

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

آزاده صیادی<sup>۱</sup>، آرام بستان<sup>۲\*</sup>، رسول کدخدایی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲- استادیار، گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۳- استاد، گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

\* نویسنده مسئول (a.bostan@rifst.ac.ir)

### چکیده

در پژوهش حاضر از ذرات امولسیون هیدرو ژل ساخته شده به روش قالب گیری امولسیونی برای درون پوشانی آلفا توکوفرول استفاده شد. برای ساخت ذرات میکرو ژل 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 هیدرو ژل و رهايش آلفا توکوفرول بود. نتایج نشان داد که وارد کردن یوتا کاراگینان در فرمولاسیون باعث افزایش گرانشی ظاهری امولسیون های اولیه شد، اندازه قطرات 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 هیدرو ژل شد. وارد کردن یوتا کاراگینان به فرمولاسیون ذرات هیدرو ژل، میزان رهايش 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 رهايش کنترل شده و تحویل ترکیب زیست فعال چربی دوست به روده را در ذرات امولسیون هیدرو ژل افزایش می دهد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

### واژه های کلیدی

میکرو ژل

مخلوط پروتئین-پلی ساکارید

ریز پوشانی

ویتامین E

### مقدمه

مولکول های چربی دوست مانند ویتامین های محلول در چربی، اسیدهای چرب و ... 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 گریزشان،

تحویل اکثر این ترکیبات در فیزیولوژی انسان دشوار است و به طور کلی کمتر توسط بدن جذب می شوند زیرا فعالیت آن ها حین انتقال از دهان به دستگاه گوارش کاهش می یابد؛ بنابراین نیاز است از فعالیت زیستی این ترکیبات محافظت شود و رهايش آن ها در مکان های هدف بهینه سازی شود (Torres, Murray, & Sarkar, 2016).

دسترس بودن تجهیزات، صرفه اقتصادی و انعطاف پذیر بودن؛ به زمان نسبتاً زیادی برای بهینه کردن فرآیند نیاز دارد و افت ترکیب چربی دوست درون پوشانی شده نسبتاً بالا است...؛ چوآه و همکاران (۲۰۱۶) آلفا توکوفرول را با استفاده از کلسترول در ساختار نیوزوم درون پوشانی کردند؛ آن‌ها این روش را مقرون به صرفه و با پایداری شیمیایی بالا معرفی کردند سمیت سورفکتانت‌های مورد استفاده و ناپایداری در محیط‌های آبی از معایب این روش معرفی شد... دو و همکاران (۲۰۱۸) از نانوذرات کمپلکس کیتوزان و ایزوله پروتئین سویا برای درون پوشانی ویتامین E استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد این روش با وجود داشتن فرآیند پیچیده و زمان بر، راندمان درون پوشانی بالایی دارد و نیازی به استفاده از حلال‌های آلی ندارد... در سال‌های اخیر به بررسی درون پوشانی هم‌زمان آلفا توکوفرول همراه با دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان (نارنجین، رسوراترول و ویتامین C) به منظور بهبود ماندگاری آلفا توکوفرول پرداخته شده ( Bao et al. 2020; Fang et al. 2019; Wang et al. 2016). هنگامی که آلفا توکوفرول برای مصارف خوراکی درون پوشانی می‌شود، معمولاً هدف بهبود زیست دسترسی، رهایش کنترل شده و حفاظت مولکول زیست فعال 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 به دست آمد که نشان می‌دهد کاراگینان کارایی پروتئازهای هضم کننده دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و فرایند هضم را به تأخیر می‌اندازد ( David et al., 2020). در این پژوهش ایزوله پروتئین آب‌پنیر به عنوان فاز میانی امولسیون روغن در آب در روغن در نظر گرفته شد و اثر مخلوط کردن آن با یوتا کاراگینان با هدف بهبود رهایش کنترل شده 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 به راحتی امکان پذیر نیست ( Ainis, Ersch, & Ipsen, 2018; Harnsilawat, Pongsawatmanit, & McClements, 2006; Zhang et al., 2015).

ایزوله پروتئین آب‌پنیر به عنوان امولسیفایر و عامل ژل کننده در بسیاری از تحقیقات و همچنین در مقیاس

طیف گسترده‌ای از فناوری‌ها برای درون پوشانی مولکول‌های چربی دوست مورد استفاده قرار گرفته‌اند مانند امولسیون‌ها، امولسیون ژل‌ها، لیپوزوم‌ها، میسل‌ها، نانو ذرات و... هر کدام از این روش‌ها مزایا و معایب مختص خود را از نظر رهایش، هزینه، محافظت‌کنندگی، سهولت استفاده، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری دارند (McClements & Li, 2010). ذرات هیدرو ژل (میکرو ژل‌ها) یکی از سامانه‌هایی هستند که می‌توانند در درون پوشانی کردن ترکیبات چربی دوست استفاده شوند (Shewan & Stokes, 2013).

ذرات امولسیون میکرو ژل، حامل‌های هوشمندی هستند که مقادیری امولسیون درون یک ذره هیدرو ژل بیوپلیمری درون پوشانی می‌شوند ( Shewan & Stokes, 2013). قالب‌گیری امولسیونی<sup>۱</sup> (و یا امولسیون سازی/ژل کردن داخلی<sup>۲</sup>) یکی از روش‌های تهیه ذرات امولسیون میکرو ژل 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; Salam et al., 2011) و یا روغن در آب در روغن (Sung et al., 2015) برای تهیه ذرات هیدرو ژل استفاده می‌شود. در صورتی که استفاده از حلال‌های آلی را برای جداسازی ذرات میکرو ژل 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 درسینگ‌ها است (Chen & Subirade, 2006).

در این پژوهش از آلفا توکوفرول (ویتامین E) به عنوان ترکیب زیست فعال چربی دوست مدل استفاده کردیم تا در ذرات میکرو ژل درون پوشانی شود. آلفا توکوفرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، به طیف گسترده‌ای از مواد غذایی و کاربردهای زیستی مربوط است اما به دلیل ناپایداری شیمیایی و حلالیت ضعیف آن در آب، چالش‌هایی را ایجاد می‌کند (میرزایی کلایی و جعفریور، ۱۳۹۸؛ طلوعی و همکاران ۱۳۹۱). تاکنون از روش‌های متعددی برای درون پوشانی آلفا توکوفرول استفاده شده است؛ ییلماز و همکاران (۲۰۱۱) از روش خشک کن پاششی برای درون پوشانی آلفا توکوفرول در کیتوزان استفاده کردند، نتایج آن‌ها نشان داد این روش با وجود در

<sup>1</sup> Emulsion templating

<sup>2</sup> Emulsification/internal gelation

کنترل شده قطرات روغن درون پوشانی شده را طی فرآیند هضم در دستگاه گوارش فراهم کنند. نتایج به دست آمده از مقالات گوناگون نشان می‌دهند که بیشترین ظرفیت به دام افتادن، پایداری قطرات و ماندگاری ماده افزودنی به طور معنی داری تحت تأثیر ساختار هم در امولسیون‌های ساده و هم دوگانه می‌باشد (Aserin, 2007; Benichou, 2007; Aserin, & Garti, 2007); بنابراین به منظور بررسی تأثیر وارد کردن یوتا کاراگینان در فرمولاسیون ذرات هیدرو ژل بر روی ویژگی‌های درون پوشانی و رهایش آلفا توکوفول از ذرات امولسیون هیدرو ژل، تغییرات ایجاد شده در گرانیوی بار سطحی و اندازه ذرات امولسیون ساده تعیین شدند. همچنین مورفولوژی، توزیع اندازه ذرات، کارایی درون پوشانی آلفا توکوفول در ذرات امولسیون هیدرو ژل بعلاوه پایداری و رهایش آلفا توکوفول در شرایط معده و روده بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

ایزوله پروتئین آب پنیر با ۹۷/۵ درصد پروتئین (BiPRO) از شرکت داویسکو (ایالات متحده آمریکا) تهیه شد. یوتا کاراگینان و سدیم آزید از شرکت سیگما آلدیج (آلمان)، آلفا توکوفول استات، امولسیفایرهای توئین ۸۰ و پلی گلیسرول پلی رسینولات، هگزان، اتانل، پپسین و پانکراتین، هیدروکسید سدیم، کلرید سدیم و بافر فسفات پتاسیم با  $\text{pH} = 7$  محصول شرکت آلدین (چین)، اسید کلریدریک با درجه خلوص ۳۶-۳۸ درصد از شرکت شوآلینگ (چین) و روغن آفتاب گردان خوراکی از فروشگاه محلی شهر هانگجو (چین) خریداری شد. سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده از ترکیبات با درجه خلوص آزمایشگاهی استفاده شدند.

#### ساخت محلول‌های 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 ریخته شد و به مدت ۲ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی 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

تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اثر حرارت‌های بالاتر از ۶۰ درجه سانتی گراد، این پروتئین‌ها دچار تغییرات ساختاری غیرقابل برگشت 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, 2011; Britten, & Schmitt, 2011). پروتئین‌های آب پنیر تمایل به اتصال به مولکول‌های چربی دوست دارند و همچنین از آن‌ها در مقابل اکسید شدن محافظت می‌کند به همین علت در تحقیقات بسیاری از آن‌ها به عنوان ترکیب درون پوشانی کننده ترکیبات چربی دوست استفاده می‌شود (Bao et al., 2020; Egan et al., 2013; Fang, 2019; Wusigale, et al., 2019; Feng et al., 2018; Liang et al., 2010).

کاراگینان یک پلی ساکارید خطی سولفات است که از واحدهای دی ساکاریدی تکرارشونده بتا-گالاکتوز-آلفا-انیدرو گالاکتوز تشکیل می‌شود. این پلی ساکارید به طور وسیعی در صنعت غذا به عنوان عامل ژل دهنده، قوام دهنده و پایدارکننده استفاده می‌شود. سه گروه اصلی کاراگینان عبارتند از کاپا، یوتا و لاند کاراگینان که به ترتیب دارای ۱، ۲ و ۳ گروه سولفات بر روی واحدهای دی ساکاریدی خود هستند. کاپا و یوتا کاراگینان توانایی تشکیل ژل در غلظت‌های کمتر از یک درصد دارند در حالی که لاند کاراگینان به علت وجود ۳ گروه سولفات در هر زیر واحد دی ساکاریدی و چگالی بالای بار منفی بر روی زنجیره پلی ساکاریدی توانایی تشکیل ژل ندارد. کاپا و یوتا کاراگینان در محلول حرارت داده شده در دمای بالاتر از ۷۰ درجه سانتی گراد آرایش فضایی‌شان به حالت مارپیچ‌های تصادفی<sup>۱</sup> (ساختارهای نامنظم) درمی‌آید و هنگام سرد کردن محلول، آرایش آن‌ها به مارپیچ‌های دوگانه<sup>۲</sup> (ساختارهای منظم) تغییر می‌کند و ژل تشکیل می‌دهند (Aguilar et al., 2017; Stephen, Philips, & Wiliams, 2006; Tari, Kara, & Pekcan, 2010).

هدف این پژوهش، طراحی ذرات میکرو ژل نرم و جدا از هم با تغییر دادن میزان جایگزینی پروتئین آب پنیر با یوتا کاراگینان بود که می‌توانند از ترکیبات چربی دوست در برابر شرایط محیطی محافظت کنند و امکان رهایش

<sup>1</sup> Random coil

<sup>2</sup> Double helix

سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به منظور همگن‌سازی اولیه و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از همگن‌ساز اولتراسونیک آی کا مدل T50 (آلمان) همگن شدند.

**مرحله دوم (ساخت امولسیون دوگانه روغن در آب در روغن)**

برای تهیه روغن فاز خارجی حاوی ۳/۵ درصد وزنی-وزنی امولسیفایر پلی گلیسرول پلی رسینولات، ابتدا مقدار مناسب از امولسیفایر وزن شد و در روغن آفتاب‌گردان ریخته شد. برای انحلال و پخش شدن کامل امولسیفایر در روغن، مخلوط به مدت یک ساعت توسط همزن مغناطیسی هیتر دار با ۵۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه هم زده شد.

امولسیون دوگانه با نسبت ۷۰:۳۰ از امولسیون اولیه: روغن فاز خارجی تهیه شد. این مخلوط با استفاده از هم زن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد.

#### تولید ذرات امولسیون هیدرو ژل

به منظور تولید ذرات هیدرو ژل، 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 هیدرو ژل**

به منظور شستشو و جداسازی ذرات هیدرو ژل از روغن فاز خارجی، امولسیون‌های دوگانه پس از مرحله تولید ذرات امولسیون میکرو ژل، به نسبت ۵۰:۵۰ با محلول ۴ درصد (وزنی-وزنی) امولسیفایر توئین ۸۰ در آب، با هم مخلوط شدند و به مدت ۱۰ دقیقه با همزن مغناطیسی هم زده شدند. پس از آن طی سه مرحله، مخلوط در دمای حدود ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ 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 هیدرو ژل در آب پخش شدند و به منظور جدا شدن ذرات از هم به مدت ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه هم زده شدند. در نهایت ذرات با استفاده از خشک‌کن

کاراگینان به همراه ۰/۰۲ درصد پودر سدیم آزید در آب دیونیزه ریخته شد. مخلوط به مدت نیم ساعت با استفاده از هم زن مغناطیسی هیتر دار 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 سانتی‌گراد ادامه یافت.

برای تهیه کردن محلول‌های مخلوط، محلول‌های ذخیره را حداقل دو ساعت قبل از یخچال خارج می‌کنیم. محلول پروتئینی را روی همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده تا کاملاً همگن شود و به دمای محیط برسد. از آنجاکه محلول یوتا کاراگینان در یخچال به ژل تبدیل می‌شود لازم است آن را به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهیم تا کاراگینان مجدد کاملاً محلول شود (Gładkowska-Balewicz, 2017). پس از آن محلول کاراگینان را روی همزن مغناطیسی هیتر دار با دمای ۵۰ درجه قرار می‌دهیم. این دما برای جلوگیری از تغییر ساختار فضایی زنجیره‌های کاراگینان و تبدیل دوباره آن به ژل پیش از تهیه محلول‌ها انتخاب شد.

مخلوط‌های پروتئین-پلی ساکارید 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 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 با گزارش (Sung et al. 2015) انجام شد.

#### مرحله اول (ساخت امولسیون ساده روغن در آب)

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 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

می‌کند. اندازه‌گیری‌ها به‌عنوان قطر میانگین سطحی-وزنی (رابطه ۱) گزارش می‌شوند.

$$d_{2,3} = \frac{\sum n_{pi} V_i d_i}{\sum n_{pi} A_i} \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن  $n_{pi}$  تعداد ذرات،  $A_i$  سطح ذرات،  $V_i$  حجم ذرات و  $d_i$  قطر ذرات است. به‌منظور تعیین اندازه ذرات، از ذرات امولسیون هیدرو ژل خشک‌شده، یک دیسپرسیون ۱٪ وزنی-وزنی تهیه شد. همچنین از آب مقطر به‌منظور محیط مناسب برای اندازه‌گیری استفاده شد.

#### اندازه‌گیری آلفا توکوفرول

اندازه‌گیری آلفا توکوفرول با استفاده از طیف‌سنج فرابنفش-مرئی استفاده شد. برای استخراج آلفا توکوفرول، هر نمونه با ۱۰ میلی‌لیتر هگزان مخلوط شد و با استفاده اولتراتوراکس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه هم زده شد. سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد. پس‌از آن مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۳۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع روپی (حاوی آلفا توکوفرول محلول در هگزان) برداشته شد، پس از تبخیر هگزان توسط اواپراتور چرخشی مدل R-206 (چین) با سرعت ۸۵ دور در دقیقه و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، نمونه باقیمانده با ۱۰ میلی‌لیتر اتانل مخلوط شد و برای انحلال کامل، به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. نمونه به‌دست‌آمده از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد و سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۲۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد.

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

#### کارایی درون‌پوشانی آلفا توکوفرول

برای محاسبه کارایی درون‌پوشانی آلفا توکوفرول از رابطه (۲) استفاده شد:

که  $C_T$  و  $C_F$  به عبارت‌اند از غلظت آلفا توکوفرول کل و غلظت آلفا توکوفرول آزاد. برای محاسبه آلفا توکوفرول

انجمادی نانبی (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 دربسته و در دمای محیط نگهداری شدند.

#### بررسی گرانیوی امولسیون‌های ساده

تغییرات گرانیوی 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 شد. به این منظور از رئومتر آنتون پار مدل MCR 302 (سوئیس) مجهز به سیستم کنترل دمای Peltier plate؛ و ژئومتری مخروط- صفحه (CP50) با گپ ۲۶۰ میکرومتر استفاده شد.

تعیین پتانسیل زتا و توزیع اندازه قطرات امولسیون ساده اندازه ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از زتاسایزر مدل nano-ZS شرکت مالورن (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 and McClements 2009).

#### مورفولوژی ذرات امولسیون هیدرو ژل

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

#### تعیین توزیع اندازه ذرات امولسیون هیدرو ژل

برای تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات، ذرات هیدرو ژل در آب مقطر با غلظت ۱ درصد وزنی-حجمی پخش شدند. اندازه‌گیری با روش تفرق نور ایستا<sup>۱</sup> و با استفاده از دستگاه مستر سایزر مالورن مدل ۳۰۰۰ (انگلستان) انجام شد. این دستگاه وابستگی زاویه‌ای شدت نور تفرق یافته از ذرات پخش‌شده در آب را حین هم زدن اندازه می‌گیرد و از تئوری مای<sup>۲</sup> برای تعیین توزیع اندازه ذرات استفاده

<sup>1</sup> Static light scattering (SLS)

<sup>2</sup> Mie

اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان کل آلفا توکوفرول کل در ذرات میکرو ژل به همین روش و با استفاده از آب مقطر روغن به دام افتاده در ذرات آزاد و به روش گفته‌شده در بالا اندازه‌گیری شد.

### آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) انجام شد. برای بررسی‌های آماری از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۶ استفاده شد. از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ برای رسم نمودارها استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### ویژگی‌های امولسیون ساده (روغن در آب)

تغییرات اندازه ذرات امولسیون‌های آب در روغن در اثر واردکردن یوتا کاراگینان به فرمولاسیون ذرات هیدرو ژل در جدول ۱ نشان داده شده است. با اضافه کردن ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان، اندازه ذرات قطرات امولسیون‌ها از ۲/۶۹ میکرومتر در امولسیون حاوی ایزوله پروتئین آب‌پنیر به ترتیب به ۲/۹۵ و ۲/۷۱ میکرومتر افزایش یافت که این تغییرات تنها برای امولسیون با ۰/۲ درصد یوتا کاراگینان معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بود (جدول ۱). تغییرات اندازه قطرات 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. مک کلمنتس (McClements, 2009) بیان کرد اتصال پلی ساکارید به پروتئین سطح قطرات و تشکیل لایه ضخیم‌تر اطراف قطرات علت افزایش اندازه ذرات در اثر افزودن پلی ساکاریدهای آنیونی است.

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 بر 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- میلی ولت است که این را می‌توان به pH فاز آبی امولسیون‌ها (۶/۸~)

آزاد از غلظت این ترکیب در روغن فاز خارجی استفاده می‌شود (Yoshida et al. 1999).

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

محیط شبیه‌سازی‌شده 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 شبیه‌سازی‌شده 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 هیدرو ژل خشک‌شده به ظرف حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط شبیه‌سازی‌شده معده اضافه شد، پس از دو ساعت برای غیرفعال کردن پپسین، با اضافه کردن محلول سود ۲ مولار، pH محلول به ۷/۵ رسانده شد و مقدار ۲ میلی‌لیتر از نمونه برای اندازه‌گیری میزان رهایش آلفا توکوفرول در محیط معده جدا شد. سپس محیط شبیه‌ساز روده با حجم برابر با نمونه هضم معده به باقیمانده نمونه اضافه شد. برای اندازه‌گیری میزان رهایش آلفا توکوفرول در محیط شبیه‌ساز روده، پس از ۴/۰ ساعت از آن‌ها ۲ میلی‌لیتر نمونه جدا شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هضم در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و روده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در سرعت هم‌زدن ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد.

بررسی رهایش در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و روده طی مدت ۳۰ روز و در بازه‌های ۱۰ روزه مطابق با روش لیانگ و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Liang, Tremblay-Hébert, & Subirade, 2011). پیش از آزمون رهایش در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ذرات هیدرو ژل، برای حذف روغن سطحی نشت کرده از ذرات، ابتدا با استفاده از هگزان و کاغذ صافی شستشو داده شدند و در آن تحت خلأ ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک شدند. سپس از این ذرات برای آزمون رهایش استفاده شد.

برای تعیین میزان آلفا توکوفرول کل در ذرات هیدرو ژل و آلفا توکوفرول باقیمانده در نمونه حاصل از هضم در شرایط دستگاه گوارش، ۱۰ میلی‌لیتر از هر نمونه در لوله‌آزمایش ریخته شد با استفاده از حمام فراصوت (دامنه نوسان ۸۰ درصد، ۲ دقیقه) گذاشته شدند سپس به روش توضیح داده شده در بخش قبل میزان آلفا توکوفرول باقیمانده

است. قطرات 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 قرار گرفتن آن‌ها در جهت نیروی برشی باعث کاهش مقاومت به برش و کاهش ویسکوزیته می‌شود (McClements, 2004).

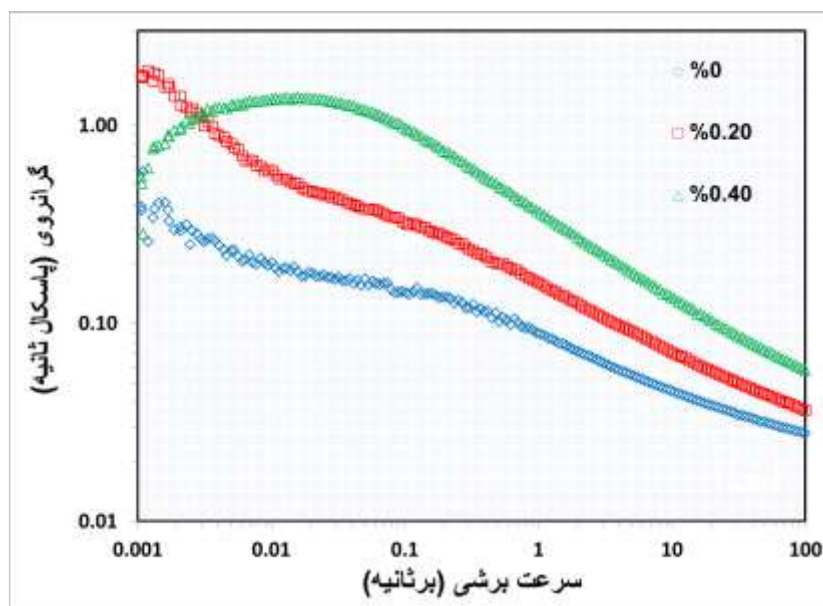
افزایش گرانیوی امولسیون‌ها در اثر اضافه کردن پلی ساکاریدها به فرمولاسیون آن‌ها در مقالات پیشین هم گزارش شده است (Benichou et al., 2007; David et al., 2005; Y. S. Gu, Decker, & McClements, 2005). این رفتار به افزایش گرانیوی فاز پیوسته امولسیون، برهمکنش پلی ساکارید موجود در فاز پیوسته با پروتئین پوشاننده سطح قطرات مجاور و اتصال آن‌ها به یکدیگر نسبت داده شده است (Gu et al., 2005). کاراگینان یک پلی ساکارید سولفات آنیونی است که عمدتاً به عنوان یک قوام دهنده/ ایجاد ویسکوزیته در صنعت غذا استفاده می‌شود (Williams & Phillips, 2016). همان‌طور که مشاهده شد در حضور یوتا کاراگینان اندازه ذرات افزایش یافت که این تغییر می‌تواند باعث افزایش گرانیوی امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان باشد. تغییرات گرانیوی 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 تشکیل شبکه داده که در سرعت‌های برشی پایین در مقابل جریان یافتن مقاومت ایجاد می‌کند (Mezger, 2014).

نسبت داد. این مقدار بالاتر از pH ایزو الکتريک پروتئین آب‌پنیر است؛ بنابراین بار خالص پروتئین‌هایی که به سطح قطرات روغن جذب شده‌اند منفی (~۴۳-) است. پتانسیل زتای قطرات 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 قطرات 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 قطرات جذب شده است. همان‌طور که در مقالات پیشین گزارش شده است، کاراگینان به علت وجود گروه‌های سولفات متعدد و پتانسیل زتای منفی بزرگ به راحتی می‌تواند با گروه‌های مثبت سطح پروتئین (مانند گروه‌های آمین آزاد در اسیدهای آمینه بازی) در pH بالاتر از نقطه ایزو الکتريک پروتئین، برهمکنش جاذبه الکترواستاتیک برقرار کند (Dickinson & Pawlowsky, 1997). اتصال یوتا کاراگینان به سطح قطرات امولسیون باعث کاهش بیشتر پتانسیل زتا در امولسیون‌های حاوی یوتا کاراگینان می‌شود. گزارش‌های مشابهی مبنی بر جاذبه الکترواستاتیک بین پلی ساکاریدهای با بار منفی و پروتئین‌های با بار منفی موجود در محلول، در مقالات وجود دارد (Cho & McClements, 2009; Y. Gu, Decker, & DJ McClements, 2005; Jones et al., 2010).

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

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

اعداد با نمای a و b متفاوت از نظر آماری تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) دارند



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

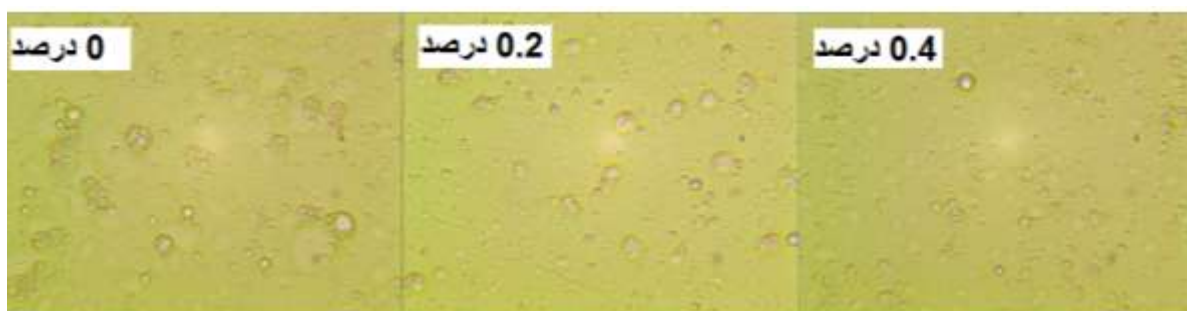
Accepted Article



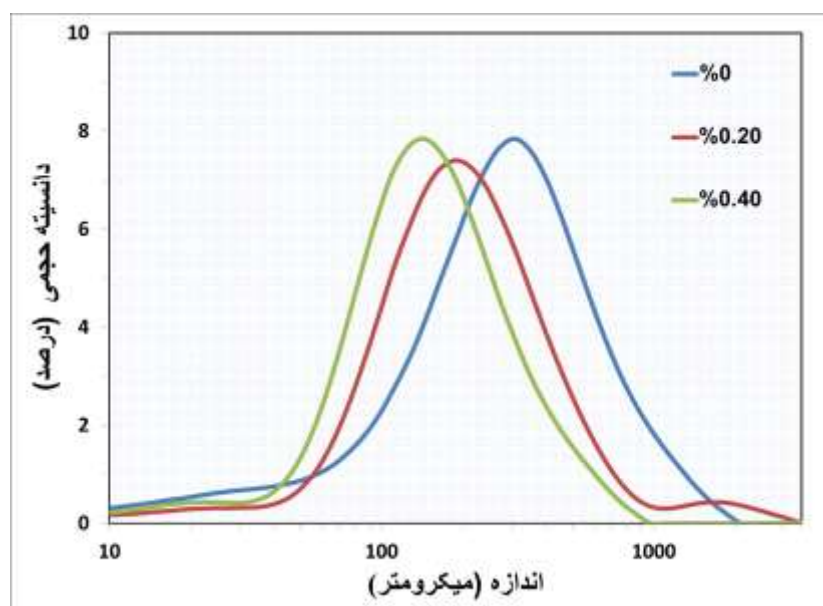
### مورفولوژی و اندازه ذرات امولسیون هیدرو ژل

مورفولوژی ذرات امولسیون میکرو ژل در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود ذرات امولسیون میکرو ژل با غلظت های متفاوت کاراگینان، شکل کروی دارند و در هر ذره میکرو ژل 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 میکرو ژل 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 قطرات امولسیون ساده را در خود جای داده اند (شکل ۲). آنالیز توزیع اندازه ذرات با دستگاه مستر سایزر (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). با افزایش مقدار کاراگینان توزیع اندازه ذرات دامنه کوچک تری دارد. امولسیون های ساده با گرانیوی بالاتر، پس از ژل شدن فاز آبی درونی، ذرات هیدرو ژل کوچک تر و با دامنه توزیع اندازه ذرات کمتر تولید کردند. چن و همکاران (Chen & Subirade, 2006) نتایج متفاوتی را در مورد تولید ذرات هیدرو ژل ایزوله پروتئین آب پنیر و آلجینات به دست آمده از ژل کردن فاز آبی درونی امولسیون آب در روغن به دست آوردند. مقایسه اندازه ذرات امولسیون هیدرو ژل با امولسیون های ساده نشان دهنده افزایش قابل توجه در میانگین قطر ذرات امولسیون میکرو ژل است.



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



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

تعیین کارایی درون پوشانی و رهایش آلفا توکوفرول

نتایج اندازه‌گیری کارایی درون‌پوشانی آلفا توکوفرول در ذرات امولسیون میکرو ژل پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی و همراه با یوتا کاراگینان در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود کارایی درون‌پوشانی آلفا توکوفرول در ذرات میکرو ژل از ۷۸/۹۵ درصد در هیدرو ژل‌های پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی به ۷۷/۹۴ و ۷۶/۰۹ درصد با جایگزینی ۰/۲ و ۰/۴ درصد پروتئین با کاراگینان کاهش می‌یابد. هنگام مخلوط کردن امولسیون ساده با روغن فاز خارجی، مقداری از قطرات امولسیون روغن در آب متلاشی می‌شوند و مقداری از روغن فاز داخلی ممکن است به روغن فاز خارجی وارد شود (Benichou et al., 2007). به نظر می‌رسد ذرات با اندازه بزرگ‌تر راندمان درون‌پوشانی بیشتری دارند؛ با افزایش اندازه ذرات حجم داخلی با نسبت بیشتری افزایش می‌یابد و گنجایش بیشتری برای پذیرش قطرات امولسیون ساده دارد، در ذرات حاوی کاراگینان منطقی به نظر می‌رسد که کاهش اندازه ذرات (که باعث افزایش چشمگیر سطح به حجم می‌شود) دارای راندمان درون‌پوشانی کمتری باشند. هوانگ و همکاران (۲۰۰۶) از ذرات سیلیکا ژل تهیه شده با استفاده از روش قالب‌گیری امولسیونی برای درون‌پوشانی رتینول استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد اضافه کردن پلیمرهای پایدارکننده پلی وینیل پیرولیدون، پلی‌اتیلن گلیکول و پلورونیک P123 برای افزایش گرانروی فاز آبی نتایج متفاوتی در اندازه ذرات ایجاد کردند. در این مقاله اضافه کردن پلی‌اتیلن گلیکول مشابه با این پژوهش، باعث افزایش اندازه قطرات امولسیون روغن در آب و کاهش اندازه ذرات سیلیکا ژل شد. آن‌ها این تغییرات را به ساختار پلیمرها و واکنش آن‌ها با ترکیبات دیگر نسبت دادند (Hwang, Oh, & Oh, 2005)؛ در پژوهش‌های مشابه (Esfanjani et al., 2015; Mohammadi et al., 2016) راندمان درون‌پوشانی ترکیبات متفاوت در ذراتی که از خشک‌کردن پاششی امولسیون‌های آب در روغن در آب به‌دست‌آمده‌اند گزارش شده است. فاز آبی این امولسیون‌ها از پروتئین آب‌پنیر و پلی ساکاریدهای متفاوت ساخته شده‌اند. گزارش‌ها نشان دادند افزودن پلی ساکاریدها باعث کاهش و یا افزایش اندازه ذرات می‌شود که به نوع برهم‌کنش بین پروتئین و پلی ساکارید بستگی دارد؛ اما آنچه در نتایج متعدد تکرار شد، کاهش راندمان درون‌پوشانی با کاهش اندازه ذرات بود. بصیری و همکاران

میزان رهایش آلفا توکوفرول از ذرات امولسیون میکرو ژل پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی و همراه با یوتا کاراگینان در شرایط شبیه‌سازی شده هضم در شیره معده و روده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. پس از دو ساعت هضم در شیره معده میزان رهایش آلفا توکوفرول در ذرات میکرو ژل از ۳۰/۳۶ درصد در ذرات حاوی پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی به ۲۸/۹۰ و ۲۸/۲۲ درصد در ذرات حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان کاهش می‌یابد. همچنین میزان رهایش آلفا توکوفرول در ذرات میکرو ژل از ۵۹/۵۱ درصد در ذرات حاوی پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی به ۵۸/۷۹ و ۵۷/۸۷ درصد در ذرات حاوی ۰/۲ و ۰/۴ درصد یوتا کاراگینان کاهش می‌یابد. از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی شواهدی به دست آمد که نشان می‌دهد کاراگینان کارایی پروتئین‌های هضم‌کننده دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در فرایند پروتئولیز هضم اختلال ایجاد می‌کنند (David et al., 2020). از طرفی میزان آلفا توکوفرول باقیمانده در شیره حاصل از هضم در شرایط معده و روده شواهدی بر اثر محافظت‌کنندگی کاراگینان بر روی پروتئین در مقابل آنزیم‌های پروتئاز در زمان هضم در شرایط شبیه‌سازی شده است؛ میزان باقیمانده آلفا توکوفرول در ذرات میکرو ژل پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی ۱۰/۱۲ درصد 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 آنزیم‌های گوارشی به درون هیدرو ژل‌ها محدود می‌شود (Alavi et al., 2018)؛ در نتیجه سرعت تخریب و رهایش آلفا توکوفرول کاهش می‌یابد؛ بنابراین آلفا توکوفرول متصل به مخلوط ایزوله پروتئین آب‌پنیر-یوتا کاراگینان باقی می‌ماند. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، به‌طور کلی مقدار آلفا توکوفرول در همه فرمولاسیون‌ها در شیره معده نسبت به شیره روده کمتر بود؛ به‌ویژه برای هیدرو ژل تهیه شده با ایزوله پروتئین آب‌پنیر به‌تنهایی. رهایش کمتر در شیره معده ممکن است به مقاومت پروتئین آب‌پنیر به پروتئولیز توسط پپسین مربوط باشد (به‌خصوص بتا لاکتوگلوبولین) به علت ساختار فشرده آن در شرایط اسیدی معده است (Torres et al.,

در ذرات هیدرو ژل حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر + یوتا کاراگینان کمتر از ذرات حاوی ایزوله پروتئین آب پنیر به تنهایی است، اما در روز ۳۰ ام نگهداری، مقدار آلفا توکوفرول (محل جذب آلفا توکوفرول) می رسد (میزان رهایش آلفا توکوفرول در روده + میزان آلفا توکوفرول باقیمانده در شیر حاصل از گوارش) به طور معنی داری ( $P < 0.05$ ) مقدار بیشتری است. نتایج نشان می دهند اضافه کردن یوتا کاراگینان علاوه بر اینکه با تأخیر بر روی آنزیم های گوارشی، فرایند پروتئولیز را به تأخیر می اندازند، با تأثیر بر ساختار درونی ذرات هیدرو ژل باعث ماندگاری بیشتر آلفا توکوفرول طی مدت نگهداری می شوند و از افت آن در این مدت 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

2016). چن و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند تأخیر در هضم در شیر معده ( $\sim \text{pH } 2$ ) را می توان به پروتونه شدن گروه های آمین زنجیره پروتئین و در نتیجه تورم کمتر آن ها 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 می ماند بنابراین در معده 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 مقالات نیز گزارش شده است (Chen & Subirade, 2006; David et al., 2020; Koutina et al., 2018).

آزمون رهایش آلفا توکوفرول از ذرات میکرو ژل 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، نتایج این آزمون نشان می دهد باینکه کارایی درون پوشانی آلفا توکوفرول

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

| تیماز | روز | مقدار کل آلفا توکوفرول موجود در ذرات % | رهایش آلفا توکوفرول در شیر معده پس از ۱۲۰ دقیقه (%) | رهایش آلفا توکوفرول در شیر روده پس از ۴ ساعت (%) | باقیمانده آلفا توکوفرول در شیر حاصل از گوارش (%) |
|-------|-----|--|---|--|--|
| ۰/۰۳۳ | ۱   | $78/95 \pm 1/01^a$                     | $30/36 \pm 0/68^a$                                  | $59/51 \pm 1/82^a$                               | $10/12 \pm 0/75^c$                               |
|       | ۱۰  | $76/66 \pm 1/32^{ab}$                  | $30/16 \pm 0/92^a$                                  | $59/30 \pm 0/95^{ab}$                            | $9/83 \pm 0/68^c$                                |
|       | ۲۰  | $75/53 \pm 0/78^{bc}$                  | $29/93 \pm 0/64^a$                                  | $58/92 \pm 0/80^{ab}$                            | $9/89 \pm 0/81^c$                                |
| ۱/۰۳۳ | ۳۰  | $74/20 \pm 1/13^{ce}$                  | $30/21 \pm 0/75^a$                                  | $59/00 \pm 0/88^{ab}$                            | $9/70 \pm 0/68^c$                                |
|       | ۱   | $77/94 \pm 0/75^{ab}$                  | $28/90 \pm 0/72^{ab}$                               | $58/90 \pm 0/79^{ab}$                            | $12/37 \pm 0/92^{ab}$                            |
|       | ۱۰  | $77/47 \pm 0/95^{ab}$                  | $28/21 \pm 1/30^{ab}$                               | $58/62 \pm 0/78^{ab}$                            | $11/97 \pm 0/97^b$                               |
| ۲/۰۳۳ | ۲۰  | $76/80 \pm 1/32^{ab}$                  | $28/10 \pm 0/97^b$                                  | $57/81 \pm 0/99^{abc}$                           | $12/13 \pm 1/32^{abc}$                           |
|       | ۳۰  | $76/91 \pm 0/99^b$                     | $27/90 \pm 0/78^b$                                  | $58/21 \pm 0/85^{abc}$                           | $12/61 \pm 1/03^{ab}$                            |
|       | ۱   | $76/09 \pm 0/82^{bc}$                  | $28/22 \pm 0/88^b$                                  | $57/66 \pm 0/86^{bc}$                            | $14/19 \pm 0/59^a$                               |
| ۳/۰۳۳ | ۱۰  | $75/68 \pm 0/98^{bc}$                  | $28/01 \pm 1/31^{ab}$                               | $57/50 \pm 1/02^{bc}$                            | $13/48 \pm 1/17^{ab}$                            |
|       | ۲۰  | $75/10 \pm 1/12^{bc}$                  | $28/15 \pm 0/90^b$                                  | $57/82 \pm 0/74^{bc}$                            | $13/59 \pm 0/99^{ab}$                            |
|       | ۳۰  | $74/91 \pm 1/02^c$                     | $27/89 \pm 0/97^b$                                  | $57/13 \pm 0/47^{bc}$                            | $14/05 \pm 0/81^a$                               |

اعداد با نمای a, b و ... متفاوت در هر ستون از نظر آماری تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) دارند

## نتیجه‌گیری

معدده و روده در ژل‌های حاوی یوتا کاراگینان کاهش یافت و این ذرات رهایش کنترل‌شده آلفا توکوفرول در شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش را به‌خوبی نشان دادند. بررسی رهایش آلفا توکوفرول در شرایط معدده و روده اثبات کرد که این ذرات قابلیت رهایش کنترل‌شده و تحویل ترکیب زیست فعال چربی‌دوست به روده را دارا می‌باشند.

در پژوهش حاضر، ذرات امولسیون هیدرو ژل با استفاده از ایزوله پروتئین آب‌پنیر و یوتا کاراگینان و به روش قالب‌گیری امولسیونی ساخته شدند. با جایگزین کردن مقداری از پروتئین با یوتا کاراگینان، توانایی محافظت از ترکیب چربی‌دوست افزایش یافت و باعث ماندگاری بیشتر آلفا توکوفرول طی مدت یک ماه نگهداری می‌شوند. نتایج نشان دادند که سرعت رهایش آلفا توکوفرول در شرایط

## منابع

- Aguilar, J. M., F. Cordobés, A. Raymundo, and A. Guerrero. 2017. "Thermal Gelation of Mixed Egg Yolk/Kappa-Carrageenan Dispersions." *Carbohydrate Polymers* 161:172–80. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.001.
- Ainis, William Nicholas, Carsten Ersch, and Richard Ipsen. 2018. "Partial Replacement of Whey Proteins by Rapeseed Proteins in Heat-Induced Gelled Systems: Effect of PH." *Food Hydrocolloids* 77:397–406. doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.10.016.
- Alavi, Farhad, Zahra Emam-djomeh, Mohammad Saeid, and Maryam Salami. 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(March):267–80. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.07.012.
- Aserin, Abraham. 2007. *Multiple Emulsion: Technology and Applications*. Vol. 1.
- Bao, Huayan, Yingzhou Ni, Wusigale, Huanhuan Dong, and Li Liang. 2020. "α-Tocopherol and Resveratrol in Emulsion-Filled Whey Protein Gels: Co-Encapsulation and in Vitro Digestion." *International Dairy Journal* 104. doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104649.
- Basiri, Ladan, Ghadir Rajabzadeh, and Aram Bostan. 2017. "α-Tocopherol-Loaded Niosome Prepared by Heating Method and Its Release Behavior." *Food Chemistry* 221(November):620–28. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.129.
- Benichou, Axel, Abraham Aserin, and Nissim Garti. 2007. "O / W / O Double Emulsions Stabilized with WPI – Polysaccharide Conjugates." 297(October 2006):211–20. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.10.048.
- Chen, Lingyun, and Muriel Subirade. 2006. "Alginate-Whey Protein Granular Microspheres as Oral Delivery Vehicles for Bioactive Compounds." *Biomaterials* 27(26):4646–54. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.037.
- Cho, Young-hee, and David Julian McClements. 2009. "Theoretical Stability Maps for Guiding Preparation of Emulsions Stabilized by Protein - Polysaccharide Interfacial Complexes." 25(20):9777–85. doi: 10.1021/la8006684.
- David, Shlomit, Aleksandra Wojciechowska, Reto Portmann, Avi Shpigelman, and Uri Lesmes. 2020. "The Impact of Food-Grade Carrageenans and Consumer Age on the in Vitro Proteolysis of Whey Proteins." *Food Research International* 130(December 2019):108964. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108964.
- Dickinson, Eric, and Karin Pawlowsky. 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. doi: 10.1021/jf970304d.
- Egan, Thelma, Jean Christophe Jacquier, Yael Rosenberg, and Moshe Rosenberg. 2013. "Cold-Set Whey Protein Microgels for the Stable Immobilization of Lipids." *Food Hydrocolloids* 31(2):317–24. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.11.008.
- Esfanjani, Afshin Faridi, Seid Mahdi Jafari, Elham Assadpoor, and Adeleh Mohammadi. 2015. "Nano-Encapsulation of Saffron Extract through Double-Layered Multiple Emulsions of Pectin and Whey Protein Concentrate." *Journal of Food Engineering* 165:149–55. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.022.
- Fang, Zheng, Wusigale, Huayan Bao, Yingzhou Ni, Narangerel Choijilsuren, and Li Liang. 2019. "Partition and

- Digestive Stability of  $\alpha$ -Tocopherol and Resveratrol/Naringenin in Whey Protein Isolate Emulsions.” *International Dairy Journal* 93:116–23. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.01.017.
- Feng, Wenwen, Chun Yue, Wusigale, Yingzhou Ni, and Li Liang. 2018. “Preparation and Characterization of Emulsion-Filled Gel Beads for the Encapsulation and Protection of Resveratrol and  $\alpha$ -Tocopherol.” *Food Research International* 108:161–71. doi: 10.1016/j.foodres.2018.03.035.
- Gładkowska-Balewicz, Izabela. 2017. “Mixed Fluid Gels Formation, Structure and Rheological Properties.” University of Birmingham.
- Gu, Yeun Suk, Eric A. Decker, and D. Julian McClements. 2005. “Influence of PH and Carrageenan Type on Properties of  $\beta$ -Lactoglobulin Stabilized Oil-in-Water Emulsions.” *Food Hydrocolloids* 19(1):83–91. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.04.016.
- Gu, YS, EA Decker, and DJ McClements. 2005. “Influence of PH and Carrageenan Type on Properties of  $\beta$ -Lactoglobulin Stabilized Oil-in-Water Emulsions.” *Food Hydrocolloids* 19:83–91.
- Harnsilawat, Thepkunya, Rungnaphar Pongsawatmanit, and D. J. McClements. 2006. “Characterization of  $\beta$ -Lactoglobulin-Sodium Alginate Interactions in Aqueous Solutions: A Calorimetry, Light Scattering, Electrophoretic Mobility and Solubility Study.” *Food Hydrocolloids* 20(5):577–85. doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.05.005.
- Hwang, Yi Jeong, Chul Oh, and Seong Geun Oh. 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):339–49. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.05.007.
- Jones, Owen G., Uri Lesmes, Paul Dubin, and David Julian. 2010. “Effect of Polysaccharide Charge on Formation and Properties of Biopolymer Nanoparticles Created by Heat Treatment of  $\beta$ -Lactoglobulin – Pectin Complexes.” *Food Hydrocolloids* 24(4):374–83. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.11.003.
- Koutina, Glykeria, Colin A. Ray, Rene Lametsch, and Richard Ipsen. 2018. “The Effect of Protein-to-Alginate Ratio on in Vitro Gastric Digestion of Nanoparticulated Whey Protein.” *International Dairy Journal* 77:10–18. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.09.001.
- Liang, Li, Valerie Leung Sok Line, Gabriel E. Remondetto, and Muriel Subirade. 2010. “In Vitro Release of  $\alpha$ -Tocopherol from Emulsion-Loaded  $\beta$ -Lactoglobulin Gels.” *International Dairy Journal* 20(3):176–81. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.09.008.
- Liang, Li, Vanessa Tremblay-Hébert, and Muriel Subirade. 2011. “Characterisation of the  $\beta$ -Lactoglobulin/ $\alpha$ -Tocopherol Complex and Its Impact on  $\alpha$ -Tocopherol Stability.” *Food Chemistry* 126(3):821–26. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.029.
- McClements, David Julian. 2004. *Food Emulsions*. second edi. New York: CRC Press.
- McClements, David Julian. 2009. “Biopolymers in Food Emulsions.” Pp. 129–66 in *Modern Biopolymer Science*. Elsevier.
- McClements, David Julian, and Yan Li. 2010. “Structured Emulsion-Based Delivery Systems: Controlling the Digestion and Release of Lipophilic Food Components.” *Advances in Colloid and Interface Science* 159(2):213–28. doi: 10.1016/j.cis.2010.06.010.
- Mezger, Thomas G. 2014. *The Rheology Handbook : 4th Edition*.
- Mohammadi, Adeleh, Seid Mahdi Jafari, Elham Assadpour, and Afshin Faridi Esfanjani. 2016. “Nano-Encapsulation of Olive Leaf Phenolic Compounds through WPC-Pectin Complexes and Evaluating Their Release Rate.” *International Journal of Biological Macromolecules* 82:816–22. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.025.
- Nicolai, Taco, Michel Britten, and Christophe Schmitt. 2011. “ $\beta$ -Lactoglobulin and WPI Aggregates: Formation, Structure and Applications.” *Food Hydrocolloids* 25(8):1945–62. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.02.006.
- Ribeiro, A. Marisa, Berta N. Estevinho, and Fernando Rocha. 2021. “The Progress and Application of Vitamin E Encapsulation – A Review.” *Food Hydrocolloids* 121(June):106998. doi: 10.1016/j.foodhyd.2021.106998.
- Sağlam, Dilek, Paul Venema, Renko de Vries, Leonard M. C. Sagis, and Erik van der Linden. 2011. “Preparation of High Protein Micro-Particles Using Two-Step Emulsification.” *Food Hydrocolloids* 25(5):1139–48. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.10.011.
- Shewan, Heather M., and Jason R. Stokes. 2013. “Review of Techniques to Manufacture Micro-Hydrogel

- Particles for the Food Industry and Their Applications.” *Journal of Food Engineering* 119(4):781–92. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.06.046.
- Stephen, Alistair M., Glyn O. Philips, and Peter A. Williams. 2006. *Food Polysaccharides and Their Applications*. second edi.
- Sung, Ming-ru, Hang Xiao, Eric Andrew, and David Julian. 2015. “Fabrication , Characterization and Properties of Filled Hydrogel Particles Formed by the Emulsion-Template Method.” *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING* 155:16–21. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.01.007.
- Tari, Özlem, Selim Kara, and Önder Pekcan. 2010. “Thermal Phase Transitions of IOTA Carrageenan in CaCl<sub>2</sub> Solutions: A Fluorescence Study.” *Journal of Macromolecular Science, Part B* 50(2):306–18. doi: 10.1080/00222341003652286.
- Torres, Ophelie, Brent Murray, and Anwasha Sarkar. 2016. “Emulsion Microgel Particles: Novel Encapsulation Strategy for Lipophilic Molecules.” *Trends in Food Science and Technology* 55:98–108. doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.006.
- Wang, Lei, Yahui Gao, Juan Li, Muriel Subirade, Yuanda Song, and Li Liang. 2016. “Effect of Resveratrol or Ascorbic Acid on the Stability of  $\alpha$ -Tocopherol in O/W Emulsions Stabilized by Whey Protein Isolate: Simultaneous Encapsulation of the Vitamin and the Protective Antioxidant.” *Food Chemistry* 196:466–74. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.071.
- Yoshida, Katsunori, Tomoko Sekine, Fumiaki Matsuzaki, Toshio Yanaki, and Michihiro Yamaguchi. 1999. “Stability of Vitamin A in Oil-In-Water-In-Oil-Type Multiple Emulsions.” 76(2).
- Zhang, Zipei, Ruojie Zhang, Long Chen, Qunyi Tong, and David Julian. 2015. “Designing Hydrogel Particles for Controlled or Targeted Release of Lipophilic Bioactive Agents in the Gastrointestinal Tract.” *EUROPEAN POLYMER JOURNAL*. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.01.013.
- میرزایی کلایی، ف. و جعفرپور، س. (۱۳۹۸). ریزپوشانی توأم روغن ماهی و ویتامین E به روش کوآسرواسیون ترکیبی و بهینه یابی کارایی آن با روش سطح پاسخ (RSM). پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۱۸ (۱)، ۵۳–۶۶. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=479488>
- طلوعی، ه. و مهتدی نیا، ج. و عارف حسینی، س. و اصغری جعفرآبادی، م. (۱۳۹۱). تاثیر پوشش کیتوزان غنی شده با آلفاتوکوفرول بر فساد اکسایشی چربی موجود در ماهی قزل آلی پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*) طی دوره یخچال گذاری. پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۱۱ (۳)، ۱۵۳–۱۶۴. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=189890>

## Encapsulation of alpha tocopherol by emulsion hydrogel particles, made of whey protein isolate & iota-carrageenan by emulsion templating method

Azadeh Sayadi<sup>1</sup>, Aram Bostan<sup>2\*</sup>, Rasoul Kadkhodae<sup>3</sup>

1- PhD. Student, Department of Food nano technology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran

2- Assistant Professor, Department of Food nano technology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran

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

3- Professor, Department of Food nano technology, Research Institute of Food Science & Technology, Mashhad, Iran

### Abstract

In the present study, hydrogel emulsion particles made by emulsion templating method were used in order to encapsulation of alpha 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 & 0.4 wt%) on emulsion properties, hydrogel particles and release of alpha 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  $\mu\text{m}$  in emulsions containing whey protein alone to 2.95 & 2.71  $\mu\text{m}$  in emulsions containing 0.2 & 4  $\mu\text{g}$ . 0.0% of iota carrageenan. Replacing 0.2% & 0.4% of iota carrageenan reduced the zeta potential from -43.93 mV to -46.46 & -46.68 mV, respectively. The introduction of iota carrageenan in the formulation also reduced the particle size and reduced the encapsulation efficiency of alpha tocopherol in hydrogel emulsion particles. Addition of iota carrageenan to the formulation of hydrogel particles reduces the release rate of alpha tocopherol in simulated gastric fluid from 30.36% in particles containing whey protein alone to 28.90% & 28.22% in particles containing 0.2% & 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:** Microgel, protein-polysaccharide mixture, micro-encapsulation, vitamin E