

درون پوشانی آلفا-توکوفرول به روش قالب گیری امولسیون با استفاده از ذرات امولسیون هیدروژل پروتئین آب پنیر و یوتا کاراگینان

آزاده صیادی¹، آرام بستان^{1*}، رسول کدخدایی¹

۱- گروه نانوفناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول (a.bostan@rifst.ac.ir)

چکیده

در پژوهش حاضر از ذرات امولسیون هیدروژل ساخته شده به روش قالب گیری امولسیون برای درون پوشانی آلفا-توکوفرول استفاده شد. برای ساخت ذرات میکروژل به عنوان قالب از امولسیون روغن در آب در روغن استفاده شد. هدف در این پژوهش بررسی اثر جایگزینی بخشی از پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان (۰، ۰/۲ و ۰/۴ درصد وزنی-وزنی) بر ویژگی های امولسیون، ذرات هیدروژل و رهایش آلفا-توکوفرول بود. نتایج نشان داد که وارد کردن یوتا کاراگینان در فرمولاسیون باعث افزایش گرانیوی ظاهری امولسیون های اولیه شد، اندازه قطره ها از ۲/۶۹ میکرومتر در امولسیون حاوی پروتئین آب پنیر به تنهایی به ۲/۹۵ و ۲/۷۱ میکرومتر در امولسیون های حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان افزایش یافت. جایگزین کردن ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان، پتانسیل زتا را از ۴۳/۹۳- میلی ولت به ۴۶/۵۶- و ۴۶/۶۸- میلی ولت کاهش داد؛ همچنین باعث کاهش اندازه ذرات و کاهش کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول در ذرات امولسیون هیدروژل شد. وارد کردن یوتا کاراگینان به فرمولاسیون ذرات هیدروژل، میزان رهایش آلفا-توکوفرول را در شیره معده از ۳۰/۳۶ درصد در ذرات حاوی پروتئین آب پنیر به تنهایی به ۲۸/۹۰ و ۲۸/۲۲ درصد در ذرات حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان کاهش داد. نتایج این پژوهش اثبات کرد که جایگزین کردن بخشی از پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان قابلیت رهایش کنترل شده و تحویل ترکیب زیست فعال چربی دوست به روده را در ذرات امولسیون هیدروژل افزایش می دهد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۴
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

واژه های کلیدی

ریزپوشانی
مخلوط پروتئین-پلی ساکارید
میکروژل
ویتامین E
یوتا کاراگینان



مقدمه

محافظت شود و رهایش آنها در مکان های هدف بهینه سازی شود (Torres et al., 2016). طیف گسترده ای از فناوری ها برای درون پوشانی مولکول های چربی دوست مورد استفاده قرار گرفته اند مانند امولسیون ها، امولسیون ژل ها، لیپوزوم ها، میسل ها، نانوذرات و غیره هر کدام از این روش ها مزایا و معایب مختص خود را از نظر رهایش، هزینه، محافظت کنندگی، سهولت استفاده، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری دارند (McClements & Li, 2010). ذرات هیدروژل (میکروژل ها) یکی از سامانه هایی هستند که می توانند در

مولکول های چربی دوست مانند ویتامین های محلول در چربی، اسیدهای چرب و غیره چالش هایی را برای استفاده در مواد غذایی به وجود می آورند. این ترکیبات در آب محلول نیستند و در حضور اکسیژن، نور و گرما به سرعت اکسید می شوند. علاوه بر این، به دلیل ماهیت آب گریزی آنها، تحویل اکثر این ترکیبات در فیزیولوژی انسان دشوار است و به طور کلی کمتر توسط بدن جذب می شوند، زیرا فعالیت آنها حین انتقال از دهان به دستگاه گوارش کاهش می یابد؛ بنابراین نیاز است از فعالیت زیستی این ترکیبات

محیط‌های آبی از معایب این روش معرفی شد (Chuah *et al.*, 2016). Du و همکاران (۲۰۱۸) از نانوذرات کمپلکس کیتوزان و ایزوله پروتئین سویا برای درون‌پوشانی ویتامین E استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد این روش با وجود داشتن فرایند پیچیده و زمان‌بر، راندمان درون‌پوشانی بالایی دارد و نیازی به استفاده از حلال‌های آلی ندارد. در سال‌های اخیر به بررسی درون‌پوشانی هم‌زمان آلفا-توکوفرول همراه با دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان (نارنجین، رسوراترول و ویتامین C) به منظور بهبود ماندگاری آلفا-توکوفرول پرداخته شده است (Bao *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019; *al.*). هنگامی که آلفا-توکوفرول برای مصارف خوراکی درون‌پوشانی می‌شود، معمولاً هدف بهبود زیست‌دسترسی، رهایش کنترل‌شده و حفاظت مولکول زیست‌فعال از تخریب شدن در محیط دستگاه گوارش و رساندن حداکثری آن به روده کوچک (جایی که جذب می‌شود) است (Ribeiro *et al.*, 2021). از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی شواهدی به‌دست‌آمد که نشان می‌دهد کاراگینان کارایی پروتئازهای هضم‌کننده دستگاه گوارش را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند و فرایند هضم را به تأخیر می‌اندازد (David *et al.*, 2020). در این پژوهش ایزوله پروتئین آب‌پنیر به‌عنوان فاز میانی امولسیون روغن در آب در روغن در نظر گرفته شد و اثر مخلوط کردن آن با یوتا کاراگینان با هدف بهبود رهایش کنترل‌شده آلفا-توکوفرول مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در سامانه‌های مخلوط فرایند تشکیل ژل پروتئین تغییر می‌کند و ساختارهایی با بافت و ویژگی‌های متفاوت ایجاد می‌شود که تهیه آنها از ترکیب خالص پروتئینی به‌راحتی امکان‌پذیر نیست (Ainis *et al.*, 2018; Harnsilawat *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006).

ایزوله پروتئین آب‌پنیر به‌عنوان امولسیفایر و عامل ژل‌کننده در بسیاری از تحقیقات و همچنین در مقیاس تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اثر حرارت‌های بالاتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد، این پروتئین‌ها دچار تغییرات ساختاری غیرقابل‌برگشت می‌شوند؛ گروه‌های سولفیدریل و آب‌گریز آنها در معرض قرار می‌گیرند و اگر غلظت پروتئین بالاتر از غلظت بحرانی تشکیل ژل باشد، در دماهای بالا تشکیل ژل حرارتی می‌دهند (Nicolai *et al.*, 2011). پروتئین‌های آب‌پنیر تمایل به اتصال به مولکول‌های چربی‌دوست دارند و همچنین از آنها در مقابل اکسید شدن محافظت می‌کند به‌همین علت در تحقیقات بسیاری از

درون‌پوشانی کردن ترکیبات چربی‌دوست استفاده شوند (Shewan & Stokes, 2013). ذرات امولسیون میکروژل، حامل‌های هوشمندی هستند که مقادیری امولسیون درون یک ذره هیدروژل بیوپلیمیری درون‌پوشانی می‌شوند (Shewan & Stokes, 2013). قالب‌گیری امولسیون^۱ (یا امولسیون‌سازی/ژل‌کردن داخلی^۲) یکی از روش‌های تهیه ذرات امولسیون میکروژل است که توانایی کنترل اندازه ذرات را دارد. در این روش از ژل کردن فاز آبی درونی یک امولسیون آب در روغن (Chen & Subirade, 2006; Sağlam *et al.*, 2011) و یا روغن در آب در روغن (Sung *et al.*, 2015) برای تهیه ذرات هیدروژل استفاده می‌شود. در صورتی که استفاده از حلال‌های آلی را برای جداسازی ذرات میکروژل از فاز روغن خارجی حذف کرد، این تکنیک، یک روش ایمن برای ساخت ریزکره‌های مورد استفاده در فرمولاسیون غذایی مانند نوشیدنی‌های لبنی، بستنی و سالاد درسینگ‌هاست (Chen & Subirade, 2006).

در این پژوهش از آلفا-توکوفرول (ویتامین E) به‌عنوان ترکیب زیست‌فعال چربی‌دوست مدل استفاده شد تا در ذرات میکروژل درون‌پوشانی شود. آلفا-توکوفرول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، به طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و کاربردهای زیستی مربوط است اما به‌دلیل ناپایداری شیمیایی و حلالیت ضعیف آن در آب، چالش‌هایی را ایجاد می‌کند (Mirzaei & Jafarpour, 2012; Tolouie *et al.*, 2019). تاکنون از روش‌های متعددی برای درون‌پوشانی آلفا-توکوفرول استفاده شده است؛ Yenilmez و همکاران (۲۰۱۱) از روش خشک‌کن پاششی برای درون‌پوشانی آلفا-توکوفرول در کیتوزان استفاده کردند، نتایج آنها نشان داد این روش با وجود دردسترس بودن تجهیزات، صرفه اقتصادی و انعطاف‌پذیری؛ به زمان نسبتاً زیادی برای بهینه‌کردن فرایند نیاز دارد و آفت ترکیب چربی‌دوست درون‌پوشانی‌شده نسبتاً بالاست. Chuah و همکاران (۲۰۱۶) آلفا-توکوفرول را با استفاده از کلسترول در ساختار نیوزوم درون‌پوشانی کردند؛ آنها این روش را مقرون‌به‌صرفه و با پایداری شیمیایی بالا معرفی کردند سمیت سورفکتانت‌های مورد استفاده و ناپایداری در

¹ Emulsion templating

² Emulsification/internal gelation

هیدروژل به علاوه پایداری و رهائش آلفا-توکوفرول در شرایط معده و روده بررسی شد.

مواد و روش ها

ایزوله پروتئین آب پنیر با ۹۷/۵ درصد پروتئین (BiPRO) (شرکت داویسکو، ساخت آمریکا) تهیه شد. یوتا کاراگینان و سدیم آزید (شرکت سیگما آلدریچ، ساخت آلمان)، آلفا-توکوفرول استات، امولسیفایرهای توئین ۸۰ و پلی گلیسرول پلی رسینولات، هگزان، اتانول، پپسین و پانکراتین، هیدروکسید سدیم، کلرید سدیم و بافر فسفات پتاسیم با pH=۷ (شرکت آلا دین، ساخت چین)، اسید کلریدریک با درجه خلوص ۳۶ تا ۳۸ درصد (شرکت شوآلینگ، ساخت چین) و روغن آفتاب گردان خوراکی از فروشگاه محلی شهر هانگجو (ساخت چین) خریداری شد. سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از ترکیبات با درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده شدند.

ساخت محلول های بیوپلیمری

محلول ذخیره ایزوله پروتئین آب پنیر در غلظت ۳۰ درصد وزنی-وزنی تهیه شد. به این منظور مقدار مناسب از پودر ایزوله آب پنیر به همراه ۰/۰۲ درصد پودر سدیم آزید به منظور جلوگیری از فعالیت میکروبی در آب دیونیزه اضافه شد و به مدت ۲ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی (IKA، مدل C-MAG HS 7، ساخت آلمان) با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. برای آب پوشی کامل پروتئین، محلول به مدت یک شب در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

محلول ذخیره یوتا کاراگینان در غلظت ۰/۸ درصد وزنی-وزنی تهیه شد. به این منظور مقدار مناسب از پودر یوتا کاراگینان به همراه ۰/۰۲ درصد پودر سدیم آزید در آب دیونیزه اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از همزن مغناطیسی هیتردار با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه هم زده شد و برای انحلال کامل کاراگینان، هم زدن محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد ادامه یافت. برای تهیه کردن محلول های مخلوط، محلول های ذخیره حداقل ۲ ساعت قبل از مخلوط کردن از یخچال خارج گردید. محلول پروتئینی به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت و کاملاً همگن و به دمای محیط رسید. از آنجاکه محلول یوتا کاراگینان در یخچال به ژل تبدیل می شود لازم است آن را

آنها به عنوان ترکیب درون پوشانی کننده ترکیبات چربی دوست استفاده می شود (Bao et al., 2020; Egan et al., 2013; Fang et al., 2019; Feng et al., 2018; Liang et al., 2010).

کاراگینان یک پلی ساکارید خطی سولفات است که از واحدهای دی ساکاریدی تکرار شونده بتا-گالاکتوز-آلفا-انیدرو گالاکتوز تشکیل می شود. این پلی ساکارید به طور وسیعی در صنعت غذا به عنوان عامل ژل دهنده، قوام دهنده و پایدارکننده استفاده می شود. سه گروه اصلی کاراگینان عبارتند از کاپا، یوتا و لاند کاراگینان که به ترتیب دارای ۱، ۲ و ۳ گروه سولفات روی واحدهای دی ساکاریدی خود هستند. کاپا و یوتا کاراگینان توانایی تشکیل ژل در غلظت های کمتر از ۱ درصد دارند در حالی که لاند کاراگینان به علت وجود ۳ گروه سولفات در هر زیر واحد دی ساکاریدی و چگالی بالای بار منفی روی زنجیره پلی ساکارید توانایی تشکیل ژل ندارد. کاپا و یوتا کاراگینان در محلول حرارت داده شده در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی گراد آرایش فضایی آنها به حالت مارپیچ های تصادفی^۱ (ساختارهای نامنظم) درمی آید و هنگام سرد کردن محلول، آرایش آنها به مارپیچ های دوگانه^۲ (ساختارهای منظم) تغییر می کند و ژل تشکیل می دهند (Aguilar et al., 2017; Stephen & Phillips, 2006; Tari et al., 2010).

هدف این پژوهش، طراحی ذرات میکروژل نرم و جدا از هم با تغییر دادن میزان جایگزینی پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان بود که می توانند از ترکیبات چربی دوست در برابر شرایط محیطی محافظت کنند و امکان رهائش کنترل شده قطره های روغن درون پوشانی شده را طی فرایند هضم در دستگاه گوارش فراهم کنند. نتایج به دست آمده از مقاله های گوناگون نشان می دهند که بیشترین ظرفیت به دام افتادن، پایداری قطره ها و ماندگاری ماده افزودنی به طور معنی داری تحت تأثیر ساختار هم در امولسیون های ساده و هم دوگانه می باشد (Aserin, 2007; Benichou et al., 2007). بنابراین به منظور بررسی تأثیر وارد کردن یوتا کاراگینان در فرمولاسیون ذرات هیدروژل روی ویژگی های درون پوشانی و رهائش آلفا-توکوفرول از ذرات امولسیون هیدروژل، تغییرات ایجاد شده در گرانیوی بار سطحی و اندازه ذرات امولسیون ساده تعیین شدند. همچنین مورفولوژی، توزیع اندازه ذرات، کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول در ذرات امولسیون

¹ Random coil

² Double helix

مخلوط به مدت ۱ ساعت توسط همزن مغناطیسی هیتردار با ۵۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شد. امولسیون دوگانه با نسبت ۷۰:۳۰ از امولسیون اولیه:روغن فاز خارجی تهیه شد. این مخلوط با استفاده از همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه هم‌زده شد.

تولید ذرات امولسیون هیدروژل

به‌منظور تولید ذرات هیدروژل، امولسیون دوگانه به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این حالت فاز آبی حاوی پروتئین آب‌پنیر به ژل تبدیل می‌شود (Sung et al., 2015). سپس امولسیون به مدت ۲۴ ساعت قبل از سایر آزمایش‌ها در دمای محیط قرار گرفت.

شستشو، جداسازی و خشک‌کردن ذرات امولسیون هیدروژل

به‌منظور شستشو و جداسازی ذرات هیدروژل از روغن فاز خارجی، امولسیون‌های دوگانه پس از مرحله تولید ذرات امولسیون میکروژل، به نسبت ۵۰:۵۰ با محلول ۴ درصد (وزنی-وزنی) امولسیفایر توئین ۸۰ در آب، با هم مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی هم‌زده شدند. پس از آن طی سه مرحله، مخلوط در دمای حدود ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Poya Electronic، ساخت ایران) شد. پس از هر بار سانتریفیوژ، روغن رویی خارج شده و به محتویات داخل لوله سانتریفیوژ محلول توئین ۸۰ اضافه و سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی ذرات هیدروژل در آب پخش شدند و به‌منظور جدا شدن ذرات از هم به مدت ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شدند. درنهایت ذرات با استفاده از خشک‌کن انجمادی نانی (ساخت چین) (دمای ۶۸- درجه سانتی‌گراد، خلأ ۴ میلی‌متر جیوه) به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. پودر حاصل سفیدرنگ و متخلخل بود. پودرهای جمع‌آوری‌شده در ظروف پلاستیکی درب‌بسته و در دمای محیط نگهداری شدند.

بررسی گرانروی امولسیون‌های ساده

تغییرات گرانروی ظاهری در برابر سرعت برشی امولسیون‌های روغن در آب در دامنه سرعت برشی ۰/۰۱ تا ۱۰۰ (بر ثانیه) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری

به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود تا کاراگینان مجدد به‌طور کامل محلول گردد (Gładkowska-Balewicz, 2017). پس از آن محلول کاراگینان روی همزن مغناطیسی هیتردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. این دما برای جلوگیری از تغییر ساختار فضایی زنجیره‌های کاراگینان و تبدیل دوباره آن به ژل پیش از تهیه محلول‌ها انتخاب شد.

مخلوط‌های پروتئین-پلی‌ساکارید با مخلوط کردن وزن مناسب از محلول‌های ذخیره پروتئین و کاراگینان و آب دیونیزه انجام شد. غلظت کلی بیوپلیمر ۱۵ درصد و مقدار جایگزینی پروتئین با یوتا کاراگینان صفر، ۰/۲ و ۰/۴ درصد از وزن کل محلول است. pH محلول‌های بیوپلیمری حدود ۶/۸ بود و نمونه‌ها بدون تنظیم pH تهیه شدند.

ساخت امولسیون دوگانه روغن در آب در روغن

ساخت امولسیون دوگانه در دو مرحله و مطابق روش Sung و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد.

ساخت امولسیون ساده روغن در آب (مرحله اول)

برای تهیه روغن فاز داخلی حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آلفا-توکوفرول، مقدار مناسبی از آلفا-توکوفرول و روغن آفتاب‌گردان در یک ظرف شیشه‌ای با همزن مغناطیسی با سرعت ۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط شدند. تمام ظروف نمونه حاوی آلفا-توکوفرول، برای جلوگیری از تجزیه نوری آن، هنگام آماده‌سازی، تهیه و آزمون‌ها توسط فویل آلومینیومی پوشانده شدند.

امولسیون‌های اولیه با نسبت ۶۵:۳۵ فاز روغنی:فاز آبی حاوی بیوپلیمر تهیه شدند. ابتدا، محلول‌های بیوپلیمری و روغن به یکدیگر اضافه شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌منظور همگن‌سازی اولیه و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از همگن‌ساز اولتراسونیک (آی‌کا، مدل T50، ساخت آلمان) همگن شدند.

ساخت امولسیون دوگانه روغن در آب در روغن (دوم)

برای تهیه روغن فاز خارجی حاوی ۳/۵ درصد وزنی-وزنی امولسیفایر پلی‌گلیسرول پلی‌رئینولات، ابتدا مقدار مناسب از امولسیفایر وزن شد و در روغن آفتاب‌گردان ریخته شد. برای انحلال و پخش شدن کامل امولسیفایر در روغن،

ذرات و d_i قطر ذرات است. به منظور تعیین اندازه ذرات، از ذرات امولسیون هیدروژل خشک شده، یک دیسپرسیون ۱ درصد وزنی-وزنی تهیه شد. همچنین از آب مقطر به منظور محیط مناسب برای اندازه‌گیری استفاده شد.

اندازه‌گیری آلفا-توکوفرول

اندازه‌گیری آلفا-توکوفرول با استفاده از طیف‌سنج فرابنفش-مرئی (مدل 160A، شیمادزو، ساخت ژاپن) استفاده شد. برای استخراج آلفا-توکوفرول، هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر هگزان مخلوط شد و با استفاده از اولتراتوراکس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه هم‌زده شد. سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. پس از آن مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی (حاوی آلفا-توکوفرول محلول در هگزان) برداشته شد، پس از تبخیر هگزان توسط اواپراتور چرخشی (مدل R-206، ساخت چین) با سرعت ۸۵ دور در دقیقه و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه باقی‌مانده با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول مخلوط شد و برای انحلال کامل، به مدت ۱۰ دقیقه هم‌زده شد. نمونه به دست آمده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه غلظت نمونه‌ها یک سری غلظت از آلفا-توکوفرول محلول در اتانول با غلظت‌های متفاوت (۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. از معادله به دست آمده از رابطه بین میزان جذب در طول موج جذب ماکزیمم آلفا-توکوفرول (۲۹۲ نانومتر) و غلظت برای محاسبه غلظت آلفا-توکوفرول در نمونه‌ها استفاده شد.

کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول

برای محاسبه کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول از رابطه (۲) استفاده شد:

رابطه (۲)

$$\text{درصد راندمان درون پوشانی} = \frac{C_T - C_F}{C_T} \times 100$$

در رابطه (۲)، C_T و C_F عبارتند از غلظت آلفا-توکوفرول کل و غلظت آلفا-توکوفرول آزاد. برای محاسبه آلفا-توکوفرول آزاد از غلظت این ترکیب در روغن فاز خارجی استفاده می‌شود (Yoshida et al., 1999).

شد. به این منظور از رئومتر (آنتون پار، مدل MCR 302، ساخت سوئیس) مجهز به سیستم کنترل دما و ژئومتری مخروط-صفحه (CP₅₀) با گپ ۲۶۰ میکرومتر استفاده شد.

تعیین پتانسیل زتا و توزیع اندازه قطره‌های امولسیون ساده

اندازه ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از زتاسایزر (مدل nano-ZS، شرکت مالورن، ساخت انگلستان) اندازه‌گیری شدند. برای تعیین اندازه ذرات، امولسیون به نسبت ۱:۱۰۰ با آب مقطر و برای تعیین پتانسیل زتا مقداری از امولسیون به همین نسبت در بافر فسفات با pH مشابه امولسیون‌ها رقیق شدند و اندازه‌گیری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Cho & McClements, 2009).

مورفولوژی ذرات امولسیون هیدروژل

مورفولوژی ذرات با میکروسکوپ نوری (نیکون، مدل E800، ساخت ژاپن) بررسی شدند. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دوربین دیجیتال (TSDT، ساخت چین) متصل به میکروسکوپ تهیه شدند. به این منظور، پس از شستشو و جداسازی ذرات هیدروژل از روغن فاز خارجی، ذرات در آب پخش شدند. مقداری از سوسپانسیون روی لام گذاشته شد و با لامل پوشانده شده و با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر مشاهده شد.

تعیین توزیع اندازه ذرات امولسیون هیدروژل

برای تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات، ذرات هیدروژل در آب مقطر با غلظت ۱ درصد وزنی-حجمی پخش شدند. اندازه‌گیری با روش تفرق نور ایستا^۱ و با استفاده از دستگاه مستر سایزر (مالورن، مدل ۳۰۰۰، ساخت انگلستان) انجام شد. این دستگاه وابستگی زاویه‌ای شدت نور تفرق یافته از ذرات پخش شده در آب را حین هم‌زدن اندازه می‌گیرد و از تئوری مای^۲ برای تعیین توزیع اندازه ذرات استفاده می‌کند. اندازه‌گیری‌ها به عنوان قطر میانگین سطحی-وزنی (رابطه ۱) گزارش می‌شوند.

رابطه (۱)

$$d_{2,3} = \frac{\sum n_{pi} V_i d_i}{\sum n_{pi} A_i}$$

در رابطه (۱)، n_{pi} تعداد ذرات، A_i سطح ذرات، V_i حجم

^۱ Static light scattering (SLS)

^۲ Mie

روش توضیح داده شده در بخش قبل میزان آلفا-توکوفرول باقی مانده اندازه گیری شد. برای تعیین میزان کل آلفا-توکوفرول کل در ذرات میکروژل به همین روش و با استفاده از آب مقطر روغن به دام افتاده در ذرات آزاد و به روش گفته شده در بالا اندازه گیری شد.

آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح معنی داری ۹۵ درصد ($P < 0.05$) انجام گردید. برای بررسی‌های آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد. از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

ویژگی‌های امولسیون ساده (روغن در آب)

تغییرات اندازه ذرات امولسیون‌های آب در روغن در اثر وارد کردن یوتا کاراگینان به فرمولاسیون ذرات هیدروژل در جدول (۱) نشان داده شده است. با اضافه کردن ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان، اندازه ذرات قطره‌های امولسیون از ۲/۶۹ میکرومتر در امولسیون حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر به ترتیب ۲/۹۵ و ۲/۷۱ میکرومتر افزایش یافت که این تغییرات تنها برای امولسیون با ۰/۲ درصد یوتا کاراگینان معنی دار بود ($P < 0.05$)، (جدول ۱). تغییرات اندازه قطره‌های امولسیون پوشیده شده پروتئین در اثر افزودن پلی ساکاریدها به هر دو صورت کاهش (Benichou *et al.*, 2007) و افزایش (McClements, 2009) اندازه ذرات در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است. McClements (۲۰۰۹) بیان کرد اتصال پلی ساکارید به پروتئین سطح قطره‌ها و تشکیل لایه ضخیم تر اطراف قطره‌ها علت افزایش اندازه ذرات در اثر افزودن پلی ساکاریدهای آنیونی است.

بررسی پایداری و رهایش آلفا-توکوفرول در شرایط معده و روده

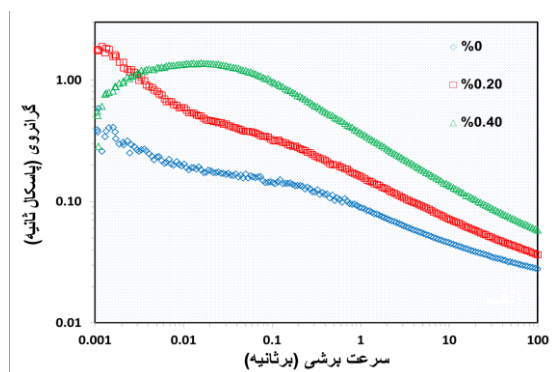
محیط شبیه سازی شده معده با pH برابر ۱/۲، شامل ۰/۳۲ درصد وزنی-حجمی پپسین و ۰/۲ گرم بر لیتر NaCl در بافر پتاسیم فسفات (۲۰ میلی مولار با pH=۷) و محیط شبیه سازی شده روده با pH برابر ۷/۵، شامل ۱ درصد وزنی-حجمی پانکراتین و ۰/۲ گرم بر لیتر NaCl در بافر پتاسیم فسفات (۲۰ میلی مولار با pH=۷) بودند. حدود ۱ گرم از ذرات امولسیون هیدروژل خشک شده به ظرف حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط شبیه سازی شده معده اضافه شد، پس از ۲ ساعت برای غیرفعال کردن پپسین، با اضافه کردن محلول سود ۲ مولار، pH محلول به ۷/۵ رسانده شد و مقدار ۲ میلی لیتر از نمونه برای اندازه گیری میزان رهایش آلفا-توکوفرول در محیط معده جدا شد. سپس محیط شبیه ساز روده با حجم برابر با نمونه هضم معده به باقی مانده نمونه اضافه شد. برای اندازه گیری میزان رهایش آلفا-توکوفرول در محیط شبیه ساز روده، پس از ۴ ساعت از آنها ۲ میلی لیتر نمونه جدا شد و در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. هضم در شرایط شبیه سازی شده معده و روده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۰۰ دور دقیقه هم زده شد. بررسی رهایش در شرایط شبیه سازی شده معده و روده طی مدت ۳۰ روز و در بازه های ۱۰ روزه مطابق با روش Liang و همکاران (۲۰۱۱) با اندکی تغییر انجام شد. پیش از آزمون رهایش در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ذرات هیدروژل، برای حذف روغن سطحی نشسته از ذرات، ابتدا با استفاده از هگزان و کاغذ صافی شستشو داده شدند و در آن تحت خلأ ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک شدند. سپس از این ذرات برای آزمون رهایش استفاده شد. برای تعیین میزان آلفا-توکوفرول کل در ذرات هیدروژل و آلفا-توکوفرول باقی مانده در نمونه حاصل از هضم در شرایط دستگاه گوارش، ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه در لوله آزمایش ریخته شد با استفاده از حمام فراصوت (دامنه نوسان ۸۰ درصد، ۲ دقیقه) گذاشته شدند سپس به

جدول ۱- تغییرات اندازه ذره و پتانسیل زتا در امولسیون‌های روغن در آب با درصد‌های متفاوت جایگزینی ایزوله پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان

مقدار جایگزین کردن یوتا کاراگینان (درصد)	پتانسیل زتا (میلی ولت)	D 3,2 (میکرومتر)
۰	$-43/93 \pm 0/78^b$	$2/69 \pm 0/08^b$
۰/۲	$-46/56 \pm 1/03^a$	$2/95 \pm 0/07^a$
۰/۴	$-46/96 \pm 0/68^a$	$2/71 \pm 0/05^b$

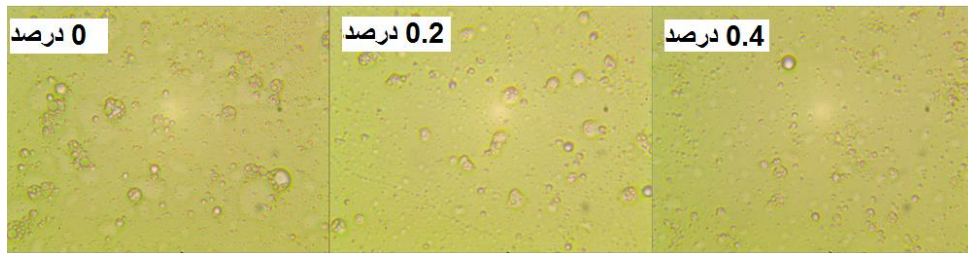
اعداد به صورت میانگین \pm انحراف معیار نمایش داده شده است. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.

هستند و با افزایش سرعت برشی، گرانروی امولسیون‌ها کاهش می‌یابد؛ همچنین با افزایش غلظت یوتا کاراگینان گرانروی امولسیون‌ها افزایش می‌یابد (شکل ۱). McClements (۲۰۰۴) بیان کرد رفتار رقیق‌شوندگی با برش در امولسیون‌های پایدارشده با پروتئین‌ها تحت تأثیر پروتئین و ساختار امولسیون است. قطره‌های امولسیون که در حالت استراحت آرایش و توزیع تصادفی و سه‌بعدی دارند، در اثر نیروی برشی منظم می‌شوند و تشکیل لایه و جریان می‌دهند. توزیع ذرات و قرارگرفتن آنها در جهت نیروی برشی باعث کاهش مقاومت به برش و کاهش ویسکوزیته می‌شود. افزایش گرانروی امولسیون‌ها در اثر اضافه‌کردن پلی‌ساکاریدها به فرمولاسیون آنها در تحقیق‌های پیشین نیز گزارش شده است (Benichou *et al.*, 2007; David *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2005). این رفتار به افزایش گرانروی فاز پیوسته امولسیون، برهم‌کنش پلی‌ساکارید موجود در فاز پیوسته با پروتئین پوشاننده سطح قطره‌های مجاور و اتصال آنها به یکدیگر نسبت داده شده است (Gu *et al.*, 2005). کاراگینان یک پلی‌ساکارید سولفات آنیونی است که بیشتر به‌عنوان یک قوام‌دهنده/ایجاد ویسکوزیته در صنعت غذا استفاده می‌شود (Phillips & Williams, 2009). همان‌طور که مشاهده شد در حضور یوتا کاراگینان اندازه ذرات افزایش یافت که این تغییر می‌تواند باعث افزایش گرانروی امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان باشد. تغییرات گرانروی امولسیون حاوی ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان در سرعت‌های برشی پایین دارای یک منطقه مسطح است که نشان می‌دهد در غلظت بالاتر یوتا کاراگینان در فاز آبی باعث تشکیل شبکه می‌شود که در سرعت‌های برشی پایین در مقابل جریان یافتن مقاومت ایجاد می‌کند (Mezger, 2014).



شکل ۱- تغییرات گرانروی امولسیون‌های روغن در آب با درصد‌های متفاوت جایگزینی ایزوله پروتئین آب‌پنیر با یوتا کاراگینان

مقدار پتانسیل زتای امولسیون‌های ساده در جدول (۱) نشان داده شده است. پتانسیل زتا نشان‌دهنده بار سطحی ذرات است؛ گروه‌های عاملی مولکول‌های موجود در سطح ذرات و یون‌های حاضر در فاز آبی که روی سطح جذب شده‌اند، پتانسیل زتا را مشخص می‌کنند. غلظت مولکول‌ها، pH، نوع نمک‌های موجود در محیط و غلظت آنها از عوامل مؤثر در مقدار پتانسیل زتا هستند. پتانسیل زتای امولسیون بدون یوتا کاراگینان حدود ۴۳- میلی‌ولت است که این را می‌توان به pH فاز آبی امولسیون‌ها (۶/۸-) نسبت داد. این مقدار بالاتر از pH ایزوالکتریک پروتئین آب‌پنیر است؛ بنابراین بار خالص پروتئین‌هایی که به سطح قطره‌های روغن جذب شده‌اند، منفی (۴۳-) است. پتانسیل زتای قطره‌ها در امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان به میزان معنی‌داری ($P < 0.05$) مقادیر منفی بزرگ‌تری را نشان می‌دهند (۴۶-). با وجود کاهش ۰/۲ و ۰/۴ درصد از غلظت پروتئین میزان بار منفی سطح قطره‌ها در امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان کاهش یافته است (جدول ۱). همان‌طور که در آزمایش‌های مربوط به مواد اولیه مشخص شد (نتایج نشان داده نشده‌اند)، یوتا کاراگینان به علت وجود گروه‌های سولفات در زیر واحدهای تکرارشونده خود، دارای پتانسیل زتای منفی بزرگ (۵۸-) می‌باشد. کاهش پتانسیل زتا در امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان نشان می‌دهد که کاراگینان به پروتئین‌های آب‌پنیر پوشاننده سطح قطره‌ها جذب شده است. همان‌طور که در تحقیق‌های پیشین گزارش شده است، کاراگینان به علت وجود گروه‌های سولفات متعدد و پتانسیل زتای منفی بزرگ به‌راحتی می‌تواند با گروه‌های مثبت سطح پروتئین (مانند گروه‌های آمین آزاد در اسیدهای آمینه بازی) در pH بالاتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین، برهم‌کنش جاذبه الکترواستاتیک برقرار کند (Dickinson & Pawlowsky, 1997). اتصال یوتا کاراگینان به سطح قطره‌های امولسیون باعث کاهش بیشتر پتانسیل زتا در امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان می‌شود. گزارش‌های مشابهی مبنی بر جاذبه الکترواستاتیک بین پلی‌ساکاریدهای با بار منفی و پروتئین‌های با بار منفی موجود در محلول، در مقاله‌ها وجود دارد (Cho & McClements, 2009; Gu *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2010). تغییرات گرانروی در مقابل سرعت برشی امولسیون‌های اولیه با مقادیر متفاوت کاراگینان در شکل (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که منحنی‌ها نشان می‌دهند، تمام امولسیون‌ها دارای رفتار رقیق‌شونده با برش



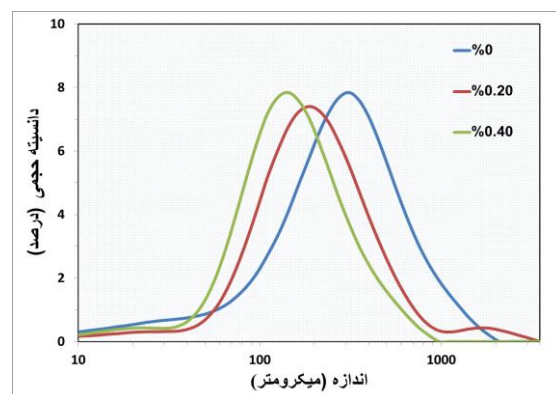
شکل ۲- مورفولوژی ذرات امولسیون میکروژل با درصدهای متفاوت جایگزینی ایزوله پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان

پس از ژل شدن فاز آبی درونی، ذرات هیدروژل کوچک تر و با دامنه توزیع اندازه ذرات کمتر تولید کردند. Chen و Subirade (۲۰۰۶) نتایج متفاوتی را در مورد تولید ذرات هیدروژل ایزوله پروتئین آب پنیر و آلژینات به دست آمده از ژل کردن فاز آبی درونی امولسیون آب در روغن به دست آوردند. مقایسه اندازه ذرات امولسیون هیدروژل با امولسیون های ساده نشان دهنده افزایش قابل توجه در میانگین قطر ذرات امولسیون میکروژل است.

تعیین کارایی درون پوشانی و رهایش آلفا-توکوفرول
نتایج اندازه گیری کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول در ذرات امولسیون میکروژل پروتئین آب پنیر به تنهایی و همراه با یوتا کاراگینان در جدول (۲) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول در ذرات میکروژل از ۷۸/۹۵ درصد در هیدروژل های پروتئین آب پنیر به تنهایی به ۷۷/۹۴ و ۷۶/۰۹ درصد با جایگزینی ۰/۲ و ۰/۴ درصد پروتئین با کاراگینان کاهش می یابد. هنگام مخلوط کردن امولسیون ساده با روغن فاز خارجی، مقداری از قطره های امولسیون روغن در آب متلاشی می شوند و مقداری از روغن فاز داخلی ممکن است به روغن فاز خارجی وارد شود (Benichou et al., 2007). به نظر می رسد ذرات با اندازه بزرگ تر راندمان درون پوشانی بیشتری دارند؛ با افزایش اندازه ذرات حجم داخلی با نسبت بیشتری افزایش می یابد و گنجایش بیشتری برای پذیرش قطره های امولسیون ساده دارد، در ذرات حاوی کاراگینان منطقی به نظر می رسد که کاهش اندازه ذرات (که باعث افزایش چشمگیر سطح به حجم می شود) دارای راندمان درون پوشانی کمتری باشند. (Hwang et al., 2005) از ذرات سیلیکاژل تهیه شده با استفاده از روش قالب گیری امولسیون برای درون پوشانی رتینول استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد اضافه کردن پلیمرهای پایدارکننده پلی وینیل پیرولیدون، پلی اتیلن

مورفولوژی و اندازه ذرات امولسیون هیدروژل

مورفولوژی ذرات امولسیون میکروژل در شکل (۲) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود ذرات امولسیون میکروژل با غلظت های متفاوت کاراگینان، شکل کروی دارند و در هر ذره میکروژل چندین گلبول به دام افتاده روغن مشاهده می شود. با توجه به شکل (۲) می توان بیان کرد پایدار ماندن امولسیون ساده هنگام مخلوط کردن آن با روغن فاز خارجی، برای درون پوشانی ترکیبات مؤثره ضروری است (Chen & Subirade, 2006). تصاویر ذرات میکروژل با مقادیر متفاوت کاراگینان نشان می دهند با افزایش مقدار کاراگینان، ذراتی جدا از هم و با اندازه کوچک تر تولید می شوند که تعداد کمتری از قطره های امولسیون ساده را در خود جای داده اند (شکل ۲). آنالیز توزیع اندازه ذرات با دستگاه مستر سائزر (شکل ۳)، توزیع اندازه ذرات تک قله ای با میانگین ۳۳۰ میکرومتر در ذرات تنها حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر و ۲۱۱ و ۱۴۴ میکرومتر در ذرات با میزان ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳- توزیع اندازه ذرات امولسیون میکروژل با درصدهای متفاوت جایگزینی ایزوله پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان

با افزایش مقدار کاراگینان توزیع اندازه ذرات دامنه کوچک تری دارد. امولسیون های ساده با گرانیوی بالاتر،

بود که با جایگزین کردن ۰/۲ و ۰/۴ درصد از پروتئین با کاراگینان این مقدار به ۱۲/۳۷ و ۱۴/۱۹ درصد افزایش یافت. در حضور یوتا کاراگینان دسترسی آنزیم های گوارشی به درون هیدروژل ها محدود می شود (Alavi et al., 2018); در نتیجه سرعت تخریب و رهایش آلفا-توکوفرول کاهش می یابد؛ بنابراین آلفا-توکوفرول متصل به مخلوط ایزوله پروتئین آب پنیر-یوتا کاراگینان باقی ماند. همان طور که در **جدول (۲)** نشان داده شده است، به طور کلی مقدار آلفا-توکوفرول در تمام فرمولاسیون ها در شیرۀ معدۀ نسبت به شیرۀ روده به ویژه برای هیدروژل تهیه شده با ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی کمتر بود. رهایش کمتر در شیرۀ معدۀ ممکن است به مقاومت پروتئین آب پنیر به پروتئولیز توسط پپسین مربوط باشد (بخصوص بتا-لاکتوگلوبولین) به علت ساختار فشرده آن در شرایط اسیدی معدۀ است (Torres et al., 2016). Chen و Subirade (۲۰۰۶) بیان کردند تأخیر هضم در شیرۀ معدۀ (pH=۲) را می توان به پروتئونه شدن گروه های آمین زنجیرۀ پروتئین و در نتیجه تورم کمتر آنها در این شرایط نسبت داد؛ همچنین پلی ساکارید با بار منفی در این شرایط گروه های با بار منفی آن خنثی شده و به حالت چروکیده باقی ماند. بنابراین در معدۀ نسبت به روده تجمع و فشردگی ساختار پروتئینی مانعی در برابر انتشار ترکیب درون پوشانی شده ایجاد می کند (Chen & Subirade, 2006). افزایش اثر محافظتی دیگر پلی ساکاریدها از پروتئولیز پروتئین در شرایط شبیه سازی شده گوارشی قبلاً در دیگر تحقیق ها نیز گزارش شده است (Chen & Subirade, 2006; David et al., 2018; Koutina et al., 2020).

آزمون رهایش آلفا-توکوفرول از ذرات میکروژل در روزهای متفاوت نگهداری در دمای محیط، روند مشابهی را در رهایش آلفا-توکوفرول در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش نشان می دهد؛ علاوه بر این، نتایج این آزمون نشان می دهد باینکه کارایی درون پوشانی آلفا-توکوفرول در ذرات هیدروژل حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر+یوتا کاراگینان کمتر از ذرات حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی است، اما در روز ۳۰ نگهداری، مقدار آلفا-توکوفرول که به روده (محل جذب آلفا-توکوفرول) می رسد (میزان رهایش آلفا-توکوفرول در روده+میزان آلفا-توکوفرول باقی مانده در شیرۀ حاصل از گوارش) به طور معنی داری ($P<0/05$) مقدار بیشتری است.

گلیکول و پلورونیک P123 برای افزایش گرانی فاز آبی نتایج متفاوتی در اندازه ذرات ایجاد کردند. اضافه کردن پلی اتیلن گلیکول مشابه با پژوهش حاضر، باعث افزایش اندازه قطره های امولسیون روغن در آب و کاهش اندازه ذرات سیلیکاژل شد. Hwang و همکاران (۲۰۰۵) تغییرات را نیز به ساختار پلیمرها و واکنش آنها با ترکیبات دیگر نسبت دادند. در پژوهش های مشابه راندمان درون پوشانی ترکیبات متفاوت در ذراتی که از خشک کردن پاششی امولسیون های آب در روغن در آب به دست آمده اند، گزارش شده است (Esfanjani et al., 2015; Mohammadi et al., 2016). فاز آبی این امولسیون ها از پروتئین آب پنیر و پلی ساکاریدهای متفاوت ساخته شده اند. گزارش ها نشان دادند افزودن پلی ساکاریدها باعث کاهش و یا افزایش اندازه ذرات می شود که به نوع برهم کنش بین پروتئین و پلی ساکارید بستگی دارد؛ اما آنچه در نتایج متعدد تکرار شد، کاهش راندمان درون پوشانی با کاهش اندازه ذرات بود. Basiri و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند راندمان درون پوشانی آلفا-توکوفرول درون نیوزومها با ترکیبات متفاوت با اندازه ذرات نیوزومها متناسب است.

میزان رهایش آلفا-توکوفرول از ذرات امولسیون میکروژل پروتئین آب پنیر به تنهایی و همراه با یوتا کاراگینان در شرایط شبیه سازی شده هضم در شیرۀ معدۀ و روده در **جدول (۲)** نشان داده شده است. پس از ۲ ساعت هضم در شیرۀ معدۀ میزان رهایش آلفا-توکوفرول در ذرات میکروژل از ۳۰/۳۶ درصد در ذرات حاوی پروتئین آب پنیر به تنهایی به ۲۸/۹۰ و ۲۸/۲۲ درصد در ذرات حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان کاهش یافت. همچنین میزان رهایش آلفا-توکوفرول در ذرات میکروژل از ۵۹/۵۱ درصد در ذرات حاوی پروتئین آب پنیر به تنهایی به ۵۸/۷۹ و ۵۷/۸۷ درصد در ذرات حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان کاهش یافت. از اواخر دهۀ ۱۹۶۰ میلادی شواهدی به دست آمد که نشان می دهد کاراگینان کارایی پروتئازهای هضم کننده دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می دهند و در فرایند پروتئولیز هضم اختلال ایجاد می کنند (David et al., 2020). از طرفی میزان آلفا-توکوفرول باقی مانده در شیرۀ حاصل از هضم در شرایط معدۀ و روده شاهدی بر اثر محافظت کنندگی کاراگینان روی پروتئین در مقابل آنزیم های پروتئاز در زمان هضم در شرایط شبیه سازی شده است؛ میزان باقی مانده آلفا-توکوفرول در ذرات میکروژل پروتئین آب پنیر به تنهایی ۱۰/۱۲ درصد

جدول ۲- کارایی درون پوشانی و رهایش آلفا-توکوفرول در مراحل مختلف هضم در ذرات با درصدهای متفاوت جایگزینی ایزوله پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان

تیمار (درصد)	روز	مقدار کل آلفا-توکوفرول موجود در ذرات (درصد)	رهایش آلفا-توکوفرول در شیره معده پس از ۱۲۰ دقیقه (درصد)	رهایش آلفا-توکوفرول در شیره روده پس از ۴ ساعت (درصد)	باقی مانده آلفا-توکوفرول در شیره حاصل از گوارش (درصد)
۰	۱	۷۸/۹۵ ± ۱/۰۱ ^a	۳۰/۳۶ ± ۰/۶۸ ^a	۵۹/۵۱ ± ۱/۸۲ ^a	۱۰/۱۲ ± ۰/۷۵ ^c
	۱۰	۷۶/۶۶ ± ۱/۳۲ ^{ab}	۳۰/۱۶ ± ۰/۹۲ ^a	۵۹/۳۰ ± ۰/۹۵ ^{ab}	۹/۸۳ ± ۰/۶۸ ^c
	۲۰	۷۵/۵۳ ± ۰/۷۸ ^{bc}	۲۹/۹۳ ± ۰/۶۴ ^a	۵۸/۹۲ ± ۰/۸۰ ^{ab}	۹/۸۹ ± ۰/۸۱ ^c
	۳۰	۷۴/۲۰ ± ۱/۱۳ ^{ce}	۳۰/۲۱ ± ۰/۷۵ ^a	۵۹/۰۰ ± ۰/۸۸ ^{ab}	۹/۷۰ ± ۰/۶۸ ^c
۰/۲	۱	۷۷/۹۴ ± ۰/۷۵ ^{ab}	۲۸/۹۰ ± ۰/۷۳ ^{ab}	۵۸/۹۰ ± ۰/۷۹ ^{ab}	۱۲/۳۷ ± ۰/۹۲ ^{ab}
	۱۰	۷۷/۴۷ ± ۰/۹۵ ^{ab}	۲۸/۲۱ ± ۱/۳۰ ^{ab}	۵۸/۶۲ ± ۰/۷۸ ^{ab}	۱۱/۹۷ ± ۰/۹۷ ^b
	۲۰	۷۶/۸۰ ± ۱/۳۲ ^{ab}	۲۸/۱۰ ± ۰/۹۷ ^b	۵۷/۸۱ ± ۰/۹۹ ^{abc}	۱۲/۱۳ ± ۱/۳۲ ^{abc}
	۳۰	۷۶/۹۱ ± ۰/۹۹ ^b	۲۷/۹۰ ± ۰/۷۸ ^b	۵۸/۲۱ ± ۰/۸۵ ^{abc}	۱۲/۶۱ ± ۱/۰۳ ^{ab}
۰/۴	۱	۷۶/۰۹ ± ۰/۸۲ ^{bc}	۲۸/۲۲ ± ۰/۸۸ ^b	۵۷/۶۶ ± ۰/۸۶ ^{bc}	۱۴/۱۹ ± ۰/۵۹ ^a
	۱۰	۷۵/۶۸ ± ۰/۹۸ ^{bc}	۲۸/۰۱ ± ۱/۳۱ ^{ab}	۵۷/۵۰ ± ۱/۰۲ ^{bc}	۱۳/۴۸ ± ۱/۱۷ ^{ab}
	۲۰	۷۵/۱۰ ± ۱/۱۲ ^{bc}	۲۸/۱۵ ± ۰/۹۰ ^b	۵۷/۸۲ ± ۰/۷۴ ^{bc}	۱۳/۵۹ ± ۰/۹۹ ^{ab}
	۳۰	۷۴/۹۱ ± ۱/۰۲ ^c	۲۷/۸۹ ± ۰/۹۷ ^b	۵۷/۱۳ ± ۰/۴۷ ^{bc}	۱۴/۰۵ ± ۰/۸۱ ^a

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است. حروف غیرمشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) می باشد.

شبیه سازی شده دستگاه گوارش را به خوبی نشان دادند. بررسی رهایش آلفا-توکوفرول در شرایط معده و روده اثبات کرد که این ذرات قابلیت رهایش کنترل شده و تحویل ترکیب زیست فعال چربی دوست به روده را دارا می باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی و دانشگاه ساراتف روسیه که انجام این پژوهش را میسر نمودند تشکر و قدردانی می کنند.

مشارکت نویسندگان

آزاده صیادی: جمع آوری داده، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها، نوشتن پیش نویس مقاله، آنالیز داده ها؛ آرام بستان: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی؛ رسول کدخدایی: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

نتایج نشان می دهند اضافه کردن یوتا کاراگینان علاوه بر اینکه با تأثیر روی آنزیم های گوارشی، فرایند پروتئولیز را به تأخیر می اندازند، با تأثیر بر ساختار درونی ذرات هیدروژل باعث ماندگاری بیشتر آلفا-توکوفرول طی مدت نگهداری می شوند و از آفت آن در مدت نگهداری ممانعت می کنند. در آزمایش های مقدماتی مشخص شده است (گزارش نشان داده نشده است) ژل های حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر+یوتا کاراگینان نسبت به ژل های حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی ساختار فشرده تری دارند؛ این تراکم بیشتر هم می تواند باعث کاهش نشت روغن از ذرات شود و هم در برابر نفوذ اکسیژن به ذرات عامل مؤثرتری باشد.

نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، ذرات امولسیون هیدروژل با استفاده از ایزوله پروتئین آب پنیر و یوتا کاراگینان و به روش قالب گیری امولسیون ساخته شدند. با جایگزین کردن مقداری از پروتئین با یوتا کاراگینان، توانایی محافظت از ترکیب چربی دوست افزایش یافت و باعث ماندگاری بیشتر آلفا-توکوفرول طی مدت ۱ ماه نگهداری می شوند. نتایج نشان دادند که سرعت رهایش آلفا-توکوفرول در شرایط معده و روده در ژل های حاوی یوتا کاراگینان کاهش یافت و این ذرات رهایش کنترل شده آلفا-توکوفرول در شرایط

منابع

- Aguilar, J. M., Cordobés, F., Raymundo, A., & Guerrero, A. (2017). Thermal gelation of mixed egg yolk/kappa-carrageenan dispersions. *Carbohydrate Polymers*, 161, 172-180. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.001>
- Ainis, W. N., Ersch, C., & Ipsen, R. (2018). Partial replacement of whey proteins by rapeseed proteins in heat-induced gelled systems: Effect of pH. *Food Hydrocolloids*, 77, 397-406. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.016>
- Alavi, F., Emam-Djomeh, Z., Yarmand, M. S., Salami, M., Momen, S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Cold gelation of curcumin loaded whey protein aggregates mixed with k-carrageenan: Impact of gel microstructure on the gastrointestinal fate of curcumin. *Food Hydrocolloids*, 85, 267-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.012>
- Aserin, A. (2007). *Multiple emulsion: technology and applications*. John Wiley & Sons.
- Bao, H., Ni, Y., Wusigale, Dong, H., & Liang, L. (2020). α -Tocopherol and resveratrol in emulsion-filled whey protein gels: Co-encapsulation and in vitro digestion. *International Dairy Journal*, 104, 104649. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104649>
- Basiri, L., Rajabzadeh, G., & Bostan, A. (2017). α -Tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behavior. *Food Chemistry*, 221, 620-628. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.129>
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). O/W/O double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 297(1), 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.10.048>
- Chen, L., & Subirade, M. (2006). Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. *Biomaterials*, 27(26), 4646-4654. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.037>
- Cho, Y. H., & McClements, D. J. (2009). Theoretical stability maps for guiding preparation of emulsions stabilized by protein-polysaccharide interfacial complexes. *Langmuir*, 25(12), 6649-6657. <https://doi.org/10.1021/la8006684>
- Chuah, L. H., De Silva, L., Saravanan, M., & Fu, J. Y. (2016). Preparation and optimization of tocotrienol rich fraction (TRF)-loaded niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 56-57. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.10.042>
- David, S., Wojciechowska, A., Portmann, R., Shpigelman, A., & Lesmes, U. (2020). The impact of food-grade carrageenans and consumer age on the in vitro proteolysis of whey proteins. *Food Research International*, 130, 108964. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108964>
- Dickinson, E., & Pawlowsky, K. (1997). Effect of ι -Carrageenan on Flocculation, Creaming, and Rheology of a Protein-Stabilized Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3799-3806. <https://doi.org/10.1021/jf970304d>
- Du, Y.-L., Huang, G.-Q., Wang, H.-O., & Xiao, J.-X. (2018). Effect of high coacervation temperature on the physicochemical properties of resultant microcapsules through induction of Maillard reaction between soybean protein isolate and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 234, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.020>
- Egan, T., Jacquier, J.-C., Rosenberg, Y., & Rosenberg, M. (2013). Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 317-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.008>
- Esfanjani, A. F., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Mohammadi, A. (2015). Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 165, 149-155. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.022>
- Fang, Z., Wusigale, Bao, H., Ni, Y., Chojijilsuren, N., & Liang, L. (2019). Partition and digestive stability of α -tocopherol and resveratrol/naringenin in whey protein isolate emulsions. *International Dairy Journal*, 93, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.01.017>
- Feng, W., Yue, C., Wusigale, Ni, Y., & Liang, L. (2018). Preparation and characterization of emulsion-filled gel beads for the encapsulation and protection of resveratrol and α -tocopherol. *Food Research International*, 108, 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.035>

- Gładkowska-Balewicz, I. (2017). *Mixed fluid gels formation, structure and rheological properties* University of Birmingham]. <https://etheses.bham.ac.uk/id/eprint/7263/1/Gladkowska-Balewicz17PhD.pdf>
- Gu, Y. S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2005). Influence of pH and carrageenan type on properties of β -lactoglobulin stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.04.016>
- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of β -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005>
- Hwang, Y.-J., Oh, C., & Oh, S.-G. (2005). Controlled release of retinol from silica particles prepared in O/W/O emulsion: The effects of surfactants and polymers. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 339-349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.05.007>
- Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., & McClements, D. J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.003>
- Koutina, G., Ray, C. A., Lametsch, R., & Ipsen, R. (2018). The effect of protein-to-alginate ratio on in vitro gastric digestion of nanoparticulated whey protein. *International Dairy Journal*, 77, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.001>
- Liang, L., Leung Sok Line, V., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2010). In vitro release of α -tocopherol from emulsion-loaded β -lactoglobulin gels. *International Dairy Journal*, 20(3), 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.09.008>
- Liang, L., Tremblay-Hébert, V., & Subirade, M. (2011). Characterisation of the β -lactoglobulin/ α -tocopherol complex and its impact on α -tocopherol stability. *Food Chemistry*, 126(3), 821-826. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.029>
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Second Edition* (2nd Edition ed.). Taylor & Francis. https://books.google.com/books?id=wTrzBPbf_WQC
- McClements, D. J. (2009). CHAPTER 4 - Biopolymers in Food Emulsions. In S. Kasapis, I. T. Norton, & J. B. Ubbink (Eds.), *Modern Biopolymer Science* (pp. 129-166). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00004-5>
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213-228. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.06.010>
- Mezger, T. G. (2014). *The Rheology Handbook* (4th Edition ed.). Vincentz Network, Hanover, Germany. <https://books.google.com/books?id=iO8-swEACAAJ>
- Mirzaei, F., & Jafarpour, S. A. (2019). Integrated Encapsulation of Fish Oil and Vitamin E with Complex Coaservation Technique and its Efficiency Optimization by Response Surface Method (RSM). *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 8(1), 53-66. <https://doi.org/10.22101/jrifst.2019.04.30.815>
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Faridi Esfanjani, A. (2016). Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC–pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 816-822. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.025>
- Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011). β -Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1945-1962. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006>
- Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2009). *Handbook of hydrocolloids* (Second Edition ed.). Elsevier.
- Ribeiro, A. M., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2021). The progress and application of vitamin E encapsulation – A review. *Food Hydrocolloids*, 121, 106998. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106998>
- Sağlam, D., Venema, P., de Vries, R., Sagis, L. M. C., & van der Linden, E. (2011). Preparation of high protein micro-particles using two-step emulsification. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1139-1148. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.10.011>

- Shewan, H. M., & Stokes, J. R. (2013). Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 781-792. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.046>
- Stephen, A. M., & Phillips, G. O. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications* (2nd Edition ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015164>
- Sung, M.-R., Xiao, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Fabrication, characterization and properties of filled hydrogel particles formed by the emulsion-template method. *Journal of Food Engineering*, 155, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.007>
- Tari, Ö., Kara, S., & Pekcan, Ö. (2010). Thermal Phase Transitions of IOTA Carrageenan in CaCl₂ Solutions: A Fluorescence Study. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 50(2), 306-318. <https://doi.org/10.1080/00222341003652286>
- Tolouie, H., Mohtadi Niya, J., Arefhosseini, S. R., & Asghari Jafarabadi, M. (2012). The effect of chitosan coating that enriched with α -tocopherol on lipid oxidation in farmed trout (*oncorhynchus mykiss*) during refrigerated storage. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 1(3), 153-164. <https://doi.org/10.22101/jrifst.2012.12.20.131>
- Torres, O., Murray, B., & Sarkar, A. (2016). Emulsion microgel particles: Novel encapsulation strategy for lipophilic molecules. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.006>
- Wang, L., Gao, Y., Li, J., Subirade, M., Song, Y., & Liang, L. (2016). Effect of resveratrol or ascorbic acid on the stability of α -tocopherol in O/W emulsions stabilized by whey protein isolate: Simultaneous encapsulation of the vitamin and the protective antioxidant. *Food Chemistry*, 196, 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.071>
- Yenilmez, E., Başaran, E., & Yazan, Y. (2011). Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 807-811. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.002>
- Yoshida, K., Sekine, T., Matsuzaki, F., Yanaki, T., & Yamaguchi, M. (1999). Stability of vitamin A in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(2), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0212-2>
- Zhang, Z., Zhang, R., Chen, L., Tong, Q., & McClements, D. J. (2015). Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, 72, 698-716. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013>

Encapsulation of α -Tocopherol by Emulsion Hydrogel Particles, Made of Whey Protein Isolate & Iota-carrageenan Applying Emulsion Templating Method

Azadeh Sayadi¹, Aram Bostan^{1*}, Rassoul Kadkhodae¹

1- Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

*Corresponding author (a.bostan@rifst.ac.ir)

Abstract

In the present study, hydrogel emulsion particles made by emulsion templating method were used in order to encapsulate α -tocopherol. An oil-in-water-in-oil emulsion was used as mold to make microgel particles. The aim of this study was to investigate the effect of partial replacement of whey protein with iota-carrageenan (0, 0.2 and 0.4 wt%) on emulsion properties, hydrogel particles and release of α -tocopherol. The results showed that the introduction of iota-carrageenan in the formulation increased the apparent viscosity of the simple emulsions, droplet size increased from 2.69 μm in emulsions containing whey protein alone to 2.95 and 2.71 μm in emulsions containing 0.2 and 0.4 of iota-carrageenan. Replacing 0.2 and 0.4% of iota-carrageenan reduced the zeta potential from -43.93 mV to -46.56 and -46.68 mV, respectively. The introduction of iota-carrageenan in the formulation also reduced the particle size and reduced the encapsulation efficiency of α -tocopherol in hydrogel emulsion particles. Addition of iota-carrageenan to the formulation of hydrogel particles reduces the release rate of α -tocopherol in simulated gastric fluid from 30.36% in particles containing whey protein alone to 28.90 and 28.22% in particles containing 0.2 and 0.4% of iota-carrageenan, respectively. The results of this study showed that replacing part of the whey protein with iota-carrageenan improved the release and delivery of the lipophilic bioactive compound to the intestine in hydrogel emulsion particles.

Keywords: Micro-encapsulation, Microgel, Protein-polysaccharide mixture, Vitamin E

