

ویژگی‌های رنگ، رطوبت و ریزساختار نانو کپسول‌های امگا-۳ تولید شده با استفاده از تکنیک کواسرواسیون

رحیمه اصفهانی^۱، سید علی جعفرپور^{۲*}، سید مهدی جعفری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۱۴)

چکیده

در این پژوهش نانو ریز پوشانی اسیدهای چرب امگا-۳ با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) بهینه‌سازی شد. نانو ذرات حاوی امگا-۳ توسط دیواره ژلاتین ماهی و صمغ عربی با استفاده از تکنیک کواسرواسیون تولید شدند. بر اساس نتایج حاصل از تأثیر سه متغیر مستقل غلظت ژلاتین ماهی (۰.۳۳-۰.۶۶٪)، غلظت امگا-۳ (۰.۳۰-۰.۱۰٪) و دور هموژنایزر در سه سطح (۲۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰ rpm) بر متغیرهای وابسته رطوبت، رنگ پودرهای تولیدی و ریزساختار مشخص شد. بر اساس نتایج، تغییر دور هموژنایزر بیشترین تأثیر را بر اندازه ذرات داشت. بررسی مورفولوژی پودرها نشان داد که پودرهای تولیدی دارای سطحی نسبتاً صاف و شکننده بودند و در برخی نمونه‌ها نیز تخلخل مشاهده شد. علاوه بر این، مقدار رطوبت نانو کپسول‌های خشک‌شده با خشک‌کن انجمادی در محدوده ۷/۳٪ الی ۴/۲٪ بوده و مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر رطوبت تغییرات غلظت ژلاتین ماهی بود. همچنین، با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، میزان رطوبت نانو کپسول‌ها افزایش یافت. طبق نتایج حاصل از آنالیز شاخص‌های رنگ، تغییرات غلظت ژلاتین ماهی بیشترین تأثیر را در میزان تغییرات روشنایی (L^*) پودرهای تولیدی داشت؛ به طوری که با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، روشنایی نانو کپسول‌ها کاهش و بر میزان زردی (b^*) پودرهای تولیدی افزوده شد.

کلید واژگان: امگا-۳، رنگ، ریز پوشانی، ریزساختار، ژلاتین ماهی، کواسرواسیون

*مسئول مکاتبات: a.jafarpour@sanru.ac.ir

۱- مقدمه

تمایل به استفاده از روغن‌های محصولات دریایی عمدتاً به دلیل محتوای اسیدهای چرب چند غیراشباع است. ماهی یک منبع اسید چرب امگا-۳، به‌ویژه دکوزاهگزانوئیک اسید^۱ و ایکوزاپنتانوئیک اسید^۲ بلند زنجیره است [۱]. مقدار پیشنهادی برای مصرف این اسیدهای چرب ضروری هنوز مشخص نشده و مورد بحث است و سازمان‌های بهداشتی مختلف طبق بیماری مورد نظر هر یک میزان مصرفی را پیشنهاد نموده‌اند. برای مثال، مصرف روزانه ۱۸۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم از EPA و DHA برای پیشگیری از بیماری‌های قلبی و ۱۰۰۰ میلی‌گرم از این اسیدهای چرب برای پیشگیری از بیماری‌های مغزی پیشنهاد شده است [۲].

همانند سایر روغن‌ها، ترکیب روغن ماهی در محصولات غذایی با دو چالش عمده مواجه است. اول اینکه، روغن ماهی نیز یک ترکیب غیر قطبی است که با آب سازگار نیست؛ اما تهیه آن به صورت امولسیون می‌تواند یک مکانیسم فیزیکی برابریافته کردن قطرات روغن در سامانه‌های آبی فراهم کند. امولسیون را می‌توان به‌طور مستقیم در نوشیدنی‌ها استفاده کرد و یا به‌صورت پودر برای مخلوط کردن در غذاها تهیه کرد. چالش دوم ناشی از بی‌ثباتی ساختار مولکولی PUFAs است که دارای پیوندهای دوگانه کربن-کربن چند غیراشباع حساس به اکسیداسیون هستند [۳]. روش‌های معمول برای حفاظت از روغن ماهی و به حداقل رساندن اکسیداسیون، اضافه کردن آنتی‌اکسیدان و یا ریز پوشانی^۳ آن است [۴-۶].

تکنولوژی ریز پوشانی به‌سرعت و با پتانسیل زیادی در زمینه‌های مختلف از جمله صنایع دارویی و غذایی در حال گسترش است. ریز پوشانی شامل پوشش و یا به دام انداختن یک جزء مورد نظر (به‌عنوان مثال ماده هسته‌ای) در یک ماده ثانویه (به‌عنوان مثال دیواره یا کپسول) برای پوشاندن رنگ و طعم و مزه مواد غذایی و حفاظت از مواد مغذی حساس در طول فرآوری و ذخیره‌سازی است [۷، ۸]. یک ماده دیواره

مناسب برای ریز پوشانی باید قادر باشد که مواد هسته را در ساختاری کروی پوشش داده و به‌صورت دیواره‌ای محافظ از اکسیداسیون هسته در مقابل اکسیژن ممانعت نماید. این امر سبب افزایش مدت ماندگاری مواد هسته می‌گردد [۹، ۱۰]. نانو ریز پوشانی به‌عنوان روشی برای به دام انداختن ترکیبات فعال در کپسول‌هایی در اندازه نانومتر تعریف شده است و روشی عملی و مؤثر، برای افزایش پایداری فیزیکی مواد فعال، حفاظت از آن‌ها در برابر برهم‌کنش با مواد غذایی و افزایش فعالیت زیستی آن‌ها، (به دلیل اندازه بسیار ریز آن‌ها) است [۱۱]. افزودنی‌های غذایی، مکمل‌ها و ترکیبات فعال در اندازه نانو و یا نانو ریز پوشانی شده می‌تواند توانایی پراکنده شدن مواد افزودنی محلول در چربی در محصولات غذایی، بهبود طعم غذا، توانایی ذخیره سازی مواد غذایی بهداشتی، کاهش در استفاده از چربی، نمک، شکر و مواد نگهدارنده و بهبود در جذب و فراهمی زیستی مواد مغذی و مکمل را بهبود بخشد [۱۲].

نانو ریز پوشانی روشی جدید و متداوم است که می‌تواند برای بهبود برخی از ویژگی‌های مواد زیست فعال، مانند حلالیت آبی، ذخیره‌سازی و پایداری حرارتی و ویژگی‌های حسی مختلف به کار گرفته شود. نانو ریز پوشانی همچنین در صنایع دارویی و مکمل‌های غذایی به‌منظور تحویل هدفمند، حداقل سمیت، افزایش توزیع زیستی و جذب سلولی بالاتر برخی از داروها و مواد غذایی استفاده می‌شوند [۱۳، ۱۴]. تکنیک‌های مورد استفاده برای نانو ریز پوشانی پیچیده‌تر از تکنیک‌هایی است که برای ریز پوشانی بکار برده می‌شوند. این عمدتاً به دلیل مشکل در دستیابی به مورفولوژی پیچیده‌ی کپسول‌ها و مواد هسته و نیاز به کنترل نرخ رهاپش نانو کپسول‌ها است. ماهیت فیزیکی و شیمیایی مواد هسته و پوسته، بررسی اثر متقابل و نیز نسبت آن‌ها در فرمولاسیون کپسول‌ها پارامترهای مهمی هستند که تعیین‌کننده خواص نهایی ذرات می‌باشند.

با توجه به نیاز مصرفی اسیدهای چرب امگا-۳ در زمینه غذایی و دارویی و با توجه به وجود دو دریای بزرگ در شمال و جنوب کشور، ماهیان و آبزیان موجود در آن از قبیل کیلکا و ساردین می‌توانند منبع مهمی از امگا-۳ باشند. همچنین در

1. DHA: Docosahexaenoic Acid, C22:6 n-3
2. EPA: Eicosapentaenoic acid, C20:5 n-3
3. Encapsulation

۲-۱- تهیه امولسیون

محلول‌هایی از مواد دیواره شامل ژلاتین ماهی (۱۹/۸، ۱۴/۸۵، ۹/۹ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و صمغ عربی (۲۰/۱، ۱۵/۱۵، ۱۰/۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) در آب مقطر تهیه شدند. به منظور آبیگری کامل مواد و حل شدن کامل آن‌ها، به مدت ۲۴ ساعت در بن ماری (شرکت فن آزماگستر، ایران) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نسبت مواد دیواره (ژلاتین ماهی به صمغ عربی) در سه سطح ۲:۱، ۱:۲ و ۱:۱ و درصد کل مواد جامد محلول ۳۰٪ وزنی/حجمی انتخاب شد. به منظور تهیه امولسیون، در ابتدا برای هر تیمار، طبق میزان بیان‌شده در جدول ۲، روغن اسید چرب امگا-۳ به ۱۰ mL اتانول اضافه‌شده و با هموژنایزر التراتوراکس (Ultra-Turrax, Wise-15D, South Korea) با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه یکنواخت شدند. در مرحله بعد محلول‌های حاوی مواد دیواره به مخلوط اسید چرب امگا-۳ و اتانول اضافه‌شده و هر تیمار با سرعت مشخصی از هموژنایزر (طبق جدول ۲) به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شدند. تمامی مواد در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۵-۶ با هم مخلوط گردیدند. محلول به دست‌آمده در محدوده درجه حرارت حدود ۲۵-۲۲ °C (در دمای اتاق) نگهداری شد. ۱٪ نمک کلرید کلسیم (CaCl₂) به‌عنوان چسباننده به تمامی امولسیون‌ها اضافه شد. سپس آزمایش‌های بررسی اندازه ذرات امولسیون انجام شده و پس از آن امولسیون‌ها جهت خشک شدن به خشک‌کن انجمادی منتقل گردیدند.

۲-۲- خشک کردن انجمادی

به منظور خشک کردن امولسیون‌ها و دستیابی به پودر خشک، از خشک‌کن انجمادی (-FDU, Operon, Freeze Dryer, South Korea, 8624) استفاده شد. برای این منظور امولسیون‌ها در ظروف یک‌بارمصرف ریخته شده و در قسمت فریزر یخچال معمولی در دمای ۱۸°C- قرار داده شد. بعد از منجمد شدن نمونه‌ها، در داخل اتاقک خشک‌کن انجمادی در دمای ۸۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا فرآیند خشک

سال‌های اخیر توجه رو به رشدی نسبت به استفاده از ژلاتین ماهی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای ژلاتین پستانداران شده است؛ زیرا می‌توان آن را از محصولات جانبی صنعت فرآوری ماهی استخراج کرد و هیچ‌گونه نگرانی مربوط به ایمنی مصرف‌کننده وجود ندارد [۱۵]. صمغ عربی یکی از پلی ساکاریدهای صنعتی است که با توجه به فعالیت‌های سطحی خوب و ویسکوزیته پایین به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این صمغ پلی‌الکترولیتی ضعیف و حامل بار منفی بالا است. صمغ عربی ماده‌ای شناخته‌شده برای انجام کواسرواسیون پیچیده با انواع مختلف پروتئین‌ها، از جمله ژلاتین، β -لاکتوگلوبین، پروتئین آب‌پنیر، سدیم کازئینات و پروتئین‌های گیاهی است [۱۵]. کشور ما از نظر دارا بودن ذخایر شیلاتی غنی بوده و دارای پتانسیل بالای تولید محصولات جانبی (مانند روغن ماهی، ژلاتین ماهی و...) از حجم زیاد ضایعات بهره‌برداری نشده آبزیان است. در نتیجه، می‌توان از این ضایعات در قالب فرآورده‌های بیولوژیک و دارای ارزش‌افزوده و به‌عنوان منبعی برای تولید نانو کپسول‌های روغن ماهی و اسید چرب ماهی استفاده نمود که این امر سبب افزایش ارزش‌افزوده ماده غذایی با استفاده از این نانو کپسول‌ها می‌گردد.

بر اساس مجموعه مطالعات صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای در ایران در زمینه تولید نانو کپسول‌های امگا-۳ با استفاده از روش کواسرواسیون و استفاده از ژلاتین ماهی و صمغ عربی به‌عنوان ماده دیواره صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق روش تولید نانو کپسول‌های امگا-۳ با استفاده از تکنیک کواسرواسیون مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

ژلاتین ماهی از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا)، صمغ عربی از شرکت دای‌جونگ (کره جنوبی)، ایزوپروپانول و هگزان از شرکت Merck (آلمان) خریداری شده و سایر مواد آزمایشگاهی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی از فروشگاه‌های مواد شیمیایی و آزمایشگاهی معتبر خریداری شد.

می شوند. برای پراکنده سازی بهتر پودرها از روش اولتراسوند استفاده شد.

شدن تحت خلأ را سپری نمایند. در نهایت، پودرهای تولید شده در ظروف پلاستیکی تیره و کاملاً دربسته نگهداری شدند.

۳-۲- آزمایش های انجام شده بر روی نانو

کپسول ها

۳-۲-۱- اندازه گیری مقدار رطوبت در نانو کپسول ها

برای تعیین رطوبت، حدود ۲ گرم از پودر در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و مقدار رطوبت از اختلاف وزن محاسبه شد [۱۷].

۳-۲-۲- اندازه گیری پارامترهای رنگی نانو

کپسول ها

جهت بررسی رنگ پودرها، سه شاخص a^* و b^* و L^* اندازه گیری می شود. مقدار L^* نشان دهنده روشنی و a^* و b^* به ترتیب قرمزی و زردی را نشان می دهند [۲۲]. برای اندازه گیری پارامترهای رنگی نانو کپسول ها مقداری از پودرها را داخل شیشه ساعت ریخته و سپس مقادیر پارامترهای L^* ، a^* ، b^* با استفاده از دستگاه رنگسنج (مدل IMG-Pardazesh Cam-System XI شرکت ابزار کاران فن پویای شمال-ایران) اندازه گیری شد.

بررسی ریزساختار نانو کپسول ها

بررسی ریزساختار و مورفولوژی سطحی پودرهای تولیدی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی ESEM XL30 (Philips), USA)) در مرکز آنالیز آزمایشگاهی شایان-تهران انجام شد. تصویربرداری از نمونه ها در بزرگنمایی های مختلف انجام شد. قبل از ثابت کردن نمونه در دستگاه، برای تمیز کردن نمونه از حلال های آلی چون استون، اتانول و متانول یا مخلوطی از آنها استفاده می شود که برای نمونه حاضر که ژلاتین و صمغ می باشد، این مرحله انجام نمی شود و نمونه به همان شکل ثابت می گردد. نمونه گیری از نمونه های پودری باید با دقت زیادی انجام شود. نمونه سازی با پودر معمولاً با استفاده از چسب های دو طرفه انجام می گیرد. این چسب ها از یک طرف به سطح نمونه گیر واسطه و از طرف با پودر تماس داده

۴-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور بهینه سازی تیمارهای آزمایشی از روش سطح پاسخ (RSM^1) استفاده شد. اثر متغیرهای مستقل شامل غلظت امگا-۳ (به درصد، A)، ژلاتین ماهی (به درصد، B) و دور دستگاه هموژنایزر (C.rpm) در ۳ سطح مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. به منظور بهینه سازی فرآیند تولید نانو کپسول ها از طرح مرکب مرکزی چرخشی ($CCRD^2$) با ۱۸ آزمایش که شامل ۸ نقطه فاکتوریل، ۶ نقطه محوری و ۴ تکرار حول نقطه مرکزی (برای تخمین خطای آزمایش) استفاده شد (جدول ۱). از آنجایی که نقاط مرکزی ۴ مرتبه در شرایط مشابه تکرار می شوند، تخمین مستقل خطای آزمایش ها بدست می آید، بنابراین تکرار تمامی نقاط آزمایش ها غیرضروری است. خطای خالص نیز به منظور بررسی میزان انطباق برازش (Goodness of fit) استفاده شد. جهت طراحی آزمایش، آنالیز نتایج، رسم نمودارها و بهینه سازی از نرم افزار دیزاین اکسپرت (نسخه ۷ Design Expert 7.00) استفاده گردید. آزمون آماری مدل به دست آمده برای هر پاسخ بر اساس آزمون آنالیز واریانس ANOVA صورت گرفته و تفاوت بین میانگین ها در سطح اطمینان ۹۵٪ توسط آزمون دانکن صورت گرفت. شاخص های اندازه گیری شده بر طبق معادله ۲ مدل سازی شدند.

معادله ۲

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j} \beta_{ij} X_i X_j$$

Y عبارت است از متغیر وابسته، β_0 و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت های برآورد شده توسط مدل، X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آنها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می باشند.

1. Response Surface Methodology
2. Central composite rotatable design

Table 1 Levels of experimental variables for omega-3 nano-encapsulation

Variable	Symbol	Coded levels		
		+1	0	-1
Fish gelatin (%)	A	66	49.5	33
Omega 3 fatty acids (%)	B	30	20	10
homogenizer speed (rpm)	C	20000	15000	10000

Table 2 Experimental design of nano-encapsulation of Omega-3 fatty acids with fish Gelatin and Arabic gum as wall materials using the coacervation technique

Treatment	Fish gelatin (%)	Omega 3 fatty acids (%)	Homogenizer speed (rpm)
1	66	10	10000
2	66	10	20000
3	33	30	10000
4	49.5	20	15000
5	49.5	10	15000
6	33	10	10000
7	66	20	15000
8	49.5	20	20000
9	66	30	20000
10	33	20	15000
11	49.5	20	15000
12	66	30	10000
13	49.5	20	15000
14	49.5	20	10000
15	33	30	20000
16	49.5	20	15000
17	33	10	20000
18	49.5	30	15000

۳- نتایج و بحث

۳-۱- رطوبت

میزان رطوبت پودرهای تولیدی در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار رطوبت نانو کپسول‌های خشک‌شده در محدوده ۷/۳-۴/۲٪ است. برای شناسایی اثر معنی‌داری متغیرهای ورودی بر میزان رطوبت پودرهای تولیدی از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز واریانس برای مدل رگرسیون (جدول ۴)، مدل در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی‌دار است.

برای معنی‌دار بودن مدل، همواره باید مقدار P-value کمتر از ۰/۰۵ و مقدار عدم برازش بیشتر از این مقدار باشد. طبق نتایج به‌دست‌آمده، اثر خطی هر ۳ متغیر بر پاسخ میزان رطوبت پودرها معنی‌دار بوده است. آنالیز واریانس داده‌های رطوبت نشان داد که مهم‌ترین عامل مؤثر بر رطوبت پودرها، غلظت

ژلاتین ماهی (A) است. با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، میزان رطوبت نانو کپسول‌ها نیز افزایش یافت.

بر اساس آنالیز واریانس داده‌های مربوط به رطوبت، رابطه ریاضی زیر بر اساس مقادیر کد شده به دست آمد:

معادله [۱]

$$Y = 6.07 + 0.74A - 0.51B - 0.18C$$

نمودار سه‌بعدی سطح پاسخ برای داده‌های حاصل از نتایج آنالیز واریانس پاسخ رطوبت، در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۱ (الف) اثرات دو متغیر ژلاتین ماهی و روغن امگا-۳ را روی پاسخ نشان می‌دهد، که در این نمودار متغیر سوم (دور ثابت هم‌وزن‌باز) در میزان بهینه‌اش (rpm ۱۵۰۰۰) ثابت نگه‌داشته شده است.

بر اساس روند تغییرات سطح پاسخ مربوطه و شیب تند این منحنی در خصوص فاکتور ژلاتین مشخص می‌گردد که میزان رطوبت عمدتاً تابعی از افزایش میزان ژلاتین می‌باشد.

Table 3 Moisture content of freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique

Treatment	Fish gelatin (%)	Omega 3 fatty acids (%)	Homogenizer speed (rpm)	Moisture (%)
1	66	10	10000	6.6
2	66	10	20000	7.3
3	33	30	10000	6
4	49.5	20	15000	6.6
5	49.5	10	15000	7
6	33	10	10000	7
7	66	20	15000	7.3
8	49.5	20	20000	4.6
9	66	30	20000	6
10	33	20	15000	4.6
11	49.5	20	15000	6.2
12	66	30	10000	7
13	49.5	20	15000	6
14	49.5	20	10000	7.3
15	33	30	20000	4.2
16	49.5	20	15000	6
17	33	10	20000	5
18	49.5	30	15000	4.6

Table 4 ANOVA results of moisture response of freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique

Source of change	sum of squares	freedom degree	average of squares	F Value	p-value Prob > F
Regression Model	12.70	3	4.23	9.63	0.0010*
A	5.48	1	5.48	12.46	0.0033*
B	2.60	1	2.60	5.92	0.0290**
C	4.62	1	4.62	10.52	0.0059*
Remaining	6.16	14	0.44		
Lack of fit	5.92	11	0.54	6.72	0.0717 ^{NS}
Net error	0.24	3	0.080		
Cor Total	18.86	17			

Significant at confidence level of 99%, ** significant at confidence level of 95%, NS is shown to be insignificant.

شکل ۱ (ب) اثر خطی فاکتور دور هموژنایزر را بر تغییرات رطوبت نشان می‌دهد. بر این اساس فاکتور دور هموژنایزر می‌تواند عامل تعیین کننده ای در میزان رطوبت نانوکپسولهای تولیدی باشد به طوریکه با اعمال دورهای

از سویی دیگر تغییرات در خصوص فاکتور روغن ماهی علاوه بر اینکه از شیب بسیار ملایم تری برخوردار می باشد دارای رابطه معکوسی نیز با میزان رطوبت نانوکپسول های تولید شده می باشد، به طوریکه میزان رطوبت به طور نسبی در درصدهای بالاتر روغن کمتر می باشد.

ذرات برای رسیدن به یک محصول قابل قبول، به خصوص در مورد شرایط نگهداری نامطلوب استفاده می شود. مقدار رطوبت نهایی برای مواد غذایی ۲٪ الی ۱۰٪ و برای محصولات بیولوژیکی ۰/۱٪ الی ۳٪ است [۲۰].

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که ژلاتین ماهی و دور هموزنانیزر اثر معنی داری بر میزان رطوبت نانو کپسول‌ها داشتند. در تیمارهایی که غلظت ژلاتین ماهی بالا بود، رطوبت بیشتری نیز مشاهده شد. همچنین، با افزایش دور هموزنانیزر، رطوبت نانو کپسول‌ها کاهش یافت. این نتیجه احتمالاً به دلیل بزرگ‌تر شدن اندازه ذرات تحت تأثیر افزایش دور هموزنانیزر است؛ چرا که اندازه ذرات بر میزان رطوبت پودرهای خشک شده، اثرگذار است. سایر محققان نیز تفاوت معنی دار بسیار کمی در مقدار رطوبت پودرهای تولیدی خود مشاهده کردند [۲۱، ۱۵]. Hagan و همکاران (۲۰۱۰) تکنیک ریز پوشانی با استفاده از اولتراسونداتی طی ۳ مرحله شامل تهیه امولسیون، فرآیند اولتراسونداتی و خشک کردن انجمادی را مورد مطالعه قرار دادند. طبق گزارش آن‌ها، مقدار کمی رطوبت در حدود ۲/۸ و ۳/۰۲ گرم در هر ۱۰۰ گرم از پودرهای کپسوله شده مشاهده شد در تحقیق خود بیان داشتند که انواع مواد دیواره تأثیری بر مقدار رطوبت ندارند؛ اما نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که نوع ماده دیواره نیز بر مقدار رطوبت مؤثر است [۱۳].

۳-۲- رنگ پودرهای تولید شده

نتایج مقادیر پارامترهای رنگی L^* ، a^* و b^* اندازه‌گیری شده برای پودرهای تولیدی در جدول ۵ آورده شده است. مقدار L^* نشان‌دهنده روشنایی و a^* و b^* به ترتیب قرمزی و زردی را نشان می‌دهند. رنگ پودرهای تولیدی از نقطه نظر پذیرش در بازار مصرف و افزودن آن به محصولی دیگر بسیار حائز اهمیت است. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش، با افزایش غلظت ژلاتین ماهی در تیمارهای مختلف، میزان روشنایی پودرهای تولیدی کاهش یافته است. همچنین شاخص زردی در تیمارهای با غلظت ژلاتین ماهی بالا، بیشتر از دیگر تیمارها بود. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس پاسخ رنگ (L^*) (جدول ۶) به منظور سنجش مدل انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار P-value نشان

بالتر هموزنانیزر تا حد ۲۰۰۰۰ rpm میزان رطوبت به طور معنی داری نسبت به دور ۱۰۰۰۰ rpm کاهش می‌یابد.

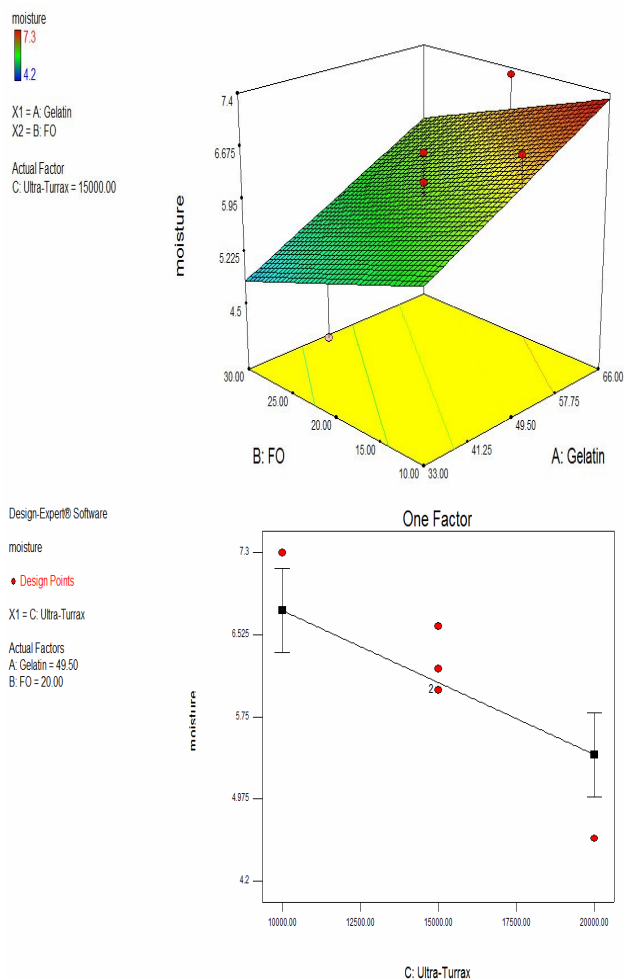


Fig 1 Three-dimensional graph (A) and single-factor effect (B) of input variables on the moisture content of nano-capsules.

میزان رطوبت پودرها فاکتور مهمی است که نقش تعیین‌کننده‌ای در پایداری پودرهای خشک شده دارد. رطوبت بالا سبب به هم چسبیدگی ذرات، تسریع رشد میکروبی و اکسیداسیون می‌گردد. پایداری فیزیکی، شیمیایی و میکروبی مواد بستگی بسیار زیادی به محتوای آب آن‌ها دارد [۱۸]. رطوبت باقی مانده مطلوب برای محصولات را معمولاً مدت زمان اختصاص داده شده به خشک کردن ثانویه تعیین می‌کند. مقالات بسیار کمی را می‌توان یافت که مرحله‌ی خشک شدن نانو ذرات با کمک خشک‌کن‌های انجمادی را مورد مطالعه قرار داده‌اند [۱۹]. خشک کردن انجمادی یک فرایند بسیار با ثبات است که به‌طور کلی به منظور افزایش پایداری فیزیکوشیمیایی نانو

1. agglomeration

دهنده معنی‌داری مدل می‌باشد ($p < 0/05$). از سوی دیگر، با توجه به میزان p -value عدم برازش و غیر معنی‌داری آن، مدل پیشنهادی را می‌توان به عنوان مدل مناسبی معرفی کرد. بر اساس مقادیر F -value تغییرات غلظت ژلاتین ماهی بیشترین تأثیر را در میزان تغییرات روشنایی پودرهای تولیدی داشت که این تأثیر در جهت منفی است؛ یعنی با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، روشنایی نانو کپسول‌ها کاهش یافته است (شکل ۲).

Table 5 Color parameters of freeze-dried nanocapsules of Omega-3 fatty acids with fish gelatin and Arabic gum as wall materials produced by coacervation technique

Treatment	Fish gelatin (%)	Omega 3 fatty acids (%)	Homogenizer speed (rpm)	L^*	a^*	b^*
1	66	10	10000	77	-1.2	29.4
2	66	10	20000	81.2	-3.4	33.2
3	33	30	10000	82	-2.8	27.8
4	49.5	20	15000	81.6	-1.4	32.6
5	49.5	10	15000	80.2	-2.2	32.2
6	33	10	10000	83.8	-3	25.4
7	66	20	15000	81	-3.4	34.6
8	49.5	20	20000	83.8	-4	28
9	66	30	20000	80.8	-3.8	32.2
10	B	20	15000	82.2	-3	30.6
11	49.5	20	15000	80.4	-3.8	31.8
12	66	30	10000	81.4	-4.6	33.2
13	49.5	20	15000	82.6	-4.4	29.4
14	49.5	20	10000	83	-4.6	30
15	33	30	20000	85.2	-6.4	29.4
16	49.5	20	15000	81.8	-3.2	27.8
17	33	10	20000	84.8	-3.8	29.6
18	49.5	30	15000	82.2	-3.6	32.6

Table 6 ANOVA results of lightness response (L^*) of freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique

Source of change	Sum of squares	Degree of freedom	Average of squares	F-value	p-value Prob > F
Regression Model	37.07	3	12.36	7.42	0.0033*
A	27.56	1	27.56	16.55	0.0012*
B	2.12	1	2.12	1.27	0.2786 ^{NS}
C	7.40	1	7.40	4.44	0.0536 ^{NS}
Remaining	23.32	14	1.67		
Lack of fit	20.84	11	1.89	2.29	0.2687 ^{NS}
Net error	2.48	3	0.83		
Cor Total	60.38	17			

*Significant at confidence level of 99%, ** significant at confidence level of 95%, NS is shown to be insignificant.

طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، از سویی دیگر اگرچه پارامتر دور هموژنایزر بر اساس مدل آماری ارائه شده با میزان P value معادل $0/05$ فاقد اثر معنی‌دار بیان گردیده است اما می‌توان اثر آن را نزدیک به معنی‌داری در نظر گرفت (شکل ۲ ب) و به همین دلیل اثر این پارامتر در معادله ۲ آورده شده است. اما تغییر غلظت روغن امگا-۳ تأثیر معنی‌داری بر روشنایی پودرها نداشته (شکل ۲ ب) و

مطابق آنالیز آماری، تغییرات رنگ پودرهای تولیدی در تیمارهای مختلف بر اساس مقادیر کد شده با معادله زیر مطابقت می‌کند:

معادله [۲]

$$Y = 81/94 - 1/66A + 0/87C$$

در خصوص متغیرهای این فرمول می‌توان بیان نمود که همان‌طور که در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، میزان روشنایی پودرهای تولیدی به

جدول ۷ نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس شاخص زردی (b^*) پودرهای تولیدی را نشان می‌دهد. مطابق جدول ۷، با در نظر داشتن مقدار F -value، از بین فاکتورهای مؤثر بر این شاخص، تغییرات غلظت ژلاتین ماهی بیشترین تأثیر را بر میزان زردی نانو کپسول‌ها داشته است. با افزایش غلظت ژلاتین ماهی، زردی پودرهای تولیدی نیز افزایش یافت.

بر اساس تجزیه و تحلیل، معادله ۳ برای پاسخ رنگی b^* به دست آمد:

معادله [۳]

$$Y = 30.54 + 1.98A$$

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر مشابه نتایج مطالعه Klinkesorn و همکاران (۲۰۰۶) می‌باشد [۱۷]. در مطالعه آن‌ها امولسیون روغن ماهی تون در آب که حاوی قطرات تثبیت شده توسط غشاء لسیترین-کیتوزان بود با استفاده از یک فرایند رسوب الکترواستاتیک لایه به لایه تولید شد که طبق نتایج به دست آمده، مقدار عددی پارامتر L^* یا روشنایی امولسیون‌های پودر شده کمتر و مقدار عددی b^* یا زردی بیشتر بود. در مطالعه Klaypradit و Huang (۲۰۰۸) از کیتوزان، مالتودکسترین و پروتئین آب پنیر جهت ریز پوشانی روغن ماهی استفاده شد. رنگ پودرهای ساخته شده از کیتوزان و مالتودکسترین در مقایسه با پودرهایی که با کیتوزان و پروتئین آب پنیر تولید شدند، سفیدتر بود که این احتمالاً به دلیل وجود پروتئین آب پنیر می‌باشد که منجر به افزایش شاخص زردی پودرها شد [۲۲].

بنابراین پارامتر غلظت روغن در فرمول مربوطه ذکر نگردیده است.

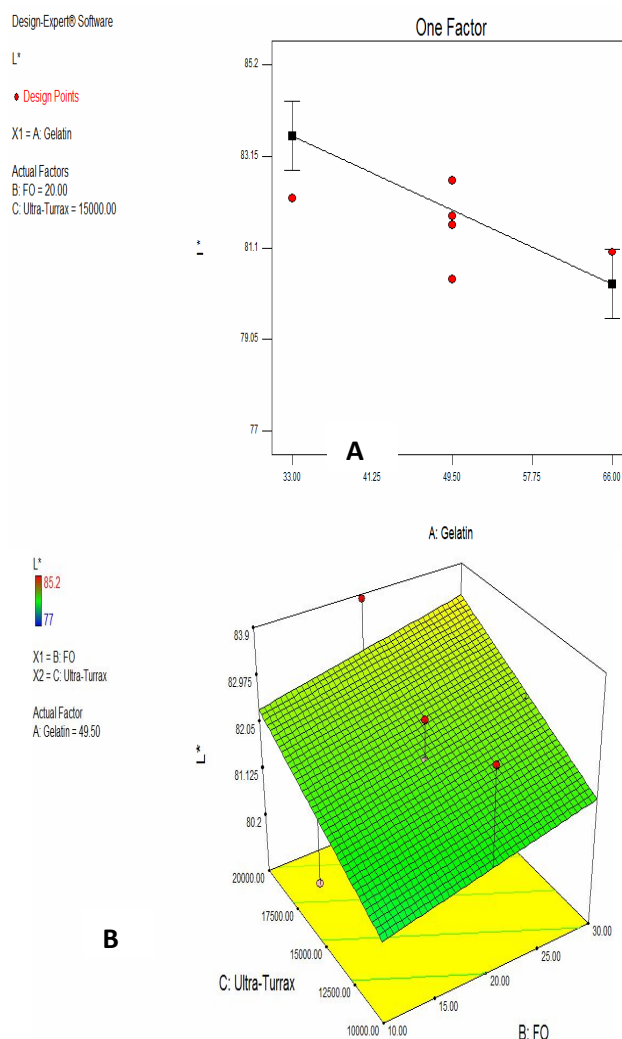


Fig 2 Three-dimensional graph (A) and single factor (B) of the input variables on the brightness index (L^*) of the freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique

با توجه به داده های جدول ۵، پارامتر قرمزی (a^*) در خصوص تمامی تیمارهای با میزان عددی ۲/۱- تا ۴/۶- ثبت گردید و با توجه به ماهیت رنگ مواد مورد استفاده در تولید پودر نانوکپسول که عملاً از دامنه رنگ سبز تا قرمز به دور می باشند این پارامتر در مقایسه با پارامتر روشنایی و زردی پودر نانوکپسولهای تولیدی از اهمیت کمتری برخوردار می باشد لذا از ذکر روند تغییرات آن خودداری گردید.

Table 7 ANOVA results of yellowness index (b^*) of freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique

Source of change	Sum of squares	Degree of freedom	Average of squares	F-value	p-value Prob > F
Regression Model	46.48	3	15.49	4.11	0.0275**
A	39.20	1	39.20	10.41	0.0061*
B	2.92	1	2.92	0.77	0.3937 ^{NS}
C	4.36	1	4.36	1.16	0.3003 ^{NS}
Remaining	52.71	14	3.76		
Lack of fit	38.15	11	3.47	0.71	0.7052 ^{NS}
Net error	14.56	3	4.85		
Cor Total	99.18	17			

*Significant at confidence level of 99%, ** significant at confidence level of 95%, NS is shown to be insignificant.

تغییر رخ داده در ساختار آن‌ها است [۱۹].

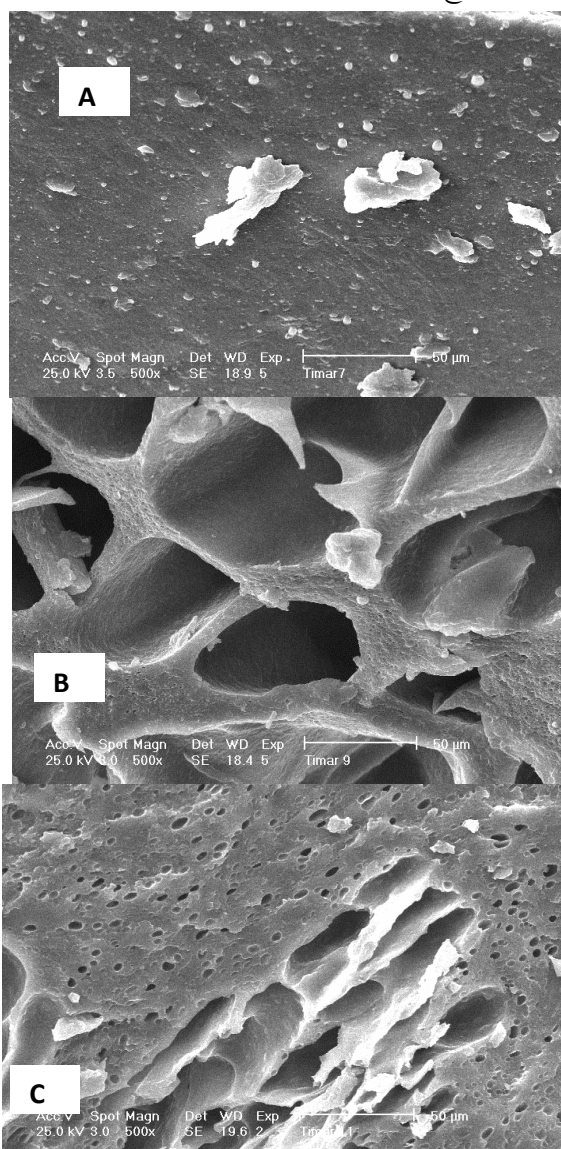


Fig 3 Scanning Electronic Microscopy (SEM) results of freeze-dried nano-encapsulated omega-3 fatty acids using the coacervation technique [A: Treatment 7 (fish gelatin 66%, fish oil 20%, homogenizer speed 15000 rpm; B: Treatment 9 (fish gelatin 66%, fish oil 30% homogenizer speed 20000 rpm), C: Treatment 11 (fish gelatin 49.5%, fish oil 20% homogenizer speed 15000 rpm)]

۳-۳- ریزساختار نانو کپسول‌ها

مورفولوژی سطحی نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی گردید. شکل ۳ تصاویر میکروسکوپی پودرهای خشک‌شده با خشک‌کن انجمادی را نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که تصاویر SEM، مربوط به صفحات لایه‌ای ماتریس خشک‌شده نانو کپسول‌های امگا ۳ می‌باشد. همچنین، بزرگنمایی تصاویر تنها تا حد ۵۰۰ برابر بوده که باعث گردیده که ذرات نانو کپسول در تصاویر قابل مشاهده نباشند و تنها ماتریس لایه‌های نانو کپسول‌ها قابل رؤیت هستند. مورفولوژی ذرات نشان می‌دهد که سطح ماتریس تشکیل شده نسبتاً صاف و شکننده و دارای ساختاری متخلخل است. میزان تخلخل مشاهده شده متفاوت بوده و احتمالاً به دلیل حفره‌های به‌جامانده از کریستال‌های یخ یا حباب‌های هوا در طول انجماد، تشکیل شده است؛ زیرا در فرآیند خشک شدن انجمادی، ابتدا محصول مایع منجمد شده و سپس آب توسط تصعید حذف می‌شود.

تصاویر SEM می‌تواند به‌طور مستقیم ارائه‌دهنده اطلاعات لازم در مورد اندازه ذرات و مورفولوژی نمونه‌ها باشد. تصویر میکروسکوپی محصولات خشک‌شده با خشک‌کن انجمادی، از یک طرف راهی مستقیم برای مشاهده ساختار ماتریس و از سوی دیگر برای اثبات حفظ یکپارچگی نانو ذرات و مشاهده هرگونه

نشان داد در تیمار ۱۵ استفاده از ۳۳٪ ژلاتین ماهی، ۳۰٪ امگا-۳ و دور ۲۰۰۰rpm هموزنایزر می‌تواند مطلوب‌ترین مقادیر برای دستیابی به نانو کپسول‌های امگا-۳ با کمترین میزان رطوبت و زردی و همچنین بیشترین میزان روشنایی باشد.

۵- منابع

- [1] Kolakowska, A., Zienkiewicz, L., Domiszewski, Z., Bienkiewicz, G. 2006. Lipid charges and sensory quality of whole and gutted rainbow trout during storage in ice. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 36, 39-47.
- [2] Beindorff, C.M., Zuidam, N.J. 2010. Microencapsulation of fish oil, in Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing., Springer 161-185.
- [3] Zhong, Q., Tian, H., Zivanovic, S. 2009. Encapsulation of fish oil in solid zein particles by liquid-liquid dispersion. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(2) 255-270.
- [4] Baik, M.-Y., Suhendro, E.L., Nawar, W.W., McClements, D.J., Decker, E.A., Chinachoti, P. 2004. Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil. *JAOCS*, 81(4), 355-360
- [5] Dziezak, J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42(4) 136-151
- [6] Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., Easa, A.M. 2008. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4) 563-569.
- [7] Augustin, M.A., Sanguansri, L., Bode, O. 2006. Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science*, 71(2) E25-E32.
- [8] Jafari, S.-M., Assadpoor, E., Yinghe, H., Bhesheh, B. 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26, 816-835.
- [9] Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- [10] Lin, C.C., Lin, S.Y., Hwang L.S. 1995. Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *Journal of Food Science*, 60(1) 36-39

با توجه به تصاویر SEM تهیه‌شده در پژوهش حاضر، نکته قابل اشاره، وجود ماتریس نسبتاً صاف می‌باشد که علاوه بر حفره‌های مشاهده‌شده، بیانگر شکل‌گیری نانو کپسول‌هایی با اندازه‌های نسبتاً یکسان می‌باشد که در مجموع یک ماتریس صاف را تشکیل داده‌اند. به عبارتی می‌توان به کارایی تکنیک به کار گرفته‌شده در تولید نانو کپسول‌های امگا-۳ با استفاده از ژلاتین و صمغ عربی به‌عنوان مواد دیواره در سطوح مختلف سایر تیمارها پی برد.

تصاویر به‌دست‌آمده از تیمارهای مختلف، وجود تخلخل و حفره‌های ریز را در سطح ماتریس تشکیل‌شده نشان می‌دهد که ناشی از تصعید کریستال‌های یخی است. نتایج مطالعه حاضر مشابه نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش Heinzelmann و همکاران (۲۰۰۰) و Farias و همکاران (۲۰۰۷) بوده که ماتریسی با سطح صاف و متخلخل و دارای منافذ زیاد با اندازه‌های مختلف را در نمونه‌های خود مشاهده کردند [۲۳، ۲۴]. Klinkesorn و همکاران (۲۰۰۶) در پژوهشی که به بررسی خصوصیات روغن ماهی تون خشک‌شده با خشک‌کن پاششی پرداخته بودند نیز تعدادی حفره درون هر کپسول مشاهده کردند که این حفرات احتمالاً در فاز نهایی خشک‌کردن و به دلیل چروکیدگی شدن غیریکسان مواد ایجاد شدند [۱۷]. لازم به ذکر است که فرآیند بهینه‌یابی نانو کپسول‌های تولیدی با روش کواسرواسیون ترکیبی بر اساس پارامترهایی همچون میزان روغن کپسوله‌شده، روغن سطحی و کارایی نانو کپسول کردن انجام گردید که توسط جعفرپور و همکاران (۱۳۹۵) گزارش گردیده است [۲۵].

۴- نتیجه‌گیری کلی

هدف از این پژوهش، استفاده از ژلاتین ماهی به همراه صمغ عربی به‌منظور نانو ریز پوشانی اسیدهای چرب امگا-۳ با استفاده از تکنیک کواسرواسیون بود. نتایج نشان داد استفاده از دور پایین هموزنایزر، ذرات با اندازه کوچک‌تری در محدوده نانو تولید می‌کند. همچنین تکنیک مورد استفاده به‌طور مؤثری باعث ایجاد اندازه مطلوب نانو ذرات شد و روش کواسرواسیون همراه با ژلاتین ماهی و صمغ عربی به‌عنوان مواد دیواره، می‌تواند کپسول‌های حاوی امگا-۳ در محدوده نانو تولید کند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج

- [18] Anwar, S. H., Kunz, B. 2011. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 367-378 .
- [19] Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1688-1713 .
- [20] Anandharamakrishnan, C. 2014. *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*. Springer.
- [21] Legako, J. 2009. Effect of Production Method on Characteristics and Oxidative Stability of Microencapsulated Fish Oil. Citeseer.
- [22] Klaypradit, W., Huang, Y.-W. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6) 1133-1139.
- [23] Farias, M.C., Moura, M.L., Andrade, L., Leão, M., Helena, M.R. 2007. Encapsulation of the alpha-tocopherol in a glassy food model matrix. *Materials Research*, 10(1), 57-62.
- [24] Heinzlmann, K., Franke, K., Velasco, J., Marquez-Ruiz, G. 2000. Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *European Food Research and Technology*, 211(4), 234-239.
- [25] Jafarpour, A., Esfahani, R., Jafari, S-M. 2016. Efficiency evaluation of nanoencapsulation of omega-3 fatty acids with gelatin-Arabic gum complex using coaservation technique. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 25(2) 29-42
- [11] Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.
- [12] Chaudhry, Q., Castle, L. 2011. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. *Trends in Food Science & Technology*, 22(11) 595-603.
- [13] Huang, Q., Yu, H., Ru, Q. 2010. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1) R50-R57.
- [14] Mishra, B., Patel, B.B., Tiwari, S. 2010. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1) 24-9.
- [15] Yang, Y., Anvari, M., Pan, C-H., Chung, D. 2012. Characterisation of interactions between fish gelatin and gum arabic in aqueous solutions. *Food chemistry*, 135(2), 555-561.
- [16] Hardas, N., Danviriyakul, S., Foley, J.L., Nawar, W.W., Chinachoti, P. 2000. Accelerated stability studies of microencapsulated anhydrous milk fat. *LWT-Food Science and Technology*, 33(7), 506-513 .
- [17] Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E A., McClements, D.J. 2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39, 449-457.

Color, moisture and microstructure characteristics of Omega 3 fatty acids Nano-capsules produced by application of Coaservation technique

Esfahani, R. ¹, Jafarpour, S. A. ^{2*}, Jafari, S. M. ³

1. M.Sc. Student, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

2. Associate Prof. Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

3. Associate Prof. Department of Food Sciences, Gorgan Agricultural Sciences and Natural Resources University

(Received: 2016/01/24 Accepted:2017/09/05)

In this study, nano-encapsulation of fish oil Omega 3 fatty acids was optimized by using response surface methodology (RSM) in the central composite design (CCD). Omega-3 nano-particles, containing fish gelatin and Arabic gum as wall materials, were produced using coacervation technique. Based on the results of three independent variables as fish gelatin concentration (33-66%), the concentration of omega-3 (10-30%) and the homogenizer speed at three levels (10000, 15000 and 20000 rpm) on the dependent variables such as moisture, color parameters and microstructure, it was revealed that the homogenizer speed had the greatest impact on the particle size ($p < 0.05$). Morphology of powders showed that the produced powders had a relatively smooth and brittle surface and porosity was observed in case of some samples. Furthermore, moisture content of nanocapsules which were dried by freeze drying was in the range of 4.2%-7.3%. The most important factors that influence the moisture was found to be the gelatin concentration, as by increasing the concentrations of fish gelatin, the moisture of nanocapsules increased. According to color indices, fish gelatin concentration had the greatest impact on the rate of Lightness (L^*) of produced powders, as by increasing of fish gelatin concentrations, the lightness of nanocapsules decreased whereas the yellowness (b^*) increased.

Keywords: Omega-3, Color, microstructure, Fish gelatin, Coacervation,

* Corresponding Author E-Mail Address; a.jafarpour@sanru.ac.ir