مناسب‌ترین روش ریزپوشانی آن با تکنیک الحاق ترکیبی با استفاده از نسبت ۱/۲ از دو بیوپلیمر بومی بررسی و تعیین گردید. به منظور بهره‌گیری از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و درمانی میکروکپسول‌های تولیدی امکان استفاده از آنها در محصولات غذایی نظیر آبمیوه‌ها در تحقیقات آینده بررسی می‌گردد.

پروتئین و پلی ساکارید، نسبت پروتئین/ پلی ساکارید بر تعادل بار سطحی بیوپلیمرها مؤثر می‌باشد. بطور کلی پروتئین ژلاتین در محیط اسیدی ($pH < pI$) ماهیت کاتیونی (بار الکتریکی مثبت) و صمغ کتیرا در این محیط ($pH < pKa$) ماهیت آنیونی (بار الکتریکی منفی) خواهد داشت. بدین ترتیب جایگاه فعال ژلاتین در pH حدود ۴ انتخابی در این تحقیق، آماده واکنش می‌باشد و می‌تواند به راحتی به زنجیره‌های کتیرا متصل شود (۱۰). با استفاده از نسبت بیشتر پروتئین به پلی ساکارید (۱:۲) و تنظیم pH، تمامی جایگاه‌های فعال و در دسترس آنیونی صمغ کتیرا و کاتیونی ژلاتین باهم واکنش داده و کمپلکس پلی‌الکترولیتی با حداکثر بازدهی حاصل می‌شود (۱۱). به علاوه زمانی که میزان پروتئین افزایش می‌یابد، آنزیم ترانس گلو تامیناز که دارای نقش آس-یل-ترانسفراز است با ایجاد اتصالات عرضی کووالانسی بین گروه ۷-کربوکسی امید از واحدهای گلو تامینی و گروه E-آمینو در واحدهای لیزین در ساختار پروتئین موجب افزایش پایداری میکروکپسول‌ها می‌گردد (۳۳، ۳۲).

کارایی: کارایی ریزپوشانی در تمام نمونه‌های مرطوب یکسان می‌باشد و نشان می‌دهد که تغییر میزان نسبت پروتئین/ پلی ساکارید در کارایی ریزپوشانی کپسول‌های مرطوب تأثیری نداشته است. دما بر باندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک مؤثر بوده و برای الحاق ترکیبی پلی‌الکترولیت‌ها ضروری است. دما یک عامل مهم در پایداری و تجمع میکروکپسول بوده و حفظ دمای کواسروات در دمای محیط (اتاق) سبب حداکثر پایداری و بارگیری ماده فعال توسط بیوپلیمرها می‌شود. یکسان بودن میزان کارایی کپسول مرطوب (تحت شرایط خشک شدن واقع نشده) می‌تواند ناشی از حفظ ثبات بار الکتریکی موجود و حداکثر فعل و انفعالات بین پلی‌الکترولیت‌ها (ژلاتین و کتیرا) در دمای محیط باشد (۳۴).

قابلیت حلالیت: از میان تیمارها، نمونه‌های میکروکپسول حاوی مقدار بیشتر کتیرا حلالیت بیشتری در آب دارند که علت آن را می‌توان به نسبت بخش محلول/ نامحلول در آب صمغ کتیرای گونه اسفراین مربوط دانست. در میان شش گونه صمغ کتیرا گونه *Astragalus rahensis* دارای نسبت بیشتری از بخش محلول/ نامحلول یعنی ۱/۳ می‌باشد (۱۴). ژلاتین پوست گاو دارای گروه‌های آلدوست می‌باشد که در آب گرم حدود ۴۰ درجه سانتیگراد حلالیت خوبی را نشان می‌دهد. در عین حال فرآیند الحاق ترکیبی پروتئین/پلی ساکارید نظیر ژلاتین/ پلی ساکارید آنیونیک، کواسروات‌های کم محلول در آب تشکیل می‌دهند (۳۵).

• References

- Ghosi Gh, 2021; The beginning of harvesting seedless barberry from the southern Khorasan; Medicinal Plants Educational- News Network, www.medplant.ir, [in persian]
- Marek R, Sečkářová P, Hulová D, Marek J, Dostál J, Sklenář V. Palmatine and berberine isolation artifacts. *Journal of Natural Products*. 2003;66(4):481-6.
- Pfoze NL, Kumar Y, Myrboh B, Bhagobaty RK, Joshi SR. In vitro antibacterial activity of alkaloid extract from stem bark of *Mahonia manipurensis* Takeda. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5(5): 61-85.
- Rahimi, N, Maskooki A, Mortazavi SA, Elhamirad AH, & Rajabzade Q. Study and optimization of berberine extraction conditions from barberry root by supercritical carbon dioxide. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2014; 3(1), 67-78.
- Thriveeni H, Ramesh Babu H. Patterns of accumulation of berberine alkaloid and chemical profiling of natural populations of *Cosciniium fenestratum* (Menispermaceae) in the Central Western Ghats, India. *Indian Journal of Natural Products and Resources (IJNPR)*[Formerly Natural Product Radiance (NPR)]. 2018;8(3):240-7.
- Belwal T, Pandey A, Bhatt ID, Rawal RS. Optimized microwave assisted extraction (MAE) of alkaloids and polyphenols from *Berberis* roots using multiple-component analysis. *Scientific Reports*. 2020;10(1):1-10.
- Rasouli Ghahroudi F, Mizani M, Rezaei K, Bameni Moghadam M. Mixed extracts of green tea and orange peel encapsulated and impregnated on black tea bag paper to be used as a functional drink. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017; 52(7):1534-42.
- Truong D-H, Nguyen DH, Ta NTA, Bui AV, Do TH, & Nguyen HC. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and in vitro anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, 2019;1-10.
- Jain A, Thakur D, Ghoshal G, Katare O, Shivhare U. Microencapsulation by complex coacervation using whey protein isolates and gum acacia: an approach to preserve the functionality and controlled release of β -carotene. *Food and Bioprocess Technology*. 2015;8(8):1635-44.
- Keshtkaran M, Mohammadifar MA, Asadi Gh. The effect of two types of Iranian gum tragacanth on some rheological, physical and sensory properties of date milk beverage. *Iranian J Nutr Sci Food Tech* 2012; 7(3):31-42[in Persian].
- Jain A, Thakur D, Ghoshal G, Katare O, Shivhare U. Characterization of microencapsulated β -carotene formed by complex coacervation using casein and gum tragacanth. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;87:101-13.
- Saffari MM, Farzi M, Emam-Djomeh Z, Moini S, Mohammadifar MA. Applying Iranian gum tragacanth to improve textural properties of maltodextrin microcapsules. *Journal of Texture Studies*. 2013;44(1):12-20.
- Ghayempour S, Montazer M. A robust friendly nano-encapsulated plant extract in hydrogel Tragacanth gum on cotton fabric through one single step in-situ synthesis and fabrication. *Cellulose*. 2016;23(4):2561-72.
- Ghorbani Gorji E, Mohammadifar MA, Ezzatpanah H, Mortazavian AR. Influence of three types of Iranian gum tragacanth on rheological properties and stabilization of fat-free Doogh, an Iranian yoghurt drink. *Iranian J Nutr Sci Food Tech* 2010; 6(2):31-42[in Persian].
- Finotelli PV, Rocha-Leão MH. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. *Enpromer*; 2005; 1-11.
- Rocha-Selmi GA, Favaro-Trindade CS, Grosso CR. Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. *Journal of Chemistry*. 2013;1-8.
- Wu J, Yu D, Sun H, Zhang Y, Zhang W, Meng F, et al. Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2015;69:68-75.
- Liu Y, Gall K, Dunn ML, Greenberg AR, Diani J. Thermomechanics of shape memory polymers: uniaxial experiments and constitutive modeling. *International Journal of Plasticity*. 2006;22(2):279-313.
- Khamtache-Abderrahim S, Lequart-Pillon M, Gontier E, Gaillard I, Pilard S, Mathiron D, et al. Isoquinoline alkaloid fractions of *Fumaria officinalis*: Characterization and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Industrial Crops and Products*. 2016;94:1001-8.
- Rocha GA, Fávoro-Trindade CS, Grosso CRF. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;90(1):37-42.
- Comunian TA, Gomez-Estaca J, Ferro-Furtado R, Conceição GJA, Moraes ICF, de Castro IA, et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*. 2016;150:319-29.
- Keshtkaran M, Mohammadifar MA, Asadi GH, Nejad RA, Balaghi S. Effect of gum tragacanth on rheological and physical properties of a flavored milk drink made with date syrup. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(8):4794-803.
- El Sayed M, Ghareeb D, Sarhan E, Khalil A. Therapeutic bio-screening of the bioactive ingredients of *Berberis vulgaris*. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 2011;5(1):63-8.
- Fatehi M, Saleh TM, Fatehi-Hassanabad Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;102(1):46-52.

25. Anuar N, Mohd Adnan AF, Saat N, Aziz N, & Mat Taha R. Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, purification, and identification of anthocyanin pigments in *Melastoma malabathricum* fruit. *The Scientific World Journal*, 2013;1-11 .
26. Cai H, Xie Z, Liu G, Sun X, Peng G, Lin B, & Liao Q. Isolation, identification and activities of natural antioxidants from *Callicarpa kwangtungensis* Chun. *PLoS one*. 2014;9, 1-14.
27. Zlotek U, Mikulska S, Nagajek M, Świeca M. The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(5):628-33.
28. Grycova L, Dostál J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*. 2007;68(2):150-75.
29. Sarraf M, Beig-babaei A and Naji-Tabasi S. Optimizing extraction of berberine and antioxidant compounds from barberry by maceration and pulsed-electric field assisted methods. *Journal of Berry Research*. 2021; 11:133-149.
30. Rodoni LM, Feuring V, Zaro MJ, Sozzi GO, Vicente AR, Arena ME. Ethylene responses and quality of antioxidant-rich stored barberry fruit (*Berberis microphylla*). *Scientia Horticulturae*. 2014;179:233-8.
31. Majeed M, Hussain AI, Chatha SA, Khosa MK, Kamal GM, Kamal MA, et al. Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2016;23(3):389-96.
32. Beirami-Serizkani F, Hojjati M, Jooyandeh H. "The effect of microbial transglutaminase enzyme and Persian gum on the characteristics of traditional kefir drink." *International Dairy Journal*. 2021;112: 104843.
33. Gharibzahedi SMT, George S, Greiner R, Estevinho BN, Fernández MJF, McClements DJ, Roohinejad SH. New Trends in the Microencapsulation of Functional Fatty Acid-Rich Oils Using Transglutaminase Catalyzed Crosslinking. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17:274-290.
34. Huang GQ, Wang HO, Wang FW, Du YL, Xiao JX. Maillard reaction in protein-polysaccharide coacervated microcapsules and its effects on microcapsule properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;1-8.
35. Farahnaky A, Zendeboodi F, Azizi R, Mesbahi Gh and Majzoobi M. Solubilization of bovine gelatin using power ultrasound: gelation without heating. *Journal of Texture Studies*. 2017; 48: 87-94.

Optimization of Berberine Extraction Conditions from Seedless Barberry and Microencapsulation of the Extract using Complex Coacervation and Gelatin/Tragacanth (*Astragalus rahensis*)

Keshkaran M¹, Mizani M^{*2}, Ebrahimzadeh Mousavi MA³, Mohammadifar MA⁴, Azizinejad R⁵

1- Ph.D Student, Dept. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- *Corresponding author: Associate Professor, Dept. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. E-mail: m.mizani@srbiau.ac.ir

3- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Bio-system Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4- Associate Prof, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark

5- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 1 Jun, 2021

Accepted 14 Sept, 2021

Background and Objectives: *Berberis vulgaris*, an Iranian native plant, includes valuable compounds such as berberine with therapeutic, health-promoting and nutritional effects. However, major parts of this plant are discarded as wastes. The major aims of this study were optimization of berberine extraction conditions from the whole plant with maximum antioxidant activity, the extract microencapsulation using complex coacervation and two biopolymer gelatin/flake tragacanth (*Astragalus rahensis*) and analysis of the physical characteristics of the moist microcapsules.

Materials & Methods: Berberine extraction was optimized using response surface methodology based on three extraction parameters of time, temperature and solvent:water ratio at three levels and five central points. The berberine concentration was analyzed using high-performance liquid chromatography and its antioxidant activity was studied to investigate the optimized conditions. The optimum extract was microencapsulated using complex coacervation and gelatin/tragacanth with three ratios of 1:1, 2:1 and 1:2 w/w. Furthermore, yield, efficiency, particle size, solubility and the microstructural and release characteristics of the wet microcapsules were characterized.

Results: Optimized extraction conditions with 0.88 desirability included 0.5 h, 22.9 °C and 75% solvent:water ratio. The average surface size of the microcapsules was in the range of 71.31–90.15 µm. Samples with 2:1 ratio indicated the maximum yield 95.1 and sample with 2:1 ratio showed the maximum solubility of 10%. Efficiency in all samples were similarly 96% ±1.

Conclusion: Complex coacervation using gelatin/tragacanth with a ratio of 1:2 was developed to produce wet microcapsules of the optimum extract of berberine with the highest yield and efficiency and low solubility as well as particle sizes of smaller than 100 µm.

Keywords: Berberine extract, Antioxidant activity, Microencapsulation, Wet microcapsules, Yield, Efficiency, Solubility