

# بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی ماست پروبیوتیک کم چرب غنی سازی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگاسه

نسرین فرجی<sup>۱\*</sup>، محمد عزیزاده<sup>۲</sup>، هادی الماسی<sup>۳</sup>، سجاد پیرسا<sup>۴</sup>، سهیلا فرجی<sup>۵</sup>

- ۱- دانش آموخته دکترای علوم و صنایع غذایی، مدیر تحقیق و توسعه شرکت آذین شوشتر  
 ۲- استاد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، گروه علوم و صنایع غذایی  
 ۳- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، گروه علوم و صنایع غذایی  
 ۴- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، گروه علوم و صنایع غذایی  
 ۵- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، مدیر کنترل کیفیت شرکت آذین شوشتر  
 (تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۲۳)

## چکیده

در این پژوهش، نانوامولسیون اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس موسیر ایرانی به روش امولسیفیکاسیون خودبخودی تهیه گردید. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط بهینه تولید ماست پروبیوتیک غنی سازی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از طرح D-optimal بود و در ادامه، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور در ابتدا نانوامولسیون های حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس گیاهی موسیر ایرانی (میزان امگا سه ۲۵ درصد، مدت زمان نگهداری ۳۵ روز، نسبت سورفاکتانت به روغن (۲۶۳/۳۹) درصد و نوع سورفاکتانت توتین (۸۰) تولید گردیدند، سپس غنی سازی ماست پروبیوتیک با نانوامولسیون های تولید شده انجام گردید و تاثیر دو متغیر مستقل غلظت نانوامولسیون و مدت زمان نگهداری بر روی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، رشد جمعیت پروبیوتیک و خواص حسی ماست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که اندازه قطرات بسیار تحت تاثیر غلظت سورفاکتانت و نوع سورفاکتانت بود و با افزایش مقدار سورفاکتانت، میانگین قطر قطرات کاهش معنی داری یافت، در واقع افزایش غلظت سورفاکتانت در نانوامولسیون ها در اکثر موارد سبب افزایش میزان جذب سورفاکتانت به سطح امولسیون گردیده و در نتیجه منجر به کاهش بیشتر کشش سطحی شده و در نهایت سبب کاهش اندازه ذرات، شاخص کدورت، اندیس پراکسید، میزان آب اندازی، زنده مانی جمعیت پروبیوتیک ها و ارزیابی حسی تاثیر معنی داری داشت، رشد جمعیت میکروارگانیسم های پروبیوتیک در ماست در حضور نانوامولسیون اسانس موسیر به علت دسترسی به مواد مغذی افزایش یافت و همچنین میزان آب اندازی با افزودن نانوامولسیون ها کاهش داشت. با استفاده از بهینه سازی عددی، مقادیر بهینه متغیرهای مستقل ماست پروبیوتیک غنی شده با مطلوبیت ۰/۸ بصورت مدت زمان نگهداری ۱۵ روز و غلظت نانوامولسیون ۱/۴ درصد تعیین شد.

**کلید واژگان:** ماست پروبیوتیک، اسانس موسیر ایرانی، اسیدهای چرب امگا سه، نانوامولسیون

\*مسئول مکاتبات: Nasrin.faraji88@yahoo.com

## ۱- مقدمه

امروزه در سطح دنیا تامین مواد مغذی مورد نیاز بدن، افزایش طول عمر و گنجاندن ترکیبات با کیفیت در مواد غذایی مصرفی روزانه از اهمیت زیادی برخوردار است. غذاهای فراسودمند موضوع روز مورد توجه در جهان و یکی از روبه رشدترین گروه های مواد غذایی به شمار می آیند [۱]. در حقیقت فراسودمند ها غذاهای اصلاح شده ای هستند که در ترکیب آنها علاوه بر خواص تغذیه ای سنتی، ترکیباتی افزوده شده که بتواند در بهبود سلامت افراد تاثیر گذار باشد. مهمترین آنها عبارتند از: ویتامین ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین ها، فلاونوئیدها، استرول ها و اسیدهای چرب ضروری [۲]. با تغییر شیوه زندگی و گرایش روز افزون مردم به غذاهای کم چرب و یا بدون چربی و عدم رعایت تنوع در استفاده از گروه های مختلف مواد غذایی و نابودی نوتریسیتیکیال ها طی فرآوری و نگهداری مواد غذایی، نگرانی ها در مورد بروز بیماری های ناشی از کمبود مواد مغذی و زیست فعال آنگریز ضروری بدن رو به افزایش است. بنابراین، به منظور برآورده کردن نیاز بدن، می توان مواد غذایی کم چرب و بدون چربی را با این مواد ضروری غنی سازی کرد [۳].

اسیدهای چرب امگا سه، دسته ای از اسیدهای چرب چند غیراشباع (معمولاً بیش از دو پیوند دوگانه) می باشند که پیش ساز بسیاری از ترکیبات ضروری در بدن هستند، اسیدهای چرب غیر اشباع دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)، ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و آلفا لینولنیک اسید (ALA) مهمترین اسیدهای چرب امگا سه محسوب می شوند [۴]. اسیدهای چرب امگا سه نقش مهمی در پیشگیری از بیماریهای قلبی - عروقی به خصوص در جمعیت های در معرض خطر دارند [۵]. بسیاری از سازمان ها در سطوح ملی و بین المللی توصیه هایی برای اسیدهای چرب امگا سه داشته اند. آژانس سلامت و ایمنی اروپا ۵۰۰-۲۵۰ میلی گرم EPA و DHA در روز را پیشنهاد می نماید. موسسه تغذیه بین المللی و برنامه سلامت فرانسه حداقل مصرف دو بار در هفته را پیشنهاد کردند. آژانس ایمنی و سلامتی در فرانسه برای سنین بالاتر از ده سال مانند زنان باردار و شیرده میزان ۵۰۰ میلی گرم EPA و DHA در روز و حداقل ۲۵۰ میلی گرم را توصیه کرده است. سازمان بهداشت جهانی (WHO) دو بار مصرف ماهی در هفته به منظور دریافت ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی گرم EPA و DHA در روز را توصیه نموده اند. منابع غذایی امگا سه

عبارتند از: روغن ماهی، روغن کریل، روغن تخم ماهی، روغن جلبک، روغن بذرتان، روغن دانه چیا، روغن ساشا اینچی، روغن اچيوم و روغن گیاه شاهدانه. میزان این اسیدهای چرب ضروری امگا سه در موجودات دریایی مانند ماهی ها بیشتر از سایر مواد غذایی هست، اما استفاده از ماهی بعنوان منبع غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع به دلیل قیمت بالای آنها، بوی نامطبوع و میزان آلودگی هایی مانند فلزات سنگین، قابلیت دسترسی و تامین همیشگی آنها محدودیت هایی دارد [۶ و ۷].

یکی از راهکارهای مناسب برای جلوگیری از بروز این مشکلات، غنی سازی مواد غذایی با این ترکیبات مغذی اسیدهای چرب امگا سه است، اما محدودیت هایی در ارتباط با غنی سازی مواد غذایی با روغن ماهی وجود دارد اولاً: اسیدهای چرب غیراشباع مولکول های بسیار آنگریزی بوده که محلولیت در آب بسیار پایینی دارند و ثانياً اسیدهای چرب غیر اشباع بسیار حساس نسبت به اکسیداسیون هستند و در طی دوران نگهداری دچار فساد شده و تولید ترکیبات نامطبوعی می کنند که مصرف را برای مصرف کننده با مشکل مواجه می کند [۸]. صنایع غذایی همواره در جستجوی روش های جدیدتر و ارزان تر برای تولید و نگهداری غذا می باشند. حوزه فناوری نانو گزینه های زیادی را برای تولید و نگهداری مواد غذایی پیشنهاد می کند [۹]. میکروانکپسولاسیون یک فناوری نسبتاً نوین است که با سرعت بالایی در حال توسعه می باشد [۱۰]. انواع مختلف نانو حامل ها در صنایع غذایی قابلیت تولید و کاربرد دارند و شامل نانوکپسول های بر پایه بیوپلیمرها و انواع لیپید (نانو لیپوزوم ها، نانونیوزوم ها، نانومولسیون ها و میسل های سورفاکتانت ها) و ذرات لیپیدی جامد می باشند [۱۱]. انکپسولاسیون ترکیبات لیپوفیل ممکن است به دلایلی شامل بهبود راحتی حمل و نقل و استفاده، تسهیل الحاق آن داخل فراورده، افزایش دسترسی زیستی، کنترل نرخ یا مکان آزاد شدن آن یا حفاظت از آن در برابر تجزیه شیمیایی انجام شود [۱۲]. نانومولسیون ها (مینی امولسیون، امولسیون های ساب میکرون، امولسیون های با ذرات بسیار ریز) را می توان نوعی امولسیون متداول در نظر گرفت که حاوی قطرات فاز پراکنده بسیار ریز می باشند و شعاع ذرات در آن به طور متوسط، در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر قرار می گیرند. این امولسیون های دارای یک سری مزیت هایی نسبت به امولسیون ها متداول می باشند: شفاف (تا حدی مات) می باشند؛ زیرا شعاع کوچک تر از طول موج نور می باشد [۱۳]. پایداری سینتیکی بالایی دارند و نسبت به

بدن، و کاهش سطح کلسترول خون اشاره کرد [۱۷]. غنی سازی ماست پروبیوتیک با استفاده از نانوامولسیون اسانس های گیاهی به همراه اسیدهای چرب ضروری می تواند سبب کاهش خطر بیماری های مزمن مانند سرطان، پوکی استخوان، فشار خون، دیابت و بیماری های قلبی شوند [۱۸]. هدف این پژوهش، بررسی شرایط بهینه غنی سازی ماست پروبیوتیک با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل امگا سه و ارزیابی خصوصیات فیزیکیوشیمیایی و حسی آن می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

روغن ماهی از شرکت داروسازی زهراوی تبریز، کازئینات سدیم، DPPH، متانل از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical, Germany)، توئین ۸۰، هیدروکسید سدیم، فنل فتالین، تری کلرو استیک اسید، کلروفرم، چسب نشاسته از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شد. اسانس موسیر از شرکت دانش بنیان عطر و طعم ماگنولیا (ایران) تهیه شد، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) از شرکت پیشگامان پخش صدیق خریداری شد و آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنجی جرمی (GCMS QP2010SE) شرکت SHIMADZU (ژاپن) انجام شد. آب دوبر تقطیر برای تمام نمونه ها تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند.

### ۲-۱- روش تهیه امولسیون

سیستم امولسیون حاوی امگا سه با استفاده از روش کم انرژی تشکیل خودبه خودی امولسیون روغن در آب با اضافه کردن قطره قطره فاز روغنی (محلول امگا سه در اسانس روغنی حامل به همراه سورفاکتانت توئین) بر روی آب دیونیزه تولید شد. در حین تشکیل، امولسیون به طور مداوم توسط همزن مغناطیسی با سرعت بهینه ۸۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت همزده شد. با توجه به تأثیر دما در اندازه ذرات امولسیون، از همزن مغناطیسی مجهز به سنسور تنظیم دما استفاده گردید، به این ترتیب امولسیون مورد نظر تهیه شد [۱۹].

### ۲-۲- اندازه گیری ترکیبات موجود در اسانس

#### موسیر ایرانی

ترکیبات موجود در اسانس گیاهی موسیر ایرانی با دستگاه گاز کروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی Agilent 6890، آمریکا

پدیده های تفکیک گرانشی و تجمع یافتن (ادغام) قطرات مقاومت بیشتری دارند. دسترسی زیستی ترکیبات کپسوله شده در این نوع امولسیون ها افزایش می یابد [۱۴]. یکی از مهمترین کاربردهای نانوامولسیون های خوراکی در صنایع غذایی و دارویی برای انکپسولاسیون ترکیبات لیپوفیل مانند اسیدهای چرب ضروری، ویتامین های محلول در چربی، مواد عطر و طعمی، رنگ ها، مواد نگهدارنده ها و داروها هستند. از روش های مختلفی برای تولید امولسیون ها و نانوامولسیون ها استفاده می شود. بطور کلی می توان به انواع کم انرژی و پر انرژی تقسیم بندی نمود [۱۵]. در روش های پر انرژی از تجهیزات مکانیکی که قادر به تولید نیروهای پاره کننده شدید و قوی هستند استفاده شود. در روش کم انرژی به طرق مختلف اعم از تغییر دادن ترکیب فازها، تغییر دادن شرایط محیطی (دما، pH، قدرت یونی) و تغییر دادن شرایط همزدن (سرعت همزدن، آهنگ اضافه کردن، ترتیب اضافه کردن فازها) می توان موفق به تولید نانوامولسیون شد.

موسیر ایرانی با نام علمی آلایوم هرتوفیلیوم از خانواده ی بزرگ لاله سانان است که گونه های مهم و شناخته شده دیگری از قبیل سیر، پیازها و تره فرنگی را در برمی گیرد. گیاه موسیر علاوه بر رژیم غذایی، دارای مصارف درمانی سنتی و غذایی نیز می باشد. این گونه گیاهی دارای خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی می باشد گونه های آلایوم منابع سرشاری از فلاونوئیدها هستند که برای درمان و پیشگیری از برخی بیماری ها مثل سرطان ها، چاقی، افزایش چربی خون و انواع دیابت مفید می باشند، یکی از فراورده های غذایی پرمصرف که می تواند حاوی ترکیبات زیست فعال به منظور افزایش مقبولیت و بهبود ویژگی های تغذیه ای و دارویی باشد ماست می باشد که محصولی با سابقه طولانی و اثرات مطلوب بر سلامتی بوده و آن را به عنوان غذای فراسودمند می شناسند، به دلیل ارزش تغذیه ای بالا تأثیر مثبتی بر سلامتی انسان و اهمیت ویژه ای در رژیم غذایی افراد دارد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به دلیل تاریخچه طولانی استفاده سالم آنها در غذا تشخیص داده شده اند. در میان انواع محصولات تخمیری شیر، ماست به عنوان حامل ایده آل برای رهایش این باکتری های پروبیوتیک برای مصرف کننده ها مورد توجه قرار گرفته است [۱۶]. از مزایای استفاده از فراورده های پروبیوتیک می توان به بهبود تعادل میکروبی معده، مهار باکتریهای پاتوژن، کاهش خطر ابتلا به سرطان روده بزرگ، بهبود سیستم ایمنی

## ۲-۶- اندازه گیری راندمان درون پوشانی

راندمان درون پوشانی به کمک دستگاه اسپکتروسکوپی (UV-1700 Pharma Spec, SHIMADZU Corporation) در طول موج ۲۸۳ نانومتر انجام شد. مقدار امگا سه نمونه ها از طریق منحنی تهیه شده با امگا سه تعیین گردید. ابتدا نانومولسیون بمدت ۱۵ دقیقه با ۴۲۰۰ g سانترفیوژ گردید و سپس یک میلی لیتر از محلول رویی نانومولسیون ها به ۹ میلی لیتر اتیل استات اضافه گردید و بمدت ۵ دقیقه همزده شد و توسط کاغذ صافی محلول صاف شد. سپس فاز آلی شفاف جدا شده بمدت دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ گردید و سپس با دستگاه اسپکتروسکوپی مورد آنالیز قرار گرفت. راندمان درون پوشانی از طریق مقایسه مقدار واقعی امگاسه درون ساختار نانومولسیون و مقدار واقعی امگاسه قبل از فرمولاسیون محاسبه گردید:

مقدار واقعی امگاسه = کل مقدار امگاسه (گرم) - مقدار امگا سه آزاد اندازه گیری شده بوسیله UV راندمان انکپسولاسیون (%) = مقدار واقعی امگا سه / کل مقدار امگا سه \* ۱۰۰

## ۲-۷- اندازه گیری ویسکوزیته ظاهری

### نانومولسیون

برای اندازه گیری ویسکوزیته ظاهری نانومولسیون های تهیه شده از ویسکومتر بروکفیلد (Brookfield DVII+) آمریکا) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد استفاده شد [۲۴].

## ۲-۸- طرح آماری تولید نانومولسیون های

### اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

در این تحقیق از طرح دی ایتیمال (DO) با بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل شامل میزان امگا سه، زمان نگهداری، درصد SOR<sup>۲</sup> و نوع سورفاکتانت به منظور بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و پایداری فرمولاسیون نانومولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مطابق جدول (۱) به تعداد ۳۲ فرمولاسیون استفاده گردید و پس از آنالیز رگرسیون و یا تعیین مدل های مناسب از روش تابع مطلوبیت عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شد. سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰/۰۵ در نظر گرفت شد. از نرم افزار Design Expert 7.1.6 جهت طراحی آزمایشی،

بصورت کمی اندازه گیری شد. این دستگاه با ستون موبینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه سانتی گراد در دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد، دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۵ میلی متر بر دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. شناسایی اجزا با مقایسه طیف جرمی آنها با طیف ترکیبات در حافظه کامپیوتر و استانداردهای معتبر صورت گرفت.

## ۲-۳- تعیین اندازه ذرات

روش هایی که بر پایه تفرق نور کار می کنند برای تعیین اندازه ذرات بین ۰/۱ تا ۱۰۰۰ میکرومتر مورد استفاده قرار می گیرند. زمانیکه پرتوی نوری به یک سیستم کلوئیدی برخورد می کند، توسط ذرات یا قطرات پراکنده می شود. قطر متوسط ذرات در دستگاه آنالیز کننده ذرات (DLS Shimadzu، ژاپن) با محدوده ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می کند. اندازه گیری ذرات پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید و نگهداری نمونه ها در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس قطر میانگین حجمی تعیین شد و کلیه نمونه ها در سه تکرار اندازه گیری شدند [۲۰].

## ۲-۴- اندازه گیری کدورت

کدورت نانومولسیون های تهیه شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu Corporation) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد [۲۱].

## ۲-۵- اندازه گیری اندیس خامه ای شدن

ده میلی لیتر از نمونه تولید شده به یک لوله آزمایش انتقال داده شد و درب آن محکم بسته شد و در طی دوران نگهداری دو فاز شدن نمونه را به دو لایه یک لایه رویی (کرم) و لایه زیری (سرم) مشاهده شد. حجم و ارتفاع نمونه ها در طول دوران نگهداری اندازه گیری گردید و مطابق معادله زیر محاسبه شد [۲۲].

$$\text{Creaming Index}(\%) = (V_t - V_s) / V_t \times 100$$

$V_t$  حجم کل نمونه و  $V_s$  حجم سرم میباشد.

1. D-optimal  
2. Surfactant-oil-ratio

شدند، به منظور ارزیابی صحت مدل های برازش داده شده با داده های آزمایشی در شرایط بهینه تعیین شده، آزمون های مورد نظر صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید.

تحلیل داده ها، مدل سازی، بهینه کردن پارامترها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتورپلات ترسیم

Table 1 Matrix of the D-optimal design.

Run	Factors				Run	Factors			
	A: Omega3(%)	B: Storage Time(day)	C: SOR (%)	D:Surfactant type		A: Omega3(%)	B: Storage Time(day)	C: SOR (%)	D:Surfactant type
1	75	24.6	300	SC	17	71.25	60	10	T80:T20
2	52.75	9.26	91.4276	T80	18	25	30.5	300	T80
3	50	38.17	155	T20	19	25	1	242	SC
4	65	1	10	SC	20	25	1	10	T80:T20
5	50	38.17	155	T20	21	71.75	37.875	161.0556	T80:T20
6	75	60	300	T80	22	25	60	300	T20
7	25	60	276.8	T80:T20	23	43.60223	58.82	10	T20
8	75	30.5	10	T80	24	25	1	10	T80:T20
9	25	60	10	T80	25	75	60	10	T20
10	75	60	68	SC	26	50	38.17	155	T20
11	25	1	10	T20	27	40.95159	1	174.0415	T20
12	75	1	134.7	T80:T20	28	75	1	300	T20
13	52.75	9.26	91.4276	T80	29	25	30.5	300	T80
14	25	1	10	T80	30	47	1	300	T80:T20
15	25	36.4	10	SC	31	56.0709	54.1	300	T80:T20
16	75	1	300	T80	32	35.25	60	300	SC

گردیدند. نمونه ها در حین گرمخانه گذاری، pH آن ها به طور پیوسته کنترل گردید. پس از رسیدن pH به ۴/۶ نمونه ها به یخچال ۵ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

#### ۲-۱۰- اندازه گیری میزان ویسکوزیته ظاهری

میزان ویسکوزیته ظاهری با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مدل (Brookfield DVII+) ساخت آمریکا اندازه گیری شد [۲۴].

#### ۲-۱۱- تعیین شمارش جمعیت پروبیوتیک

برای بررسی تغییرات تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در نمونه های ماست بدین منظور یک گرم از هر نمونه ماست با ۹ میلی لیتر محلول پپتون واتر (۰/۱٪) مخلوط و کاملاً یکنواخت گردید. نمونه های سوسپانسیون شده رقیق گردیده و از هر رقت، یک میلی لیتر از آن به پلیت های حاوی محیط

#### ۲-۹- تهیه ماست پروبیوتیک غنی شده با

##### نانوامولسیون ها

برای تهیه هر تیمار، ۱ کیلوگرم شیر (۱/۵ درصد چربی) را بر روی حمام بخار قرار داده و بعد از رسیدن به دمای حدود ۴۵ درجه سانتی گراد، پودر شیر پس چرخ را به میزان ۲ درصد و طی چندین مرحله افزوده و عمل اختلاط تا حل شدن کامل انجام شد. هر کدام از تیمارها در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شده و پس از خنک شدن تا دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، دو درصد استارترهای تجاری و یک درصد پروبیوتیک La-5 و غلظت های متفاوتی از نانوامولسیون بهینه مطابق با طرح آماری به فرمولاسیون ها افزوده شد و تا اختلاط کامل همزده شدند، سپس نمونه ها در بندی شدند و به انکوباتور ۴۰ درجه سانتی گراد منتقل

نمونه بعدی را از نظر بافت، طعم، رنگ و بو مورد آزمایش قرار دادند و به هر نمونه امتیازاتی مابین ۱ (فوق العاده ناخوشایند) تا ۹ (فوق العاده خوشایند) دادند.

### ۳- طرح آماری تولید ماست پروبیوتیک حاوی نانوامولسیون موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

در مرحله تولید ماست پروبیوتیک از طرح مرکب مرکزی به کمک فرمولاسیون بهینه نانوامولسیون (میزان امگا سه ۲۵ درصد، مدت زمان نگهداری ۳۵ روز، SOR (۳۹/۲۶۳) درصد و نوع سورفاکتانت توئین ۸۰) با بررسی تاثیر دو فاکتور مستقل شامل غلظت نانوامولسیون افزوده شده و مدت زمان نگهداری به منظور بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و میکروبی ماست پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون های بهینه موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه به تعداد ۱۲ فرمولاسیون استفاده گردید و پس از آنالیز رگرسیون و یا تعیین مدل های مناسب از روش تابع مطلوبیت عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شد.

Table 2 List of experimental design

Run	Factors	
	A:Storage time(day)	B:Concentration(%)
1	11	2/5
2	11	2/5
3	21	5
4	11	0
5	1	0
6	21	0
7	11	5
8	11	2/5
9	11	2/5
10	21	2/5
11	1	5
12	1	2/5

### ۴- نتایج و بحث

#### ۴-۱- آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنج

#### جرمی اسانس موسیر ایرانی

بر اساس آنالیز اسانس موسیر ایرانی با استفاده از دستگاه GC-

کشت MRS-Agar به همراه Oxgall-bile/۰/۱۵ منتقل شد. همه پلیت ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت به صورت هوای گرمخانه گذاری شدند و سپس تعداد پرگنه ها در هر پلیت شمارش گردید [۲۵].

### ۲-۱۲- اندازه گیری میزان آب اندازی (سینرزیس)

در این روش حدود ۴۰-۳۰ گرم نمونه ها با دور ۲۲۲ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ یخچال دار گردید و سینرزیس حاصله به صورت درصد نسبت حجم فاز مایع شفاف جدا شده بر وزن اولیه نمونه ماست محاسبه گردید [۲۶].

### ۲-۱۳- اندازه گیری اسیدیته

اندازه گیری اسیدیته ماست طبق استاندارد ملی ایران شماره های ۶۹۵ و ۲۸۵۲، با تیتراسیون ۱۰ گرم (۵ گرم نمونه + ۵ گرم آب مقطر) توسط محلول سود ۰/۱ نرمال و در حضور معرف فنل فتالین انجام شد [۲۷ و ۲۸].

### ۲-۱۴- اندازه گیری pH

اندازه گیری pH طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۵۲، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با pH متر دیجیتال ( 7110 WTW، آلمان) انجام شد [۲۸].

### ۲-۱۵- اندازه گیری اندیس پراکسید

۵ گرم نمونه در ۳۰ میلی لیتر محلول اسید استیک- کلروفرم (نسبت ۳ به ۲) با افزودن ۰/۵ میلی لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم و پس از گذشت زمان یک دقیقه، با افزودن ۳۰ میلی لیتر آب و در حضور شناساگر نشاسته با محلول سدیم تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیترا شدند [۲۹] و مطابق معادله زیر محاسبه شد.

$$\text{Peroxide index} = (N \times V \times 1000) / M$$

$N$  = نرمالیتیه تیوسولفات سدیم و  $V$  = حجم مصرفی تیوسولفات سدیم و  $M$  = جرم نمونه

### ۲-۱۶- آزمون ارزیابی حسی

آزمون ارزیابی حسی، توسط ۹ نفر ارزیاب چشایی از بین ۳۰ نفر داوطلب انجام شد. در آزمون ارزیابی حسی، نمونه های رمز گذاری شده به ترتیب های مختلفی همراه با یک ورقه ارزیابی در اختیار هر ارزیاب قرار گرفت. ارزیاب ها پس از چشیدن هر نمونه، دهان خود را کاملاً با آب شسته و سپس

سولفید متیل -۲- پروپنیل (۷/۵٪) و ترکیبات کم مقدار اتیل پلارگونئات، لیمونین، تتراسولفید دی-۲- پروپنیل، بوتیل بوتیرات و اتیل اکتانوات بوده است.

mass مطابق کروماتوگرام (شکل ۱) عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس موسیر ایرانی شامل متیل تیومیتیل دی سولفید (۳۸/۱۷٪)، دی آلیل تری سولفید (۲۱/۵٪)، متیل دی سولفید (۱۷/۳۶٪)، دی متیل تری سولفید (۷/۶۲٪)، تری

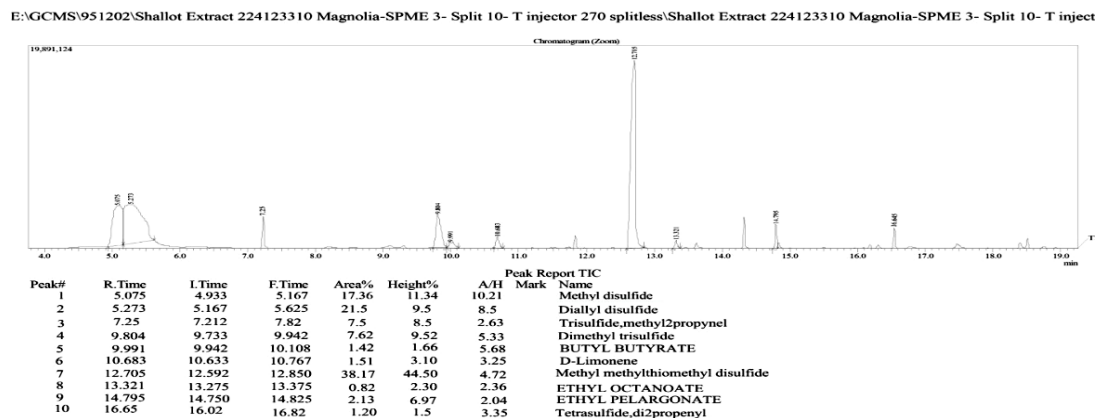


Fig 1 GC-Mass chromatogram of Iranian Shallot essential oil and chemical composition

۰/۸۰۶ و ۰/۷۵۸ بودند. به منظور اطمینان از صحت مدل انتخاب شده مطابق آنالیز واریانس مربوطه شاخص عدم برازش (Lack of fit) معنی دار نبوده که بیانگر این است که مدل مناسب می باشد. مطابق آنالیز واریانس مربوطه اثرات خطی چهار پارامتر مستقل بر اندازه گیری میانگین قطر ذرات نانوامولسیون معنی دار بودند و نوع سورفاکتانت بیشترین تاثیر معنی داری بر میانگین قطر ذرات را نشان داد.

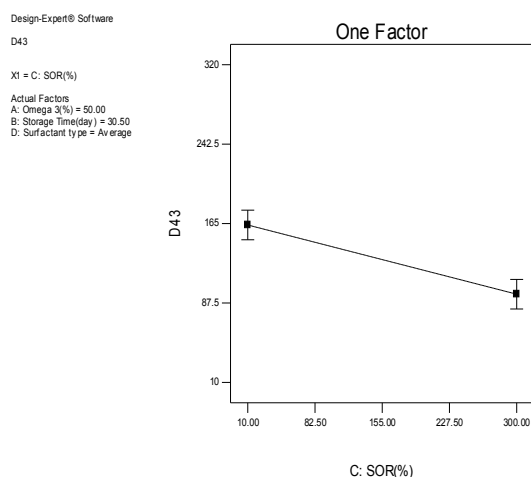


Fig 2 One-factor curve of the effect of SOR% on the D<sub>43</sub>

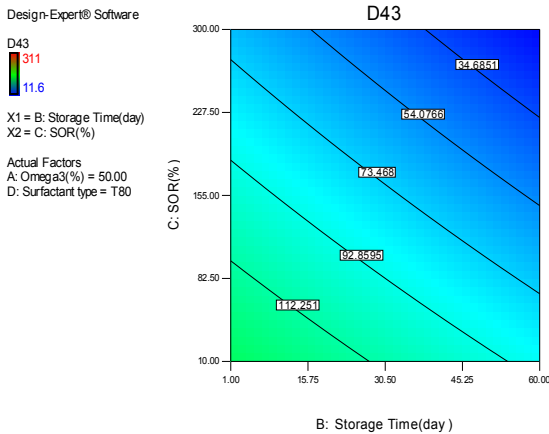
شکل (۲) نمودار تک فاکتور مقدار SOR بر میانگین قطر ذرات در مقادیر ثابت میانی سه پارامتر مستقل را نشان می

## ۴-۲- اندازه گیری میانگین قطر ذرات نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

به منظور بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل (میزان امگا سه، مدت زمان نگهداری، درصد SOR و نوع سورفاکتانت) بر پارامتر تغییرات اندازه گیری میانگین قطر ذرات نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مدل های خطی، درجه دوم، اثرات متقابل و مکعبی برای برازش داده های حاصل از آزمایش اندازه گیری میانگین قطر ذرات مورد استفاده قرار گرفتند. در میان مدل های مذکور مدل خطی چند متغیره مطابق مدل زیر به صورت مناسبی برازش داده شد.

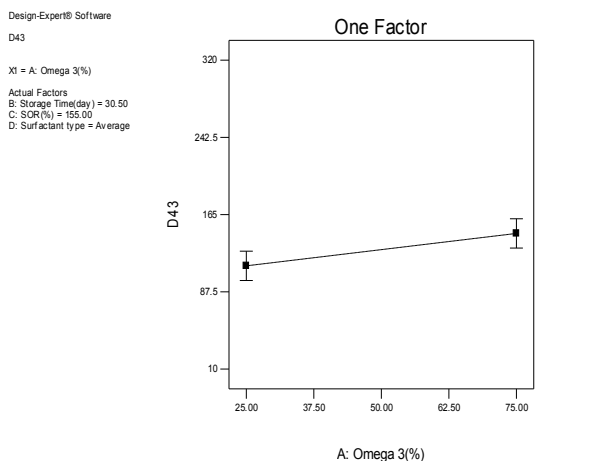
$$D_{43} = 129.8281631 + 16.2569854 A - 19.18796597 B - 33.769680 C + 81.4807526 D_1 + 53.52836822 D_2 + 20.89647531 D_3$$

در معادله فوق ضرایب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس عدد F دارای سطح معنی دار ۱۶/۶۵۱۷۲،  $P < 0.0001$ ، ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب



**Fig 3** Two-dimensional Contour-Plot of storage time and SOR % on  $D_{43}$

همچنین افزایش همزمان در مقدار سورفاکتانت و مدت نگهداری نیز باعث کاهش در اندازه ذرات گردید (شکل ۳)، کاهش اندازه ذرات در طول مدت زمان نگهداری برخلاف برخی نتایج حاصل از تحقیقات قبلی بود [۳۴]. کاهش میانگین قطر ذرات با گذشت مدت زمان نگهداری، پدیده Solubilization یا کاهش اندازه حل شده نامیده شده است. از ابتدا در محیط، میسل های سورفاکتانت حضور داشته اند، این میسل ها به سطح قطرات روغن نزدیک شده و مولکول های روغن را که به سطح قطرات متصل شده، گرفته و به قطرات دیگر متصل می کنند [۳۵].



**Fig 4** One-factor curve of Omega3% on the  $D_{43}$

به بیان دیگر، با گذشت مدت زمان نگهداری، سورفاکتانت های موجود در توده، بخشی از مولکول های موجود در سطح قطرات را جذب می کنند و قطرک های جدیدی می سازند. در پژوهش انجام شده توسط نیز کرسونسیک و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده شد که در مدت نگهداری، قطر قطرات در امولسیون

دهد. همانطور که مشاهده می شود با افزایش مقدار SOR و غلظت سورفاکتانت، میانگین قطر ذرات نانوامولسیون ها بطور معنی داری کاهش یافت. افزایش در مقدار SOR، وجود سورفاکتانت کافی برای پوشاندن کامل سطح ذرات روغن - آب را فراهم نموده است و باعث کاهش کشش سطحی و تولید ذرات ریزتر گردید و با ایجاد ممانعت فضایی و دفعه الکتروستاتیک بالا، از افزایش اندازه ذرات و آمیختن ذرات ممانعت به عمل آمد. این نتیجه با نتایج بوچمال و همکاران (۲۰۰۴)؛ کبری و همکاران (۲۰۱۱)؛ کوماکیو و مک کلمنتز (۲۰۱۵) و تیان و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت [۳۰-۳۳]. همچنین در مقادیر کمتر SOR، غلظت سورفاکتانت برای پوشاندن کامل و اشباع شدن سطح ذرات کافی نبود و نواحی از سطح ذرات فاقد سورفاکتانت بودند، با توجه به اینکه ذرات دارای حرکت براونی (حرکت تصادفی) بوده و تمایل دارند بطور تصادفی در سرتاسر سیستم پراکنده شوند، این ذرات در حین حرکت بطور مکرر با ذرات مجاور خود برخورد کرده و اگر در حین برخورد مناطق تهی از سورفاکتانت در مجاور هم قرار بگیرند، امکان اتصال و افزایش در اندازه ذرات را سبب می شود. اما در صورت اشباع شدن کامل سطح ذرات در صورت برخورد به یکدیگر به علت داشتن یک سد فیزیکی از سورفاکتانت ها بر سطح ذرات، انرژی دفعی از افزایش اندازه ذرات جلوگیری بعمل می آورد. صابری و همکاران (۲۰۱۳) در تولید نانوامولسیون ویتامین E استات به روش خودبخودی نیز دریافتند که با افزایش غلظت سورفاکتانت (SER) از ۱۰ درصد به ۱۷/۵ درصد اندازه قطرات نانوامولسیون از ۱۶۵ نانومتر به ۵۵ نانومتر افزایش یافت. آنها نتیجه گرفتند که افزایش غلظت سورفاکتانت در نانوامولسیون ها سبب افزایش میزان جذب سورفاکتانت به سطح W/O، کاهش بیشتر کشش سطحی و در نهایت اندازه ذرات ریزتر گردید [۲۰].

والکر و همکاران (۲۰۱۵) همچنین نتیجه گرفتند که اندازه ذرات وابستگی زیادی به غلظت سورفاکتانت داشتند، نانوامولسیون های روغن ماهی در SOR (۱/۷۵ - ۱/۲۵)، ذرات کوچک تر با توزیع اندازه باریک تر تشکیل دادند. در SOR های بالاتر ها توزیع ذرات تک مدی بودند [۳۴].



به توزیع اندازه ذرات باریک تر شد و با افزایش در غلظت روغن ماهی اندازه ذرات افزایش داشت [۴۲].

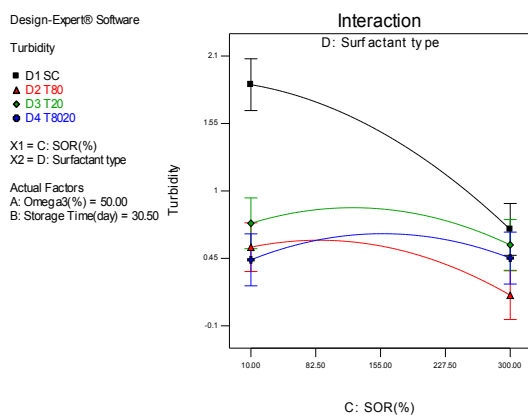
### ۳-۴- اندازه گیری تغییرات کدورت نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی

#### اسیدهای چرب امگا سه

پخش نور توسط قطرات امولسیون میزان کدورت امولسیون را تعیین می کند. ویژگی های نوری نانوامولسیون توسط جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری می شود. آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات میزان کدورت در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\text{Turbidity} = 0.874946482 - 0.032385806 B - 0.209065941 C + 0.592706936 D_1 - 0.335339173 D_2 + 0.007064858 D_3 - 0.3818333567 CD_1 + 0.013730415 CD_2 + 0.18481977 CD_3 - 0.189487662 B^2 - 0.19805145 C^2$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. بر اساس جدول آنالیز واریانس اندازه گیری کدورت، در این مدل F-value معادل ۱۶/۵۰۹ (سطح معنی دار)  $P > 0.0001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده ۰/۸۸۷ و ۰/۸۳۳ می باشند (عدم برازش) Lack of fit این مدل غیر معنی دار می باشد. بنابراین نتایج نشان می دهند که مدل نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی های مورد آزمون را توجیه کند و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرار گیرد.



**Fig 5** Interaction curve of turbidity as a function of SOR% and type of surfactant

همچنین در شکل (۵) نشان داده شد که در اکثر فرمولاسیون ها

مونو دیسپرس به سمت تولید قطرات ریزتر تغییر پیدا کرد [۳۶]. لی و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که در طی نگهداری، بیوپلیمر کیتوزان نظم دوباره گرفته است و اندازه ذرات کاهش می یابد [۳۷].

شکل (۴) تاثیر مقدار امگا سه بر میانگین قطر ذرات در مقادیر میانی ثابت سه پارامتر مستقل دیگر ذرات را نشان می دهد. با افزایش غلظت امگا سه میانگین قطر ذرات نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه افزایش می یابد (۱۶۰/۸۵ ± ۱۰ نانومتر) یافت. بر اساس نتایج پژوهش های لی و همکاران (۲۰۱۵) استفاده از روغن ماهی به تنهایی باعث ویسکوزیته و کشش سطحی بیشتر نسبت به در ترکیب با اسانس ها، باعث می گردد که نانوامولسیون بسختی تشکیل گردد، بنابراین بکارگیری توام با اسانس سبب تولید آسانتر نانو ذرات می شود در نتیجه افزایش مقدار امگا سه میزان ویسکوزیته و کشش سطحی بیشتر شده و اندازه ذرات بیشتر می شود [۳۸]. از طرف دیگر استفاده از اسانس های گیاهی در نانوامولسیون روغن ماهی به منظور پوشاندن عطر و طعم نامطلوب بود، اما به علت محلولیت آبی، امکان وقوع پدیده رسیدگی استوالد وجود داشت، اما با مخلوط کردن مقدار معینی از اسانس های گیاهی با روغن ماهی به عنوان بازدارنده رسیدگی استوالد توانست این پدیده را به تعویق بیندازد. در تایید این نتایج صابری و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که کمترین ویسکوزیته و کشش سطحی مربوط به اسانس های روغنی، MCT و سپس روغن ماهی می باشد و افزایش در اندازه ذرات در نانوامولسیون های حاوی روغن ماهی به تنهایی در مقایسه با نانوامولسیون مخلوط روغن ماهی / اسانس لیمو مشاهده شد [۳۵]. افزایش در مقدار امگا سه به معنای افزایش در ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر مانند تری گلیسیریدهای موجود در روغن ماهی در مقایسه با ترکیبات با وزن مولکولی کمتر اسانس بود، بنابراین سورفاکتانت ها از توانایی کافی جهت پوشش کامل سطح ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر برخوردار نیستند. این نتایج با پژوهش توپیز و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت [۴۰]، محمدی و همکاران (۲۰۱۶) نیز افزایش اندازه ذرات با افزایش مقدار روغن زیتون را گزارش نمودند [۴۱]. گلوئا و همکاران (۲۰۱۴) ضمن بررسی نانوامولسیون روغن ماهی با اسانس لیمو و تری گلیسیرید های متوسط زنجیر نتیجه گرفتند که، غلظت کمتر روغن ماهی منجر

## ۴-۴- اندازه گیری راندمان درون پوشانی

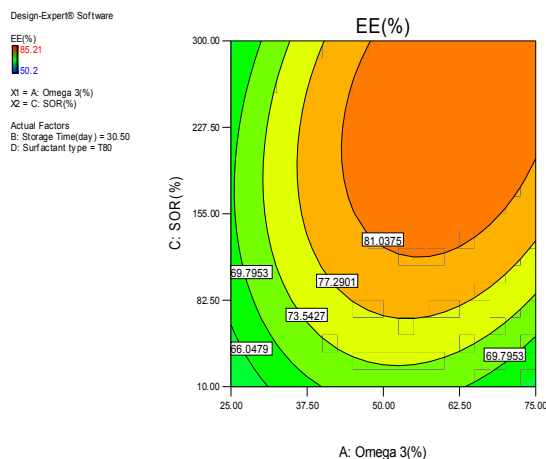
### نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی

#### اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات راندمان درون پوشانی در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\begin{aligned} \text{Encapsulation Efficiency}(\%) = & 77.96555489 + \\ & 0.487290136 A + 4.299379927 C - 7.443909122 \\ & D_1 + 4.2657415042 D_2 - 0.286371369 \\ & D_3 + 3.516814174 AB + 3.6735185 AC - 2.460457422 \\ & AD_1 + 4.280249425 AD_2 - 1.170527672 AD_3 - \\ & 2.605453954 BC - 0.300114916 CD_1 + 0.810430638 \\ & CD_2 + 4.160500924 CD_3 - 8.203480592 A^2 - \\ & 5.523429726 C^2 \end{aligned}$$

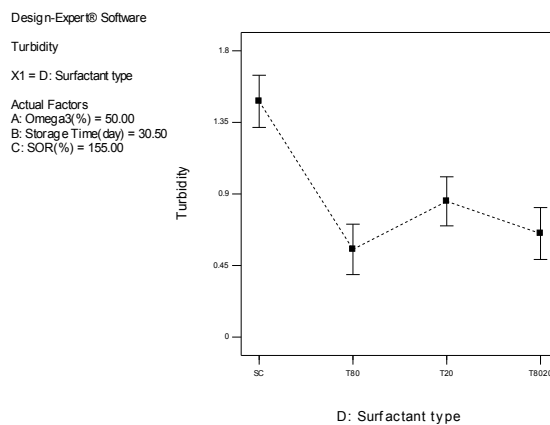
در معادله فوق ضرائب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس راندمان درون پوشانی ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی دار  $P < 0.0001$  Lack of Fit (عدم برازش) غیر معنی دار می باشند. ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۸۶ و ۰/۷۵۰ بودند. نتایج حاصل از این تست ها نشان می دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخش راندمان درون پوشانی را در نمونه ها توجیه نماید.



**Fig 7** Two-dimensional Contour-Plot of SOR % and omega3% on EE(%)

شکل (۷) کانتورپلات دو بعدی مقدار SOR و مقدار امگا سه در مقادیر ثابت مدت زمان نگهداری ۳۰ روز و سورفاکتانت

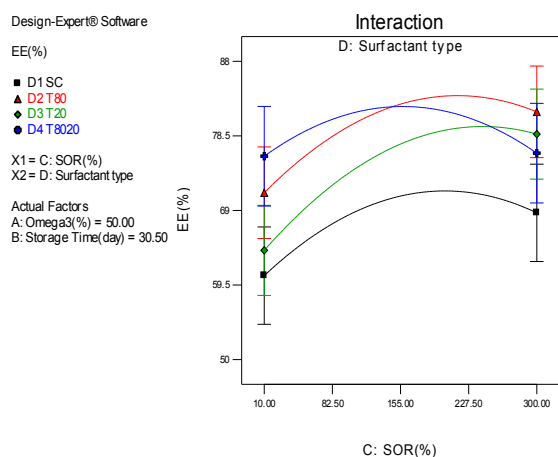
با افزایش غلظت سورفاکتانت، میزان کدورت کاهش یافت، اگر چه تغییرات در حضور سورفاکتانت های ریز مولکولی چندان معنی دار نبود، دلیل اصلی کاهش کدورت با افزایش مقدار SOR، کاهش در میانگین قطر ذرات می باشد، بویژه در نمونه های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم با افزایش مقدار سورفاکتانت میانگین قطر ذرات کاهش داشته و پراکنش نوری در قطرات ریزتر کمتر خواهد بود، این نتیجه با نتایج آزمون اندازه گیری میانگین قطر ذرات مطابقت داشت، همچنین بر اساس تحقیقات راثو و مک کلمنتز (۲۰۱۲)، کاهش میزان کدورت نانوامولسیون ها را با افزایش غلظت سورفاکتانت ها را گزارش نمودند [۴۳].



**Fig 6** The single factor curve of surfactant type on Turbidity

همانطور که در شکل (۶) مشاهده می گردد، کمترین میزان کدورت مربوط به نمونه های حاوی سورفاکتانت های ریزمولکولی به ویژه توئین ۸۰ و مخلوط توئین ها در مقایسه با سورفاکتانت بیوپلیمری کازئینات سدیم بود، زیرا مطابق نتایج آنالیز میانگین قطر ذرات، نمونه های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ کمترین اندازه ذرات را داشتند و با کاهش اندازه ذرات پراکنش نوری کمتر گردیده و در نتیجه میزان کدورت کاهش یافت. در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم میانگین قطر ذرات بیشتر از سایر فرمولاسیون ها بوده و در نتیجه کدورت نمونه ها افزایش داشت. این نتیجه با نتایج دیگر محققین لی و مک کلمنتز (۲۰۱۰) مطابقت داشت [۴۴]. لی و همکاران (۲۰۱۴)، در بررسی نانوامولسیون کورکومین نامحلول در آب نتیجه گرفتند که در حضور سورفاکتانت توئین ۸۰ کدورت کاهش داشت [۴۵].

گردید [۴۶].

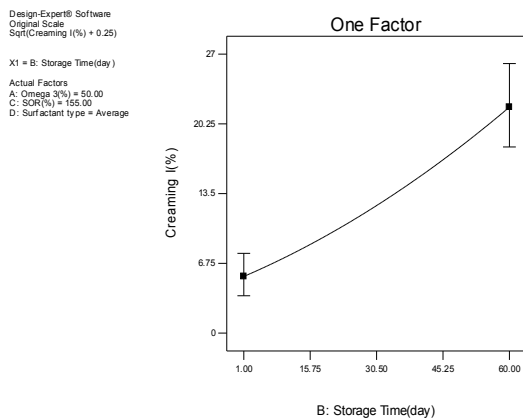


**Fig 8** Interaction curve of EE as a function of SOR % and type of surfactant

مطابق شکل (۸) مشاهده می شود که افزایش درصد سورفاکتانت در تمامی فرمولاسیون ها، میزان راندمان درون پوشانی ابتدا، روند افزایشی و سپس کاهش جزئی داشت. بیشترین میزان راندمان مربوط به نمونه های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و مخلوط توئین ها بود، با افزایش مقدار سورفاکتانت میزان ترکیبات بیواکتیو درون ساختار بیشتر حفظ گردید، اما به دلیل عدم انعطاف پذیری توئین ۲۰ در سطح ذرات احتمال خروج ترکیبات از ساختار نانوامولسیون نسبت به سایر فرمولاسیون ها بود. از طرفی بر اساس نتایج آنالیز میانگین قطر ذرات، هر چه ذرات کوچکتر باشند، پایداری آنها و نگهداری ترکیبات موثر بیشتر خواهد بود و نمونه های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و مخلوط توئین ها ذراتی با اندازه کوچکتر تولید کرده، در نتیجه راندمان درون پوشانی آن نمونه ها بیشتر بود، میزان راندمان درون پوشانی در نانوامولسیون های تهیه شده با کازئینات سدیم، کمتر از نانوامولسیون های تهیه شده با توئین ها بود، زیرا برهمکنش سورفاکتانت کازئینات سدیم با اسانس موسیر ایرانی کافی نبوده و میزان راندمان درون پوشانی کاهش داشت. فراسکارلی و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش نمودند ذرات کوچکتر در امولسیون بیشتر توزیع شده و سبب افزایش راندمان انکپسولاسیون می گردد [۴۷]. سوتیتانوات و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند، افزایش اندازه ذرات باعث افزایش روغن سطحی گردید و کاهش نگهداری دی لیمونین می گردد [۴۸].

توئین ۸۰ بر راندمان درون پوشانی را نشان می دهد. میزان امگا سه تاثیر معنی داری بر راندمان درون پوشانی نداشت، در مقادیر کم میزان امگا سه، افزایش مقدار SOR تاثیری در روند راندمان درون پوشانی نداشت، ولی با افزایش همزمان میزان امگا سه و مقدار SOR راندمان درون پوشانی افزایش داشت، در حالیکه افزایش مقدار SOR در مقادیر بالای امگا سه راندمان درون پوشانی تغییر معنی داری نشان نداد. بیشترین میزان راندمان درون پوشانی در SOR بالای ۱۵۵ درصد و مقدار امگا سه بیشتر از ۵۰ درصد مشاهده شد، بدلیل این که افزایش غلظت سورفاکتانت سطح ذرات را بخوبی پوشانده، از تجمع، هم آمیختگی و نشت اسیدهای چرب به فاز پیوسته جلوگیری می کند. به عبارتی تمایل بخش آبگریز سورفاکتانت به فاز چربی تعیین کننده سرعت عمل آنهاست، تری گلیسیریدهای موجود در روغن ماهی نسبت به ترکیبات موجود در اسانس ها آبگریز تر بوده و بنابراین تحرک سورفاکتانت روی سطح آنها و پوشاندن قطرات بیشتر شده، در نتیجه فاز پراکنده آزاد کمتر می گردد و به عبارت دیگر سورفاکتانت ها با مقدار امگا سه بیشتری پیوند برقرار کرده و باعث افزایش راندمان درون پوشانی می گردد و همچنین به دلیل ماهیت چربی دوستی اسیدهای چرب امگا سه در فاز چربی و یا اسانس های گیاهی مانند اسانس موسیر ایرانی سبب افزایش حلالیت اسیدهای چرب در فاز چربی گردیده و باعث افزایش راندمان درون پوشانی و پایداری شیمیایی بالاتر در برابر هیدرولیز و اکسیداسیون می گردد. البته قابل ذکر است افزایش راندمان دللی بر کاهش اندازه ذرات نیست و در مواردی حتی افزایش راندمان درون پوشانی با افزایش اندازه ذرات همراه بود، در ارتباط با اندازه ذرات، با افزایش مقدار امگا سه، افزایش در اندازه ذرات مشاهده شد، در حالیکه نتایج راندمان درون پوشانی نیز روند افزایشی نشان داد، که علت برهمکنش مثبت میان سورفاکتانت ها با خاصیت آبگریزی بیشتر و امگا سه می باشد که میزان امگا سه بیشتری در ساختار حفظ کرده و تا حدودی می تواند سبب افزایش اندازه ذرات نیز گردید. در غلظت های بالاتر امگا سه بدلیل وقوع پدیده های انبوهش و ادغام می توان سبب نشت امگا سه به بیرون گردد و راندمان کاهش یابد. سیلوا و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان کردند که در میکروانکپسولاسیون لیکوپین با روش کواسرواسیون پکتین-ژلاتین، افزایش غلظت لیکوپین باعث افزایش راندمان

حاوی سورفاکتانت های توئین ۲۰ و مخلوط توئین ۸۰:۲۰ تا SOR (۱۵۵ درصد) افزایش و سپس در SOR های بالاتر کاهش یافت، ولی فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و کازئینات سدیم، با افزایش غلظت سورفاکتانت تا SOR (۱۵۵ درصد) درصد میزان خامه ای شدن ثابت بود و با افزایش بیشتر میزان سورفاکتانت اندیس خامه ای شدن کاهش نشان داد. به عبارتی، پایداری بالاتر نانوامولسیون در برابر پدیده انبوهش بدلیل قطر کوچک آنها بود، زیرا کاهش قدرت نیروی جاذبه نسبت به نیروی دافعه میان سطح ذرات نانوامولسیون، متناسب با کاهش در میانگین قطر ذرات بود، مطابق قانون استوک، با کاهش در اندازه ذرات آهنگ صعود ذرات به سطح نمونه ها کاهش می یابد. بنابراین نمونه های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ نسبت به سورفاکتانت های دیگر قادر به تولید ذراتی با قطر کوچکتر بوده بصورت یکنواختی در کل سیستم پراکنده شدند و در نتیجه میزان خامه ای شدن کاهش یافت. از سوی دیگر، میزان راندمان درون پوشانی با افزایش غلظت سورفاکتانت افزایش داشت، که بیانگر میزان کمتر اسیدهای چرب آزاد در محیط و کاهش در اندیس خامه ای شدن بود، این نتیجه با نتایج کارتیکی و آنالیزهای آنالیزها (۲۰۱۶) مطابقت داشت، آنها گزارش نمودند که کاهش در اندازه ذرات منجر به کاهش اندیس خامه ای شدن و افزایش ثبات نانوامولسیون های روغن جلبک گردیده است [۴۹].



**Fig 10** The single factor curve of storage time on creaming index

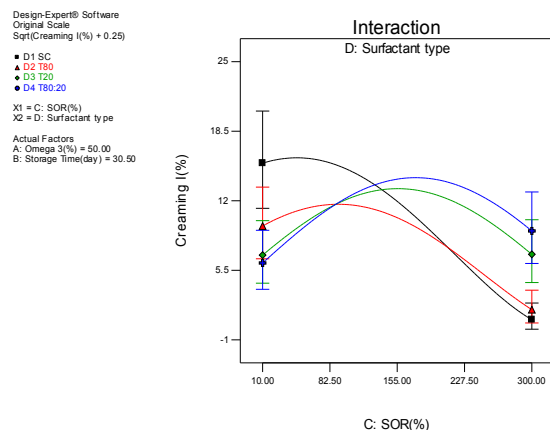
مطابق شکل (۱۰) در مدت زمان نگهداری میزان خامه ای شدن روند صعودی نشان داد. افزایش در اندیس خامه ای شدن توسط مکانیسم های مختلف مانند انبوهش، هم آمیختگی و رسیدگی استوالد توصیف می شود. اگرچه اندازه ذرات در طی مدت زمان نگهداری کاهش داشت، اما بدلیل وجود ذراتی با

## ۴-۵- اندازه گیری تغییرات اندیس خامه ای شدن نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

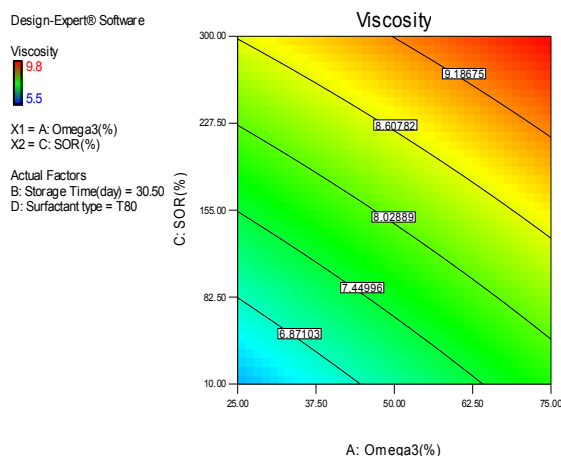
اندیس خامه ای شدن از طریق اندازه گیری ارتفاع لایه خامه ای کدر رنگ بر سطح محلول و دو فاز شدن بر سطح نمونه ها تعیین می شود. آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس خامه ای شدن در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\text{Sqrt}(\text{creaming I}(\%)+0.25)= 3.548137658 + 0.516605596A+1.154602233 B-0.5759735 C-0.056359561D_1-0.2823265D_2+0.0109573815 D_3-0.733050515 AD_1-0.021803485 AD_2+0.380040322AD_3-0.944084195CD_1-0.345101935CD_2+0.514364401CD_3-0.973684008C^2$$

در معادله فوق ضرایب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. باتوجه به جداول آنالیز واریانس میزان اندیس خامه ای شدن ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای F-value معادل ۱۲،  $P < 0.0001$  Lack of Fit (عدم برازش) غیرمعنی دار، ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۹۶ و ۰/۸۲۰ می باشند. نتایج حاصل از این تست ها نشان می دهد، مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است، به طور رضایت بخش مقدار خامه ای شدن را در نمونه ها توجیه نماید.



**Fig 9** Interaction curve of creaming index as a function of SOR % and type of surfactant همانطور که در شکل (۹) نشان داده شده است، با افزایش مقدار SOR، میزان اندیس خامه ای شدن در فرمولاسیون های



**Fig 11** Two-dimensional Contour-Plot of omega3% and SOR % on viscosity

همچنین افزایش میزان برخورد قطرات به یکدیگر سبب افزایش ویسکوزیته فاز پیوسته می گردد، این نتایج با نتایج اندازه گیری میانگین قطر ذرات و کدورت همخوانی دارد، به عبارتی با کاهش در اندازه ذرات در حضور غلظت های بیشتر سورفاکتانت، حرکت براونی ذرات بر نیروهای جاذبه غلبه کرده و سبب افزایش ویسکوزیته می گردد این نتایج با نتایج پژوهش لی و همکاران (۲۰۱۴) و لیانگ و همکاران (۲۰۱۴) نیز مطابقت داشت [۵۱ و ۵۲]. ماهرو همکاران (۲۰۱۵) نتیجه گرفتند، با افزایش غلظت پروتئین بتا کازئین، ویسکوزیته نانوامولسیون ها افزایش نشان داد که علت را افزایش برهمکنش پروتئین-پروتئین در فاز پیوسته می دانند [۵۳]. چیونگ و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که نانوامولسیون روغن کناف با بیشترین مقدار سورفاکتانت کازئینات سدیم بیشترین میزان ویسکوزیته را داشت [۵۴].

#### ۶-۷- بهینه سازی اجزای تشکیل دهنده

##### نانوامولسیون

به منظور بهینه سازی پاسخ های موثر در تولید نانوامولسیون حاوی اسیدهای چرب امگا سه از روش تابع مطلوبیت استفاده شد. در روش تابع مطلوبیت، مطلوبیت آماری بین صفر و یک است و سطح پایین آن نشان دهنده عدم دستیابی به هدف مورد نظر می باشد و سطح بالای آن نشان دهنده برآورده شدن کامل هدف مورد نظر می باشد. وقتی هدف، بهینه سازی چندین پاسخ به طور همزمان باشد، مطلوبیت هر یک از پاسخ ها تعیین شده و میانگین هندسی آن ها به عنوان شاخص برآورده شدن همزمان هدف ها مورد استفاده قرار می گیرد. شرایط بهینه برای

اندازه های ناهمگون و وجود مناطق بدون سورفاکتانت احتمالی بر سطح ذرات بود، که در اثر حرکات تصادفی ذرات با همدیگر تصادم کرده، مناطق تهی از سورفاکتانت به همدیگر متصل شده و پدیده انبوهش در طی مدت زمان نگهداری صورت می گیرد. البته پدیده انبوهش که نوعی توده ای شدن برگشت پذیر بوده که با وارد کردن مقدار کم انرژی، مانند تکان دادن بازگرداندن ذرات امکان پذیر می باشد نسبت داده شود. مطابق با پژوهش گورا-رزا و همکاران (۲۰۱۶) نیز نتیجه گرفتند، با گذشت مدت زمان نگهداری، اندازه ذرات پونه و آویشن افزایش داشتند که علت پدیده رسیدگی استوالد بود، زیرا ترکیبات کاراواوکرول موجود در اسانس ها محلولیت آبی بسیار بالایی داشتند [۵۰].

#### ۶-۴- ویسکوزیته ظاهری نانوامولسیون اسانس

##### موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

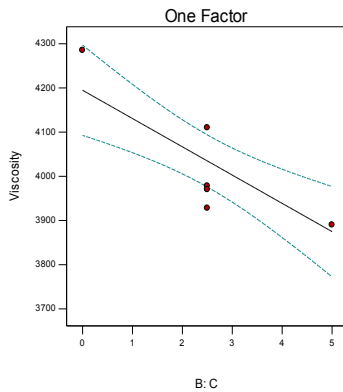
اندازه گیری ویسکوزیته یک پارامتر بسیار مهم در تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی دیسپرسیون های کلوئیدی می باشد، معمولا ویسکوزیته نانوامولسیون ها و میکروامولسیون ها بزرگتر از امولسیون های معمولی هستند، چون لایه سطحی بزرگتر در اطراف ذرات کوچکتر احاطه شده است. آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات ویسکوزیته ظاهری در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

##### Viscosity(cp)=

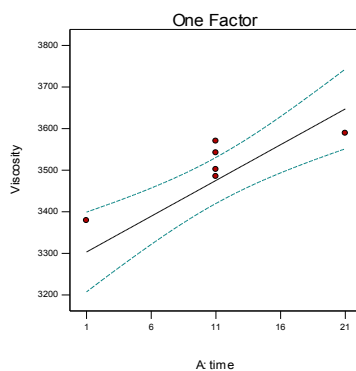
$$8.08+0.17B+1.09C+0.41D_1+0.33D_2-0.022D_3$$

در معادله فوق ضرایب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۷۸۱ و ۰/۷۳۰ بودند. به منظور اطمینان از صحت مدل انتخاب شده مطابق جدول آنالیز واریانس مربوطه شاخص عدم برازش (Lack of fit) معنی دار نبوده که بیانگر این است که مدل مناسب می باشد.

شکل (۱۱) نشان می دهد، با افزایش در مقدار SOR و مقدار امگا سه، ویسکوزیته ظاهری بطور معنی داری افزایش یافت. در حقیقت، با افزایش مقدار فاز روغنی و سورفاکتانت، فراکسیون حجمی ذرات بالاتر رفته و سبب افزایش ضخامت لایه بین سطحی باعث افزایش ویسکوزیته ظاهری می گردد، سرعت حرکت فاز پراکنده به سطوح بالایی را کاهش می دهد.



**Fig 12** The single factor curve of NE concentration on Viscosity of probiotic yogurt



**Fig 13** The single factor curve of storage time of NE on Viscosity of probiotic yogurt

با افزایش غلظت نانوامولسیون افزوده شده به ساختار ماست میزان ویسکوزیته ظاهری کاهش یافت (شکل ۱۲)، که علت اصلی افزوده شدن مقداری آب به فرمولاسیون ماست می باشد. به نظر میرسد، افزایش میزان نانوامولسیون های به نمونه های ماست به علت تاثیر بر روی آنزیم های پروتئولیتیکی و تخریب شبکه پروتئینی بر روی کاهش ویسکوزیته آن تاثیر معنی داری داشت. میانگین ویسکوزیته ظاهری در ماست های غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی (۴۱۰۶/۸۵۱ سانتی پواز) بود. آلفارو (۲۰۱۲) گزارش نمود که ویسکوزیته ماست منجمد محتوی نانوامولسیون روغن سبوس برنج ارغوانی، مشابه نمونه های کنترل بود و تفاوت معنی داری با ویسکوزیته ماست معمولی نداشت [۵۵]. همانطور که در شکل (۱۳) نشان داده شده است، میزان ویسکوزیته ظاهری نمونه های ماست پروبیوتیک حاوی نانوامولسیون ها در طول مدت زمان نگهداری افزایش یافت، علت افزایش در ویسکوزیته ظاهری در طی مدت زمان نگهداری، افزایش برهمکنش های

تک تک پاسخ ها را نمی توان به عنوان الگوی مناسب در نظر گرفت. زیرا شرایط بهینه برای یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر شرایط نامساعدی ایجاد کند. بنابراین باید شرایطی را به عنوان الگوی ساخت معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ ها را به نحو رضایت بخشی بهینه نماید به منظور بهینه سازی توام، ابتدا اهداف بهینه سازی مشخص گردید. یعنی پارامترهای میانگین قطر ذرات، شاخص کدورت، اندیس خامه ای شدن، ویسکوزیته ظاهری در کمینه و راندمان درون پوشانی در بیشینه در نظر گرفته شدند، نتایج حاصل از بهینه سازی در نرم افزار Design Expert با استفاده از بهینه سازی عددی به ترتیب، میزان امگا سه ۲۵ درصد، مدت زمان نگهداری ۳۵ روز، SOR (۲۶۳/۳۹) درصد و نوع سورفاکتانت توئین ۸۰ تعیین شدند و بعنوان فرمولاسیون بهینه در تولید ماست پروبیوتیک استفاده گردید، پاسخ های بهینه شامل، میانگین قطر ذرات (۴۵/۳۳ نانومتر)، اندیس پراکسید (۰/۸۷ میلی اکی والان بر کیلوگرم روغن)، اندیس خامه ای شدن (۶/۸۷ درصد)، کدورت (۰/۳۳) و ویسکوزیته ظاهری (۶/۸۵) با مطلوبیت ۰/۸ تخمین زده شد.

#### ۴-۸- تغییرات ویسکوزیته ظاهری ماست

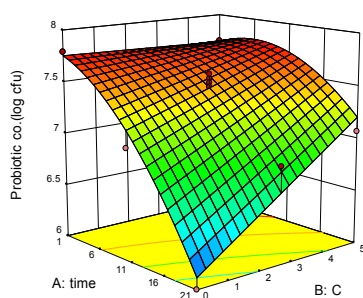
##### پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که مقدار ویسکوزیته ظاهری در نمونه های ماست پروبیوتیک موسیرایرانی بصورت زیر توصیف کرد.

$$\text{Viscosity(cp)} = 4034.833 - 160B$$

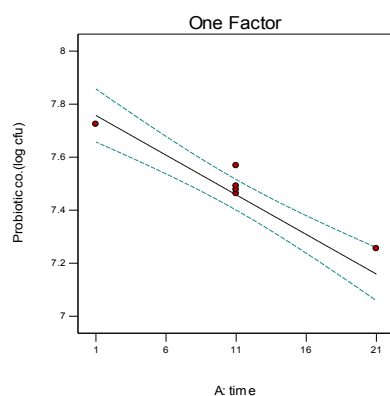
در معادله فوق ضریب B نشانگر غلظت نانوامولسیون می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس ویسکوزیته ظاهری، مدل نهایی دارای سطح معنی دار  $P < 0.001$  Lack of Fit، غیر معنی دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده موسیر ایرانی به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۶۲ می باشند. نتایج حاصل از این تست ها نشان می دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است، به طور رضایت بخش مقدار ویسکوزیته ظاهری را در نمونه ها توجیه نماید. در این تحقیق اثر خطی و غلظت نانوامولسیون افزوده شده بر میزان ویسکوزیته ظاهری معنی دار بود.





**Fig 14** 3-dimensional Contour-Plot of storage time and concentration of NE on probiotic count

همانطور که در شکل (۱۴) مشاهده می شود، با افزایش غلظت نانوامولسیون و گذشت مدت زمان نگهداری به ترتیب جمعیت پروبیوتیک ها افزایش و کاهش نشان دادند، بکارگیری نانوامولسیون حاوی موسیر ایرانی تاثیر معنی داری بر رشد و فعالیت میکروارگانیسم های پروبیوتیک و باکتری های مولد اسیدلاکتیک موجود در استارتر داشتند، که علت افزایش مواد مغذی موجود در نانوامولسیون ها جهت تقویت رشد میکروارگانیسم ها می باشد و همچنین بر خلاف انتظار، اثر بازدارندگی ترکیبات موجود در اسانس ها بر سایر میکروارگانیسم های مزاحم و کاهش رقابت آن ها با میکروارگانیسم های پروبیوتیک می تواند از عوامل تقویت کننده رشد باکتری های پروبیوتیک باشد. ال ناوایی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که افزایش اسانس آویشن باعث افزایش رشد لاکتوباسیلوس ها در نمونه های لینه گردید [۵۸]. دانکر و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که با افزایش مقدار کازئینات سدیم و عصاره نعنای تعداد این باکتری افزایش یافت [۱۷].



**Fig 15** The single factor curve of storage time of NE on probiotic count

پروتئین- پروتئین در ساختار شبکه ای ماست می باشد. این نتایج با نتایج پژوهش کاپلا و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت داشت [۵۶]. ژونگ و همکاران (۲۰۱۸) نتیجه گرفتند که غنی سازی ماست با نانوامولسیون گاما اوریزانول باعث کاهش ویسکوزیته ظاهری گردید [۵۷].

#### ۹-۴- شمارش جمعیت پروبیوتیک ماست

##### پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

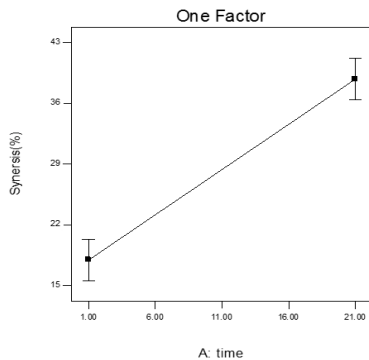
یکی از ویژگی های بسیار مهم در مورد میکروارگانیسم های پروبیوتیک زنده ماننی و بقای آنها در محصولات می باشد. رشد و زنده ماننی میکروارگانیسم های پروبیوتیک متاثر عوامل بسیاری از جمله نوع و گونه پروبیوتیک، سطح تلقیح، دمای انکوباسیون، pH، رشد عوامل تحریک کننده و بازدارنده ها، زمان نگهداری، غلظت متابولیت ها و در دسترس بودن مواد مغذی می باشند. آنالیز داده ها نشان داد که شمارش پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) در نمونه های ماست پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$\text{probiotic co}=7.471476-0.53889A+0.26716B+0.286814AB-0.27183A^2$$

در معادلات فوق ضرائب A, B به ترتیب نشانگر مدت زمان نگهداری و غلظت نانوامولسیون می باشند. چنانکه در جدول آنالیز واریانس شمارش جمعیت پروبیوتیک نشان داده شده، با توجه به اینکه این مدل ها برای نمونه های غنی شده با نانوامولسیون اسانس های موسیر ایرانی به ترتیب دارای F-value معادل ۳۰/۶۵۵۲۵ (سطح معنی دار)، ۰/۰۰۰۱، Lack of fit, P < غیر معنی دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده ۰/۹۴۵، ۰/۹۱۵ می باشد. نتایج نشان می دهد که مدل نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی، تغییرات ویژگی های مورد آزمون را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرار گیرد.

$$\text{Syneris(\%)} = 28.37667 + 10.418333A - 1.47B - 1.4625AB$$

در معادلات فوق ضرائب A، B به ترتیب نشانگر مدت زمان نگهداری و غلظت نانوامولسیون می باشند. مطابق آنالیز واریانس سینریزس در نمونه های غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه، F-value معادل ۲۶/۸۰۹۲ (سطح معنی دار)،  $P < 0.0001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۷۵، ۰/۹۰۹ می باشند و Lack of fit این مدل ها غیر معنی دار می باشد.



**Fig 16** The single factor curve of storage time of NE on syneris of probiotic yogurt

همانطور که در شکل (۱۶) مشاهده می شود با گذشت مدت زمان نگهداری، میزان سینریزس نمونه ها افزایش معنی داری داشت، که بدلیل، کاهش pH و افزایش اسیدیته در طی دوران نگهداری در نتیجه خروج آب از ساختار شبکه ای ماست می باشد، به بیان دیگر، بازآرایی شبکه کازئینی به علت تغییر در میزان اسیدیته ماست می تواند منجر به آب اندازی شود. همچنین، با توجه به زنده ماننی و فعالیت باکتری های پروبیوتیک و آغازگر ماست در حین نگهداری در یخچال و در نتیجه هیدرولیز و هضم پروتئین های محصول توسط آنها، با گذشت مدت زمان نگهداری، میزان سینریزس افزایش می یابد. چرا که پروتئین های عامل بافت مطلوب خاصیت خود را از دست داده و پیوند با آنها گسسته می شود. وحیدی و مظاهری (۲۰۰۸) نیز افزایش اسیدیته در طول نگهداری را عامل افزایش سینریزس ماست عنوان کردند [۶۲]. همچنین محققین گزارش کردند که در زمان های نخست نگهداری با افزایش مقدار عصاره نعناع و به دنبال آن افزایش سوبسترای در دسترس جهت رشد میکروارگانیسم ها، فعالیت متابولیکی باکتری افزایش یافته و موجب کاهش pH و افزایش اسیدیته در نمونه

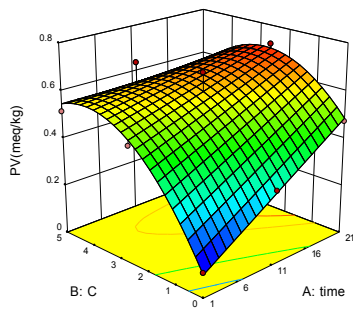
در مطالعه حاضر تعداد باکتریهای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تمامی نمونه ها، طی نگهداری در یخچال از روز اول تا روز بیست و یکم روند کاهشی داشت (شکل ۱۵)، از جمله سایر عوامل مؤثر بر کاهش تعداد باکتریهای پروبیوتیک طی مدت زمان نگهداری در یخچال می توان به تغییرات اسیدیته، تولید متابولیت هایی نظیر: اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن توسط باکتریهای سنتی ماست و همچنین محدودیت دسترسی به مواد مغذی در محیط اشاره کرد. لازم به ذکر است که در تمامی تیمارها تعداد باکتریهای پروبیوتیک مورد مطالعه در هر گرم از فرآورده تولید شده بیشتر از حداقل توصیه شده در یک فرآورده پروبیوتیک  $10^6$  باکتری در هر گرم بود. بنابراین می توان ادعا نمود که تمامی نمونه ها تا روز ۲۱ نگهداری در یخچال خواص مفید یک فرآورده پروبیوتیک را داشتند. محققین در بررسی بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در ماست حاوی (ABY) تهیه شده از کشت های تجاری بیفیدوباکتریوم لاکتیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و باکتریهای سنتی ماست تولید پراکسید هیدروژن توسط لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریگوس و محدودیت دسترسی به مواد مغذی در محیط را از عوامل مهم کاهش میزان باکتریهای پروبیوتیک گزارش نمودند [۵۹]. در تحقیقی، قابلیت بقای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در بیو ماست حاوی غلظت های مختلفی از متا پپیریتا و کاکوتی از خانواده نعناعیان بعد از ۷ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به طور قابل توجهی کاهش یافت [۶۰]. شهادی و همکاران (۲۰۱۵)، کاهش جمعیت باکتریهای پروبیوتیک در طی زمان را نتیجه گرفتند [۶۱].

#### ۴-۱۰- تغییرات میزان سینریزس ( آب اندازی)

##### ماست پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

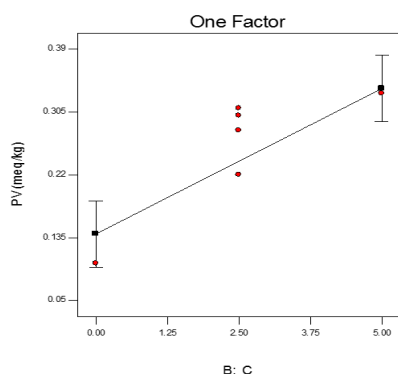
یکی دیگر از فاکتورها مهم در تعیین کیفیت ماست میزان آب اندازی (سینریزس) می باشد. میزان آب اندازی به میزان پروتئین، نسبت پروتئین آب پنیر به کازئین، ماده خشک، میزان چربی، پیش تیمار حرارتی، هموزنیاسیون و نوع استارتر بکار رفته شده در تهیه ماست بستگی دارد. آنالیز داده های آزمایش نشان داد که معادله میزان آب اندازی (سینریزس) در ماست پروبیوتیک حاوی نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه بصورت زیر توصیف کرد.





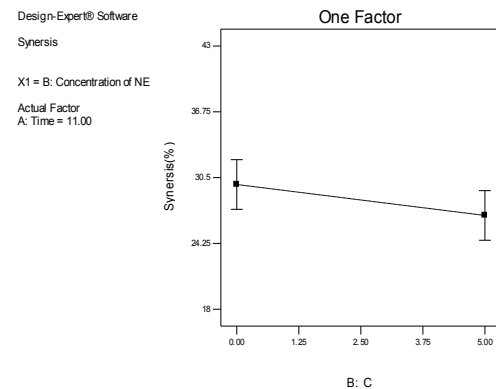
**Fig 18** 3-dimensional Contour-Plot of storage time and concentration of NE on Peroxide value

همانطور که در شکل (۱۸) نشان داده شده است، اندیس پراکسید در نمونه های حاوی نانومولسیون ها نسبت به نمونه های شاهد در طول ۲۱ روز نگهداری افزایش معنی داری یافت. قابل ذکر است که در مقایسه با نمونه های حاوی روغن ماهی بدون انکپسوله شده میزان اندیس پراکسید کمتر بود. بی (۲۰۰۸) نتایج مشابهی را گزارش دادند، که افزودن روغن ماهی انکپسوله شده درون پنیر، سبب کاهش اندیس های پراکسید و تیوباریتوریک در طی ۳۵ روز نگهداری، در مقایسه با نمونه های حاوی روغن ماهی بدون انکپسولاسیون گردید [۶۶]. توکلی و همکاران (۲۰۱۸) گزارش نمودند، در نمونه های ماست شاهد در طی بیست و یک روز نگهداری بدلیل داشتن اسیدهای چرب غیراشباع اندیس پراکسید افزایش داشت و همچنین نمونه های حاوی نانولیپوزوم اسیدهای چرب امگا سه نسبت به نمونه های کنترل اندیس پراکسید ۱/۸ برابر بیشتر گردید [۶۷].



**Fig 19** The single factor curve of concentration of NE on Peroxide value

های حاوی عصاره گردیده و در نتیجه سینریزس افزایش یافت [۶۳].



**Fig 17** The single factor curve of NE concentration on synersis of probiotic yogurt

همانطور که در شکل (۱۷) مشاهده می شود، با افزایش غلظت نانومولسیون ها میزان سینریزس کاهش داشت، علت آن بالا رفتن ظرفیت نگهداری آب توسط بکارگیری سورفاکتانت ها و برهمکنش با مولکول های آب می باشد و نیز افزایش ماده خشک شیر در اثر افزودن سورفاکتانت ها می باشد. این پژوهش با پژوهش امیروندی و صاحی نیا (۲۰۱۱) مطابقت داشت [۶۴]. در مطالعه ای انجام شده توسط قربانزاده و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که لستین افزوده شده در نانولیپوزوم سبب جذب آب و کاهش میزان سینریزس ماست غنی شده با نانولیپوزوم اسیدهای چرب امگا سه گردید [۶۵].

#### ۴-۱۱- تغییرات اندیس پراکسید در ماست

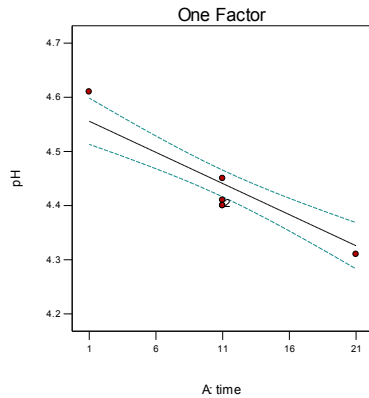
##### پروبیوتیک غنی شده با نانومولسیون

آنالیز داده ها نشان داد که تغییرات اندیس پراکسید در نمونه های ماست پروبیوتیک غنی شده با نانومولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

$$PV(\text{meq/kg}) = 0.603333 + 0.1A + 0.13B - 0.1AB - 0.18B^2$$

در معادلات فوق ضرائب A، B به ترتیب نشانگر مدت زمان نگهداری و غلظت نانومولسیون می باشند. در این مدل F-value معادل ۲۵/۰۴۲۳۳ (سطح معنی دار)،  $P < 0.0001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده موسیر ایرانی به ترتیب ۰/۹۳۴، ۰/۸۹۷ باشند و Lack of fit این مدل غیر معنی دار می باشد.

مراحل نگهداری یخچالی میزان ناچیزی اسید تولید می کنند. اما باکتریهای سستی ماست از جمله استرپتوکوکوس تروفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس برخلاف باکتری های پروبیوتیک حتی در طی نگهداری یخچالی نیز فعالیت دارند و از طریق تخمیر لاکتوز مقداری اسید لاکتیک تولید می کنند که باعث کاهش قابل توجهی pH در حین نگهداری می شوند.



**Fig 20** The single factor curve of storage time and NE concentration on pH

این مسئله باعث پدیده بیش اسیدی شدن در محصولات حاوی باکتریهای سستی ماست طی نگهداری می شود بیش اسیدی شدن یکی از دلایل افت شدید پروبیوتیک ها طی نگهداری در ماست و محصولات مشابه است. میانگین تغییرات pH در ماست های حاوی نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی (۴/۴۴) بود. قربانزاده و همکاران (۲۰۱۷) کاهش pH در ماست حاوی نانولیپوزوم های اسیدهای چرب امگا سه را در طول مدت زمان نگهداری را گزارش نمودند. همچنین بیان کردند که در نمونه های شاهد نسبت به نمونه های انکپسوله شده تغییرات pH و اسیدیته شدیدتر بود زیرا ساختار کپسوله کردن تاثیر محافظتی بر سیستم داشت [۶۵].

#### ۴-۱۳- اندازه گیری تغییرات اسیدیته در ماست

##### پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

آنالیز داده ها نشان داد که تغییرات اسیدیته در نمونه های ماست پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی بصورت زیر توصیف کرد.

$$\text{Acidity} = 97.33 + 9A$$

در معادلات فوق ضریب A نشانگر مدت زمان نگهداری می باشد. مطابق آنالیز واریانس اسیدیته نمونه های حاوی اسانس موسیر ایرانی در این مدل ها F-value معادل ۲۶/۶۰۵۸۴ و (سطح معنی دار)،  $P < 0/0001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح

همچنین با افزایش غلظت نانوامولسیون افزوده شده (شکل ۱۹)، به علت افزایش میزان اسیدهای چرب غیر اشباع میزان اندیس پراکسید افزایش داشت. از طرف دیگر افزایش اندیس پراکسید در نمونه های حاوی اسیدهای چرب بدون انکپسوله شدن نسبت به نمونه های حاوی اسیدهای چرب امگا سه انکپسوله شده بیشتر بوده است (بیشتر از ۰/۸ میلی اکسی بر کیلوگرم) در مقایسه با ۰/۴ میلی اکسی بر کیلوگرم) که اشاره همچنین مطابق پژوهش نیلسن و همکاران (۲۰۰۹)، که اشاره کردند ماست به عنوان یک ترکیب لبنی، عامل پایدار اکسایشی بالای امولسیون های غنی شده با روغن ماهی بود و این ترکیب می تواند از اسیدهای چرب چند غیراشباعی امگا سه در برابر تخریب اکسایشی حفاظت کند [۶۸]. از سوی دیگر دلایل پایداری بیشتر نانوامولسیون های روغن ماهی درون ساختار ماست شامل: اولی اینکه، کاهش pH در ماست سبب افزایش محلولیت یونهای فلزی و در پایداری اکسیداتیوی موثر باشد، دوم اینکه، کاهش pH سبب افزایش دافعه الکتروستاتیکی شده و در نتیجه منجر به افزایش پایداری نسبت به اکسیداسیون گردید و سوم، با کاهش pH و تجزیه پروتئین ناشی از آن، بیوپپتیدهایی با فعالیت آنتی اکسیدانی مانند فسفوپپتید بیواکتیو بدست آمده که می تواند سبب پایداری بیشتر در برابر اکسیداسیون گردد.

#### ۴-۱۲- اندازه گیری تغییرات pH در ماست

##### پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

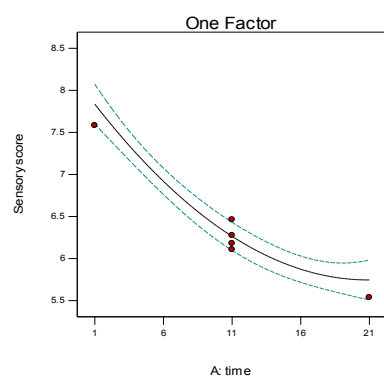
آنالیز داده ها نشان داد که تغییرات pH در نمونه های ماست پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی بصورت زیر می توان توصیف کرد.

$$\text{pH} = 4.330833 - 0.17667 A$$

در معادلات فوق ضریب A نشانگر مدت زمان نگهداری می باشند. مطابق آنالیز واریانس، در این مدل F-value معادل ۸۸/۲۲۹۲۹ (سطح معنی دار)،  $P < 0/0001$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده ۰/۸۸۸ و ۰/۸۲۷ می باشند و عدم برآزش مدل ها غیر معنی دار می باشد.

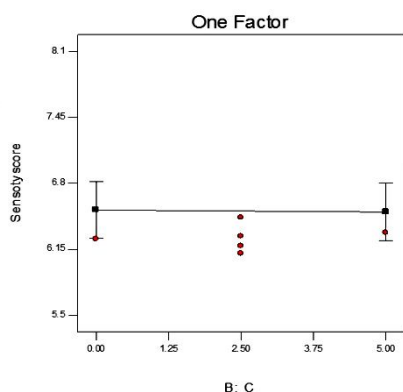
همانطور که در شکل (۲۰) مشاهده می گردد، میزان pH نمونه ها در طول مدت زمان نگهداری کاهش معنی دار داشت، میزان pH در دوران نگهداری بین ۴-۶/۶ بود، به طور کلی باکتری های پروبیوتیک از جمله باکتریهای لاکتیکی هستند که در

در معادلات فوق ضرائب B.A نشانگر مدت زمان نگهداری و غلظت نانوامولسیون افزوده شده می باشند. بر اساس آنالیز واریانس ارزیابی حسی نمونه های غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی در این مدل F-value معادل ۱۱۲/۵۰۶۷ (سطح معنی دار)،  $P < ۰/۰۰۰۱$ ، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده ۰/۹۶۱، ۰/۹۵۳ می باشند و Lack of fit این مدل غیر معنی دار می باشد.



**Fig 22** The single factor curve of storage time on sensory evaluation

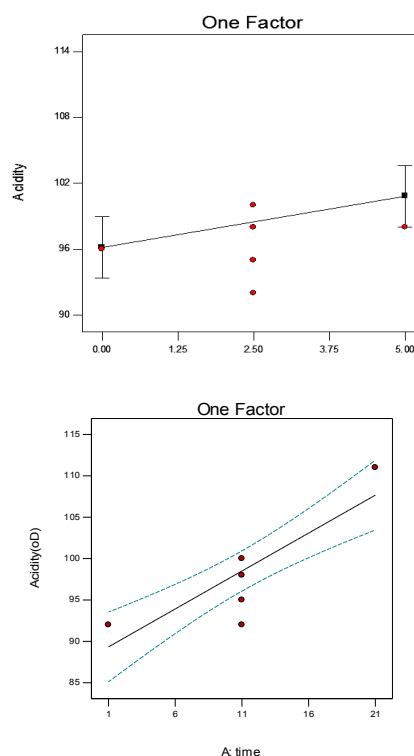
همانطور که در شکل (۲۲) مشاهده می شود در طول مدت زمان نگهداری امتیاز حسی کاهش نشان دادند، امتیاز حسی میانگینی از عطر، طعم، بافت و رنگ بود که برخی از این ویژگی ها با گذشت مدت زمان نگهداری کاهش یافت. قربانزاده و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش امتیازات حسی در ماست غنی شده با نانولیپوزوم حاوی روغن ماهی را گزارش کردند [۶۵].



**Fig 23** The single factor curve of storage time on sensory evaluation

در نمونه های حاوی اسانس موسیر ایرانی افزایش در غلظت نانوامولسیون ها امتیازات حسی تغییر معنی داری نداشت (شکل ۲۳) و عبارتی مورد پسند ارزیاب های حسی قبول گرفتند، از لحاظ بافتی نمونه های حاوی نانوامولسیون به علت جذب

شده ۰/۷۹۸ و ۰/۷۵۷ می باشند و Lack of fit این مدل غیر معنی دار می باشد.



**Fig 21** The single factor curves of NE concentration and storage time on Acidity

همانطور که در شکل (۲۱) مشاهده شده است در طول مدت زمان نگهداری میزان اسیدیته افزایش یافت و این تغییرات با تغییرات pH همخوانی داشته است. در طی مدت زمان نگهداری، بدلیل بیش اسیدی شدن حاصل از فعالیت استارترها میزان اسیدیته افزایش داشت. میانگین اسیدیته میان نمونه های ماست غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی (۹۴/۲۷ درجه دورنیک) بود. با افزایش غلظت نانوامولسیون ها میزان اسیدیته با سرعت کمتری افزایش داشت (شکل ۲۱)، به علت قرارگیری ذرات روغن در پوشش سورفکتانتی برهمکنش میان روغن با عوامل تسریع کننده اکسیداسیون به حداقل رسانیده و تا حدودی از افزایش بیشتر اسیدیته ممانعت بعمل آمد.

#### ۴-۱۴- ارزیابی حسی ماست پروبیوتیک غنی

##### شده با نانوامولسیون

آنالیز داده ها نشان داد که ارزیابی حسی در نمونه های ماست پروبیوتیک را می توان با معادله در نمونه های غنی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه به ترتیب زیر توصیف کرد.

$$\text{Sensory score} = 6.626458 - 1.045A + 0.52625A^2$$

مدت زمان نگهداری بر ویژگی های نانوامولسیون ها بررسی شدند و سپس در مرحله دوم فرمولاسیون های بهینه نانوامولسیون ها در ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس با مطلوبیت ۸/۰ بصورت مدت زمان نگهداری ۱۵ روز و غلظت نانوامولسیون ۱/۴ درصد تعیین شد، بطور کلی نتایج نشان دادند، که با افزایش غلظت سورفاکتانت، به علت کاهش میانگین قطر ذرات، پراکنش نوری کاهش یافته و میزان کدورت کاهش یافت، که بیانگر مناسب بودن بکارگیری نانوامولسیون مورد نظر در سیستم های شفاف غذایی می باشد، و مطابق قانون استوک به علت کاهش در اندازه ذرات، میزان اندیس خامه ای شدن و صعود ذرات چربی بر سطح نمونه ها کاهش یافت. همچنین ساختار نانوامولسیون و استفاده از اسانس های گیاهی سبب پوشاندن بوی نامطلوب روغن ماهی گردید، در غنی سازی ماست پروبیوتیک با نانوامولسیون ها، در طول مدت زمان نگهداری، هیچگونه تاثیر منفی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی ماست نداشت، در حضور نانوامولسیون و اسانس موسیر ایرانی، رشد جمعیت پروبیوتیک افزایش یافت، همچنین نمونه های ماست غنی سازی شده با نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه در مقایسه با نمونه های شاهد امتیازات حسی بیشتری داشتند، بنابراین بکارگیری روش کم انرژی امولسیفیکاسیون خودبخودی در این تحقیق، در تولید نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه، از نظر بهبود کیفی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و افزایش ثبات در طول مدت زمان نگهداری روش بسیار مناسب و کاربردی بود.

## ۶- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مدیریت محترم شرکت آذین شوشتر، جناب آقای ساسان قنادان در انجام مطالعه حاضر سپاسگزاری می گردد.

## ۷- منابع

- [1] James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 343s-348s.
- [2] Blades, M. (2000). Functional foods or nutraceuticals. *Nutrition and Food*

بیشتر آب توسط سورفاکتانت ها مطلوب بود. افزودن روغن ماهی سالمون به شکل ریزپوشانی شده به ماست طعم دار حاوی توت فرنگی، موجب بهبود خواص حسی فرآورده نهایی گردید [۶۹].

## ۴-۱۵- بهینه سازی فرمولاسیون ماست

### پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون

به منظور بهینه سازی پاسخ های موثر در تولید ماست پروبیوتیک غنی سازی شده مطابق شکل (۲۴)، از روش تابع مطلوبیت استفاده شد. به منظور بهینه سازی توام، ابتدا اهداف بهینه سازی مشخص گردید. یعنی پارامترهای ویسکوزیته، شمارش جمعیت پروبیوتیک و ارزیابی حسی در بیشینه و میزان سینرزیس و اندیس پراکسید در کمینه در نظر گرفته شدند. مقادیر بهینه ماست های پروبیوتیک غنی شده با نانوامولسیون های موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه با مطلوبیت ۸/۰ بصورت مدت زمان نگهداری ۱۵ روز و غلظت نانوامولسیون ۱/۴ درصد بود و پاسخ های بهینه مقدار سینرزیس ۲۲ درصد، اندیس پراکسید ۰/۴ درصد، ویسکوزیته ۸۵۰/۶۱۰۶ سانتی پواز، رشد جمعیت پروبیوتیک (log cfu) ۷/۶۸ و ارزیابی حسی (۸) تخمین زده شد.

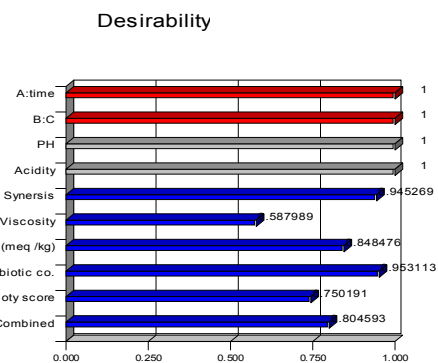


Fig 24 Desirability functions for all factors and responses

## ۵- نتیجه گیری

در این مطالعه، در مرحله نخست نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از روش کم انرژی، امولسیفیکاسیون خودبخودی به منظور دستیابی به فرمولاسیون های بهینه، تاثیر فاکتورهای موثر نوع سورفاکتانت، نسبت سورفاکتانت به روغن، مقدار امگا سه و

- homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 560-569.
- [13] McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8).
- [14] Li, Y., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Encapsulation and delivery of crystalline hydrophobic nutraceuticals using nanoemulsions: Factors affecting polymethoxyflavone solubility. *Food biophysics*, 7(4), 341-353.
- [15] McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- [16] Lu, Y., & Chen, S. C. (2004). Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(11), 1621-1633.
- [17] Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17(6), 657-665.
- [18] Estrada, J.D., Boeneke, C., Bechtel, P. & Sathivel, S. 2011. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. *Journal of Dairy Science*, 94: 5760-5769.
- [19] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Effect of glycerol on formation, stability, and properties of Vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 411, 105-113.
- [20] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.
- [21] Xia, S., & Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food research international*, 38(3), 289-296.
- [22] Chanamai, R., & McClements, D. J. (2001). Depletion flocculation of beverage emulsions by gum arabic and modified starch. *Journal of Food Science*, 66(3), 457-463.
- [23] Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Characterization Science, 30(2), 73-76.
- [3] Frisvold, M. 2009. Functional Foods and Nutraceuticals. *Complementary and Alternative Therapies in Nursing*, 439.
- [4] Maki, K. C., Yurko-Mauro, K., Dicklin, M. R., Schild, A. L., & Geohas, J. G. (2014). A new, microalgal DHA-and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91(4), 141-148.
- [5] Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 99-104.
- [6] Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R., & Ventura, H. O. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(7), 585-594.
- [7] Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., Davis, J. M., Mischoulon, D., Peet, M., & Stoll, A. L. (2006). Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *Journal of Clinical psychiatry*, 67(12), 1954.
- [8] Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(19), 5445-5449.
- [9] Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
- [10] Nuruzzaman, M., Rahman, M. M., Liu, Y., & Naidu, R. (2016). Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(7), 1447-1483.
- [11] Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J. & Xiao, H. (2012). Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: encapsulation and release properties. *Food Chemistry*, 132, 799-807.
- [12] Lee, S. J., & McClements, D. J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined

- delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food and Function*, 6(1), 41-54.
- [35] Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.
- [36] Krstonošić, V., Dokić, L., Dokić, P., & Dapčević, T. (2009). Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2212-2218.
- [37] Li, J., Hwang, I. C., Chen, X., & Park, H. J. (2016). Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids*, 60, 138-147.
- [38] Li, J., Solval, K. M., Alfaro, L., Zhang, J., Chotiko, A., Delgado, J. L. B., & Sathivel, S. (2015). Effect of blueberry extract from blueberry pomace on the microencapsulated fish oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(2), 199-206.
- [39] Saberi, M., Hashemiravan, M., & Farhadyar, N. (2014). Influence of casein and inulin on the properties of nano-particle encapsulation of fish oil. *J. Biodiversity Environ. Sci*, 4(2), 318-326.
- [40] Topuz, O. K., Özvural, E. B., Zhao, Q., Huang, Q., Chikindas, M., & Gölükçü, M. (2016). Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food chemistry*, 203, 117-123.
- [41] Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., & Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food chemistry*, 190, 513-519.
- [42] Gulotta, A., Saberi, A. H., Nicoli, M. C., & McClements, D. J. (2014). Nanoemulsion-based delivery systems for polyunsaturated ( $\omega$ -3) oils: formation using a spontaneous emulsification method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1720-1725.
- [43] Rao, J., & McClements, D. J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food hydrocolloids*, 29(2), 326-334.
- of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*, 39(4), 449-457.
- [24] Chiesa, M., Garg, J., Kang, Y. T., & Chen, G. (2008). Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 326(1-2), 67-72.
- [25] Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9(8), 497-505.
- [26] Keogh, M. K., & O'Kennedy, B. T. (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science*, 63(1), 108-112.
- [27] Iranian National Standard No. 695, Yogurt - Properties and Test Methods.
- [28] Iranian National Standard No. 2852, Acidity and pH.
- [29] Iranian National Standard No. 4179, Measurement of peroxide value in edible oils and fats
- [30] Bouchemal, K., Briçon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International journal of pharmaceuticals*, 280(1-2), 241-251.
- [31] Kabri, T. H., Arab-Tehrany, E., Belhaj, N., & Linder, M. (2011). Physico-chemical characterization of nano-emulsions in cosmetic matrix enriched on omega-3. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 41.
- [32] Komaiko, J., & McClements, D. J. (2015). Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. *Journal of Food Engineering*, 146, 122-128.
- [33] Tian, Y., Guo, Y., & Zhang, W. (2016). Effect of Oil Type, Aliphatic Alcohol, and Ionic Surfactants on the Formation and Stability of Ceramide-2 Enriched Nanoemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37(8), 1115-1122.
- [34] Walker, R., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for

- Nyam, K. L. (2016). Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil-in-water Pickering nanoemulsions stabilised by mixture of sodium caseinate, Tween 20 and  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Hydrocolloids*, 52, 934-941.
- [55] Alfaro Sanabria, L. A. (2012). Development of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil.
- [56] Capela, P., Hay, T.K.C., & Shah, N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39, 203-211
- [57] Zhong, J., Yang, R., Cao, X., Liu, X., & Qin, X. (2018). Improved Physicochemical Properties of Yogurt Fortified with Fish Oil/ $\gamma$ -Oryzanol by Nanoemulsion Technology. *Molecules*, 23(1), 56.
- [58] El-Nawawy, M. A., El-Kenany, Y. M., & Abdel-Ghaffar, E. (1998). Effect of some herb plants on the quality of yoghurt. In *Proceedings of the Seventh Conference*.
- [59] Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Pinto, S. S., Muñoz, I. B., & Amboni, R. D. (2013). Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 39-44.
- [60] Sarabi-Jamab, M., & Niazmand, R. (2009). Effect of essential oil of *Mentha piperita* and *Ziziphora clinopodioides* on *Lactobacillus acidophilus* activity as bioyoghurt starter culture. *Am Eur J Agric Environ Sci*, 6(2), 129-31.
- [61] Shahdadi, F., Mirzaie, H., Kashaninejad, M., Khomeiri, M., Ziaifar, A. M., & Akbarian, A. (2015). Effects of various essential oils on chemical and sensory characteristics and activity of probiotic bacteria in drinking yoghurt.
- [62] Vahedi, N., Mazaheri, T. M. & Shahidi, F. (2008). Optimization of fruit yoghurt formulation and quality evaluation during storage.
- [63] Salvia-Trujillo, L., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2016). Influence of an anionic polysaccharide on the physical and oxidative stability of omega-3 nanoemulsions: Antioxidant effects of alginate. *Food Hydrocolloids*, 52, 690-698.
- [64] Amirdivani, Sh. & Salihin, B. A. (2011).
- [44] Lee, S. J., & McClements, D. J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 560-569.
- [45] Li, M., Ma, Y., & Cui, J. (2014). Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 49-58.
- [46] Silva, H. D., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2015). Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. *Journal of Food Engineering*, 167, 89-98.
- [47] Frascareli, E. C., Silva, V. M., Tonon, R. V., & Hubinger, M. D. (2012). Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 413-424.
- [48] Soottitantawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., & Linko, P. (2003). Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Journal of Food Science*, 68(7), 2256-2262.
- [49] Karthik, P., & Anandharamkrishnan, C. (2016). Fabrication of a nutrient delivery system of docosahexaenoic acid nanoemulsions via high energy techniques. *RSC Advances*, 6(5), 3501-3513
- [50] Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.
- [51] Li, M., Ma, Y., & Cui, J. (2014). Whey-protein-stabilized nanoemulsions as a potential delivery system for water-insoluble curcumin. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 49-58.
- [52] Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., & Golding, M. (2014). Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 36, 245-255.
- [53] Maher, P. G. (2015). Stabilisation of dehydrated nanoemulsions using sugar-protein matrices.
- [54] Cheong, A. M., Tan, K. W., Tan, C. P., &

- [67] Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M., & Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [68] Nielsen, N. S., Klein, A., & Jacobsen, C. (2009). Effect of ingredients on oxidative stability of fish oil-enriched drinking yoghurt. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(4), 337-345.
- [69] Estrada, J.D., Boeneke, C., Bechtel, P. & Sathivel, S. 2011. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. *Journal of Dairy Science*, 94: 5760-5769.
- Change in yogurt fermentation characteristic and antioxidant potential and in vivo inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *Food Science and Technology*, 44:1458-1464
- [65] Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146–152.
- [66] Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications—a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(3), 406-415.



## Evaluation of Physicochemical and sensory Properties of probiotic Yogurt Enriched by *Iraninan Shallot* Nanoemulsion containing omega3 fatty acid

Faraji, N.<sup>1\*</sup>, Alizadeh, M.<sup>2</sup>, Almasi, H.<sup>3</sup>, Pirs, S.<sup>4</sup>, Fraji, S<sup>5</sup>

1. Phd graduated student, R&D manager at azin shoushtar company, Khozestan, Iran
2. Professor, department of Food science and technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Associatant professor, department of Food science and technology, Faculty of Agriculture Urmia University, Iran
4. Associatant professor, department of Food science and technology, Faculty of Agriculture Urmia University, Iran
5. MSc graduated student, QC manager at azin shoushtar company, Khozestan, Iran

(Received: 2019/12/24 Accepted:2020/04/11)

In this study, omega-3 fatty acid nanoemulsions were prepared by spontaneous emulsification using Iranian shallot essential oil. The aim of this study was to investigate the optimum conditions for the production of probiotic yogurt enriched with nanoemulsions of essential oil of omega3 fatty acids by using a D-optmal design. Nanoemulsions containing omega3 fatty acids were first produced by Iranian shallot essential oil (25% omega3, 35-day storage time, SOR (263/39) % and surfactant type of tween80), then the probiotic yogurt enrichment with the produced nanoemulsions, the effect of two independent variables of nanoemulsion concentration and storage time on physicochemical characteristics, population growth Probiotics and sensory properties of yogurt were investigated. the results showed that droplet size was highly influenced by surfactant concentration and surfactant type and increasing surfactant content, mean droplet diameter decreased significantly. In fact, increasing surfactant concentration caused to increased surfactant adsorption to W / O level and due to further reduction in surface tension and ultimately reduced the particle size, turbidity index, creaming index and increase coating efficiency, as well as the addition of nanoemulsions in probiotic yogurt on properties such as peroxide index, syneris rate, Population of probiotics and Sensory evaluation were significant, population growth of probiotic microorganisms in yogurt increased in the presence of vegetable nanoemulsions of essential oil due to nutrient availability. Finally, 15 days storage time and 1.4% nanoemulsions were determined as an optimum formulation by numerical optimization.

**Key words:** Probiotic yogurt, *Iranian shallot*, Omega3 fatty acids, Nanoemulsion

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: Nasrin.faraji88@yahoo.com