

تولید امولسیون مضاعف حاوی روغن ماهی به روش خشک کن انجمادی و ارزیابی پایداری اکسایشی

چکیده

در پژوهش حاضر روغن ماهی با تکنیک امولسیون مضاعف و خشک کن انجمادی ریزپوشانی گردید. در فاز آبی داخلی از پروتئین هیدرولیز شده ماهی و در فاز روغن میانی از روغن ماهی و روغن ماهی + عصاره چرب میگو استفاده شد. میکروکپسول‌ها با ترکیب و نسبت متفاوت دیواره خارجی کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC) + صمغ عربی + زئین (۴:۲:۱ (وزنی / وزنی))، WPC + صمغ عربی (۴:۳ (وزنی / وزنی))، WPC + زئین (۴:۳ (وزنی / وزنی)) و صمغ عربی + زئین (۴:۳ (وزنی / وزنی)) تولید و شاخص کرمی شدن، آنتی اکسیدانی (قدرت مهار رادیکال آزاد و قدرت احیاء یون فلزی)، کارایی ریزپوشانی روغن ماهی و توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت. و پایداری اکسایشی (مقدار پرکسید، P-آنیسیدین و پیوند مزدوج) میکروکپسول‌ها طی نگهداری در سه ماه ارزیابی گردید. نتایج حاکی از این بود که حضور عصاره چرب میگو در فاز میانی به افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی کمک کرد. و پایداری اکسایشی را بهبود بخشید. تیمار WPC + صمغ عربی + زئین کمترین میزان شاخص کرمی شدن و بیشترین پایداری را در طی زمان نشان داد. بالاترین میزان کارایی ریزپوشانی روغن (۷۵/۵۵٪) نیز در همین تیمار مشاهده شد. نتایج ارزیابی پایداری اکسایشی نشان داد که نوع و ترکیب دیواره خارجی بر اکسیداسیون تاثیر داشت. میکروکپسول WPC + صمغ عربی + زئین طی سه ماه کمترین میزان اکسیداسیون را داشت.

کلمات کلیدی: روغن ماهی، ریزپوشانی، امولسیون مضاعف، زئین، WPC

۱-مقدمه

اسیدهای چرب اشباع نشده PUFA برای سلامتی، به ویژه محافظت در برابر بیماری‌های قلبی عروقی و کاهش میزان مرگ و میر مفید می باشد. روغن ماهی منبع قابل توجهی از اسیدهای چرب امگا ۳ است که شامل ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA) است که اثرات مثبت بر سلامتی و پیشگیری از بیماری دارد (۱). محدودیت هایی در کاربرد روغن ماهی در فرآورده های غذایی فراسودمند به دلیل حساسیت اسیدهای چرب امگا ۳ به نور، اکسیژن، بوی نامطلوب و حلالیت کم آنها در

آب وجود دارد. اکسیداسیون و بوی ناخوشایند و نامطلوب روغن ماهی می تواند ناشی از تجزیه چربی باشد (۲). رویکردهای مختلفی برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی در غذاهای غنی شده با روغن ماهی مورد مطالعه قرار گرفته است و ریزپوشانی به عنوان موفق ترین روش پیشنهاد شده است. انتخاب فناوری ریزپوشانی مناسب می تواند منجر به بهبود قابل توجهی در پایداری شیمیایی، قابلیت پخش شدن در آب و فراهمی زیستی اسیدهای چرب ضروری شود (۲). امولسیون مضاعف ($W_1/O/W_2$) که به عنوان امولسیون در امولسیون نیز تعریف می شود، نوع اصلی امولسیون های چندگانه هستند که شامل ساختارهای کلئیدی پیچیده چند فازی می باشند در آن ها قطرات کوچک آب داخلی در داخل قطرات بزرگ تر روغن پراکنده شده و سپس در یک فاز آب پیوسته خارجی قرار می گیرند (۳). ویژگی مهم این نوع امولسیون در ترکیب همزمان اجزای غذایی آبدوست و آبگریز می باشد (۴). حضور ترکیبات آبدوست در فاز داخلی (W_1) در مقایسه با فاز آبی خارجی (W_2)، حفاظت در برابر تخریب شیمیایی در طول فرآوری و نگهداری، جلوگیری از واکنش های بالقوه با سایر اجزای محلول در آب و پوشاندن ویژگی های حسی نامطلوب (مثل تلخی، و طعم تلخ و اکسایش پس از جویدن) و در حین جویدن را شامل می گردد (۵، ۶). تطابق هسته با دیواره شاخص مهمی برای افزایش راندمان ریزپوشانی است و دیواره مطلوب باید با توجه به نوع هسته انتخاب گردد. اندازه ذرات هسته نیز در پخش، نفوذپذیری یا رهایش کنترل شده نقش مهمی را ایفا میکند (۷). انتخاب مواد اصلی و دیواره، طراحی فرمولاسیون امولسیون (نسبت هسته به دیواره) و انتخاب فناوری مناسب میکروکپسوله سازی برای تولید میکروکپسول های حاوی روغن ماهی بسیار مهم است. کارایی بالاتر میکروکپسوله سازی و پایداری اکسیداتیو در طی نگهداری، یک سیستم میکروکپسوله سازی خوب برای میکروکپسول های روغن ماهی را نشان دادند (۸). در مطالعه حاضر از ترکیب پروتئین و پلی ساکارید برای ریزپوشانی روغن ماهی استفاده گردید. زئین پروتئین گیاهی ذرت، قابل حل در آب و الکل، به خانواده پرولامین تعلق دارد و حاوی اسیدهای آمینه آبگریز نظیر پرولین، لوسین و آلانین می باشد. این پلیمر ایمن و به عنوان یک ترکیب سازگار با محیط زیست و زیست تخریب پذیر شناخته شده است (۹). کنسانتره پروتئین آب پنیر^۱، محصول جانبی فرایند پنیرسازی است که به وفور در دسترس می باشد و از ویژگی های عملکردی و ارزش تغذیه ای بالایی برخوردار است. کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC) به طور گسترده در امولسیون های غذایی به عنوان امولسیفایر/ تثبیت کننده به تنهایی و یا همراه با پلی ساکاریدها در صنایع غذایی استفاده می شود، به طوریکه نقش مهمی در مقاومت قطرات در برابر لخته شدن و ادغام در طول ذخیره سازی طولانی مدت دارد (۱۰). صمغ عربی پلی ساکاریدی بی رنگ، که با حلالیت بالا، ویسکوزیته کم در غلظت های بالا و توانایی امولسیون کنندگی قابل توجه، به طور گسترده ای در ریزپوشانی ترکیبات طعم دهنده، آنتی

¹. Whey protein concentrate (WPC)

اکسیدان‌ها، روغن‌ها، پروتئین‌ها و پیتیدها استفاده می‌شود. این ماده انتخاب مناسبی برای دیواره در ریزپوشانی به دلیل شکل گیری امولسیون پایدار و محافظت از ترکیبات فرار می باشد (۱۱). خشک کردن به روش انجماد یا لیوفیلیزاسیون یک فرآیند آبرگیری در دمای پایین است. در مرحله اول، محصول به حالت منجمد در می‌آید و سپس فشار کاهش یافته و یخ از طریق تصعید در مرحله بعدی حذف می‌شود. استفاده از دماهای پایین و حذف اکسیژن در فرآیند خشک کردن به روش انجماد منجر به تولید محصولی با کیفیت بالا و اکسیداسیون کمتر می‌شود. این تکنیک بیشتر برای میکروکپسولاسیون مواد حساس به حرارت بسیار بالا، مثل روغن ماهی، مناسب است (۸). محتوای بالای اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در روغن ماهی و تأثیرات مفید آن بر سلامتی انسان باعث شده تا به عنوان اجزای کارآمد در نظر گرفته شود. استفاده از روغن ماهی در رژیم غذایی یکی از روش‌ها برای تأمین نیاز روزانه به اسیدهای چرب است به همین خاطر، در مطالعه حاضر ریزپوشانی روغن ماهی با ترکیبات مختلف دیواره خارجی انجام گرفت و پایداری میکروکپسول‌ها طی سه ماه نگهداری مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه موارد مورد استفاده در تحقیق

روغن کبد از ماهی (*Gadus morrhua*) و زئین از شرکت سیگما، آلمان خریداری شدند. کنسانتره پروتئین آب پنیر از ولاک، انگلیس، صمغ عربی از مرک، آلمان، امولسیفایر محلول در روغن PGPR از پالسگارد، دانمارک تهیه گردیدند. پروتئین هیدرولیز شده استفاده شده در تحقیق حاضر با هیدرولیز آنزیمی مینس ماهی کاراس (*Carassius auratus*) با آنزیم آلکالاز تولید گردید و در فاز آبی داخلی استفاده شد.

۲-۲- تهیه عصاره چرب از ضایعات میگو

۱۰ گرم از ضایعات خرد شده میگوی وانامی با ۵۰ میلی لیتر اتیل استات در دمای اتاق هموژن گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگه داشته شد. نمونه از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. عصاره چرب به دست آمده در ظرف درب بسته تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۱۲).

۲-۳- تهیه امولسیون مضاعف

امولسیون مضاعف طبق روش امولسیون‌سازی دو مرحله‌ای آماده گردید (۱۳، ۱۴). ابتدا امولسیون اولیه W₁/O تهیه گردید. فاز W₁ حاوی FPH (۳٪ وزنی/وزنی) و فاز O (روغن ماهی، روغن ماهی و عصاره چرب میگو (۱/۰٪ وزنی/وزنی)) و امولسیفایر PGPR

(۶٪ وزنی/وزنی) بود. قبل از شروع فرایند امولسیون سازی، هر دو فاز مایع داخلی و روغنی تا ۵۰ درجه سانتی گراد حرارت دهی شدند (۱۵). فاز W₁ به صورت تدریجی به فاز O (نسبت ۳۰:۷۰ وزنی/وزنی) همراه با همزدن توسط هموژنایزر اضافه گردید. فاز W₂ (WPC + صمغ عربی + زئین، WPC + صمغ عربی، WPC + زئین و صمغ عربی + زئین) در آب مقطر حل شد و طبق تیماربندی جدول ۱ با هم مخلوط شدند. امولسیون W₁/O/W₂ از طریق افزودن تدریجی امولسیون W₁/O به فاز W₂ (۳۰:۷۰ وزنی/وزنی) و به دنبال آن مخلوط کردن با هموژنایزر و بلافاصله سردسازی در حمام آبی ۴ درجه سانتی گراد تولید شد.

جدول ۱- نسبت ترکیب مواد دیواره در فاز مایع خارجی (W₂)

تیمار	نسبت ترکیب دیواره فاز مایع خارجی (W ₂) (وزنی/وزنی)		
	پروتئین آب پنیر	صمغ عربی	زئین
تیمار ۱، ۵	۴	۲	۱
تیمار ۲، ۶	۴	۳	–
تیمار ۳، ۷	۴	–	۳
تیمار ۴، ۸	–	۴	۳

۲-۴- شاخص کرمی شدن امولسیون مضاعف

امولسیون تازه تهیه شده در لوله های آزمایش تا ارتفاع تقریباً ۶ سانتی متر ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. ارتفاع فاز کدر امولسیون طی ۲۱ روز اندازه گیری شد و جهت تعیین میزان شاخص کرمی شدن، ارتفاع رسوب به ارتفاع اولیه امولسیون مقایسه گردید (۱۵).

رابطه (۱)

$$\text{ارتفاع فاز پایدار امولسیون} - \text{ارتفاع فاز اولیه امولسیون} \\ \text{ارتفاع اولیه امولسیون} \times 100 = (\%) \text{ شاخص کرمی شدن}$$

۲-۵- بررسی ظرفیت آنتی اکسیدانی

۲-۱-۵- قدرت مهار رادیکال های آزاد DPPH

DPPH در اتانول حل گردید و در تاریکی نگهداری شد. ۱ میلی لیتر از نمونه با ۲ میلی لیتر از محلول DPPH (۰/۲ میلی مول بر لیتر) اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه در ۵۲۵ نانومتر قرائت گردید. آب مقطر به جای نمونه برای نمونه بلانک استفاده شد. کنترل نمونه با مخلوط کردن نمونه با اتانول تهیه گردید (۱۶).

رابطه (۲)

$$DPPH(\%) = \frac{(\text{جذب شاهد نمونه} - \text{جذب نمونه})}{\text{جذب بلانک}} \times 100$$

۲-۲-۵- قدرت احیاء یون فلزی

ابتدا ۱ میلی لیتر از نمونه با ۱ میلی لیتر از فری سیانید پتاسیم (۰/۲۵٪) مخلوط گردید و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (۱٪ وزنی/حجمی) اضافه و نمونه فیلتر گردید. پس از آن ۲ میلی لیتر از سوپرناتانت با ۰/۵ میلی لیتر از کلرید آهن II (۱٪ وزنی/حجمی) و ۲ میلی لیتر از آب مقطر مخلوط و به محلول اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. میزان جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. میزان جذب بالاتر نشان دهنده افزایش قدرت احیاء یون فلزی است (۱۷).

۲-۲-۶- تهیه میکروکپسول

پس از انجام آزمایش های مرتبط امولسیون ها، تیمارها در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد و به منظور خشک کردن و تولید پودرهای تغذیه ای، از دستگاه خشک کن انجمادی^۲ آزمایشگاهی استفاده گردید. مدت زمان خشک شدن نمونه ها ۷۲ ساعت بود. میکروکپسول های تولیدی در ظروف درب دار قرار داده شد و به مدت ۳ ماه نگهداری گردید. توزیع اندازه و پراکنش ذرات میکروکپسول ها با استفاده از دستگاه DLS (Scatteroscope_1 qudix، کشور کره) و زتا پتانسیل (WALLIS شرکت Cordouan) اندازه گیری شد.

۲-۲-۷- آزمایش های میکروکپسول های تولیدی

۲-۱-۷- روغن ریز پوشانی شده

^۲- Freeze Drying

با توجه به مقدار روغن سطحی و روغن کل، روغن ریزپوشانی شده طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۱۸).

$$\text{رابطه (۳)} \quad 100 \times (\text{روغن سطحی} - \text{روغن کل}) = \text{روغن ریزپوشانی شده (\%)}$$

۲-۲-۲- کارایی ریزپوشانی

با توجه به مقدار روغن سطحی و روغن کل، میزان کارایی روغن ریزپوشانی شده طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۱۸).

رابطه (۴)

$$\text{کارایی ریزپوشانی (\%)} = \left(\frac{\text{روغن سطحی} - \text{روغن کل}}{\text{روغن کل}} \right) \times 100$$

۲-۸- ارزیابی پایداری و شاخص های اکسیداسیون

۲-۸-۱- میزان پراکسید (PV)

۱ گرم از روغن استخراجی از میکروکپسول ها در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر با ۳۰ میلی لیتر محلول اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲) مخلوط گردید. ۰/۵ میلی لیتر محلول یدید پتاسیم اشباع، ۳۰ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۱٪ به محلول اضافه گردید. مقدار ید آزاد شده با محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیترو گردید (۱۹). میزان پراکسید طبق رابطه زیر محاسبه شد.

رابطه (۵)

$$\text{مقدار پراکسید} = \frac{1000 \times \text{نرمالیه} \times \text{حجم تیوسولفات مصرفی}}{\text{وزن روغن}}$$

۲-۲-۸- پیوندهای مزدوج^۳ (CD)

۰/۱ گرم روغن استخراجی از میکروکپسول ها در بالن حجمی ۲۵ میلی لیتر به وسیله ایزواکتان به حجم رسانده شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۲۳۳ نانومتر در برابر شاهد ایزواکتان قرائت شد (۲۰). طبق رابطه زیر پیوندهای مزدوج محاسبه گردید.

^۳- Conjugated dienes

رابطه (۶)

$$\text{عرض کوت} \times \frac{\text{مقدار جذب نمونه}}{\text{غلظت نهایی نمونه مورد استفاده}} = \text{پیوند های مزدوج}$$

۲-۳-۸- شاخص p- آنیسیدین

در بالن ۲۵ میلی لیتر، ۰/۵ گرم نمونه یا ایزواکتان به حجم رسانده شد. بعد از فیلتراسیون، جذب محلول (A_1) در طول موج ۳۵۰ نانومتر در مقابل شاهد ایزواکتان قرائت شد. ۵ میلی لیتر از محلول با مقدار ۱ میلی لیتر معرف آنیسیدین در لوله آزمایش مخلوط گردید. پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه ها (A_2) در مقابل شاهد (ایزواکتان و معرف) قرائت شد. معرف آنیسیدین با ۲/۵ گرم/لیتر آنیسیدین در اسید استیک گلاسیال با رطوبت کمتر از ۰/۱٪ تهیه گردید (۲۱).

رابطه (۷)

$$P - \text{آنیسیدین} = \left(\frac{\text{جذب محلول دارای معرف} - \text{جذب محلول فاقد معرف} \times \frac{1}{2}}{\text{وزن نمونه}} \right) \times 25$$

۲-۹- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۷.۰.۱ انجام گرفت. نمودارها با نرم افزار Origin pro ترسیم شد. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی، مقایسه بین تیمارها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه، آزمایش های نگهداری پودرها و امولسیون‌ها در قالب طرح اندازه‌گیری‌های تکرار شده و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون توکی آنالیز گردید. تمامی نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه گردید و مقایسه‌های آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شاخص کرمی شدن

نتایج مربوط به شاخص کرمی شدن طی نگهداری در زمان در دمای ۴ درجه سانتی گراد در جدول ۱ نشان داده شد. از روز اول تا چهاردهم نگهداری، اختلاف معنی داری در مقدار این شاخص میان تیمارها دیده نشد ($p > 0.05$) و تمامی تیمارهای آزمایشی پایدار بودند. از روز ۱۴ تا ۲۱ طی زمان نگهداری، مقدار شاخص کرمی شدن در تیمارها به طور معنی داری افزایش یافت. بیشترین

میزان این شاخص در روز ۲۱ نگهداری مشاهده گردید. تیمار WPC+ صمغ عربی+ زئین کمترین میزان شاخص کرمی شدن (۸/۳۳٪) و بیشترین پایداری را طی ۲۱ روز نگهداری نشان داد. ارتباط بین پروتئین و پلی ساکارید بر پایداری امولسیون تاثیر گذار است. غلظت و تعامل آن ها در تعیین شاخص کرمی شدن نقش مهمی ایفا می کند. در مطالعه حاضر، از صمغ عربی به عنوان پلی ساکارید و از زئین و WPC به عنوان منبع پروتئینی استفاده شد. و مقایسه ای برای بهترین ترکیب دیواره در پایداری امولسیون صورت گرفت. کرمی شدن نشانه اولیه عدم پایداری امولسیون های مضاعف بوده و منجر به دو فاز شدن امولسیون می گردد. یکی از عواملی که بر کارایی ریزپوشانی روغن تاثیر داشته و سبب ثبات بهتر و کارایی بالاتر می گردد، پایداری امولسیون از طریق تعیین شاخص کرمی شدن مشخص می شود. امولسیون های ناپایدار توانایی اندکی در حفظ و نگهداری مواد دارند (۲۲).

Marino and Alamprese (۲۰۲۰)، عوامل ساختاری موثر در پایداری امولسیون مضاعف را بررسی نمودند، آن ها از سفیده تخم مرغ و WPC استفاده کردند. نتایج نشان داد که WPC توانایی بیشتری در افزایش پایداری و ویسکوزیته داشته است (۲۳). Jamshidi و همکاران (۲۰۱۸) اعلام کردند، ترکیب دیواره پروتئین آب پنیر و اینولین اثر مثبتی بر شاخص کرمی شدن و کارایی ریزپوشانی ترکیبات FPH و روغن ماهی داشت. همچنین افزایش میزان پروتئین آب پنیر در ترکیب دیواره سبب پایداری بالاتر امولسیون مضاعف تولیدی گردید (۱۴). در پژوهش حاضر نیز وجود پروتئین آب پنیر در ترکیب دیواره تاثیر مثبتی بر پایداری داشته است.

جدول ۲- شاخص کرمی شدن در امولسیون های مضاعف طی زمان نگهداری

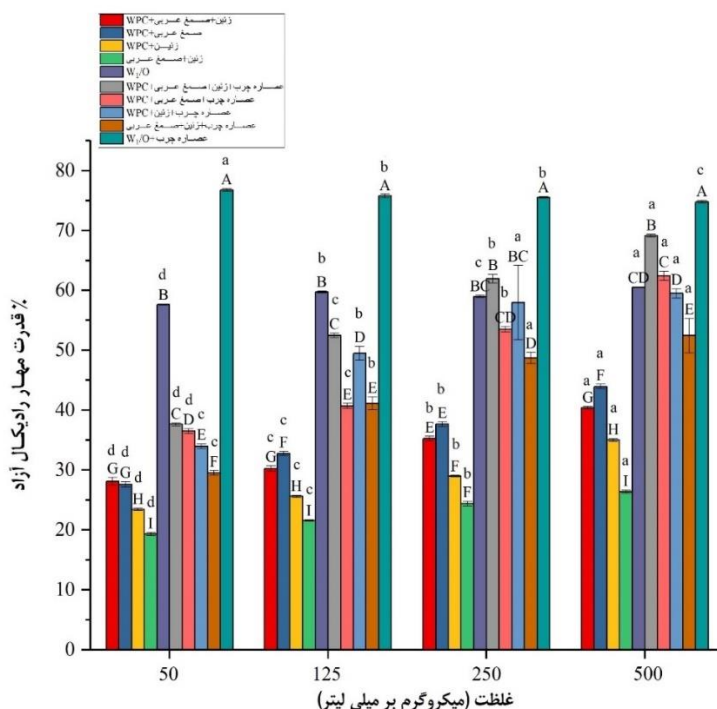
تیمارها / شاخص کرمی شدن	روز ۰	روز ۷	روز ۱۴	روز ۲۱
درصد (%)				
WPC+ صمغ عربی + زئین	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۳/۳۳ ^{bC} ± ۰/۰	۸/۳۳ ^{aC} ± ۰/۰
WPC + صمغ عربی	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۵ ^{bBC} ± ۰/۰	۱۳/۳۳ ^{aB} ± ۰/۰
WPC + زئین	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۶/۶۶ ^{bAB} ± ۰/۰	۱۵ ^{aA} ± ۰/۰
صمغ عربی + زئین	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۸/۳۳ ^{bA} ± ۰/۰	۱۵ ^{aA} ± ۰/۰
WPC+ صمغ عربی + زئین + عصاره چرب	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۳/۸۹ ^{bC} ± ۰/۹۶	۱۲/۷۷ ^{aB} ± ۰/۹۶
WPC + صمغ عربی + عصاره چرب	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۳/۳۳ ^{bC} ± ۰/۰	۱۲/۷۷ ^{aB} ± ۰/۹۶

WPC + زئین + عصاره چرب	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۵/۵۵ ^{bBC} ± ۰/۹۶	۱۵ ^{aA} ± ۰/۰
صمغ عربی + زئین + عصاره چرب	۰ ± ۰/۰	۰ ± ۰/۰	۷/۲۲ ^{bAB} ± ۱/۹۲	۱۵ ^{aA} ± ۰/۰

نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری در طی زمان می‌باشد ($p < 0.05$).

۳-۲- قدرت مهار رادیکال آزاد (DPPH)

نتایج در شکل ۱ ارائه گردید. بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد بین تیمارهای ریزپوشانی شده حاوی عصاره چرب در فاز روغن و فاقد عصاره و امولسیون اولیه صورت گرفت. نتایج حاکی از افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت بوده است. اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها و غلظت‌های مورد بررسی دیده شد ($p < 0.05$). تیمارهای بدون عصاره چرب در فاز روغن، خاصیت آنتی اکسیدانی از خود نشان دادند که این امر به حضور FPH در فاز داخلی آبی می‌تواند مرتبط باشد. اما در مقایسه با تیمارهای حاوی عصاره چرب در فاز روغن، قدرت مهار کمتری از خود نشان دادند. نکته قابل توجه بالاتر بودن قدرت مهار در امولسیون اولیه نسبت به تیمارهای ریزپوشانی شده بود، احتمال بر این است که حضور پوشش، آزاد شدن ترکیبات آنتی اکسیدانی از داخل فاز روغن میانی را به تاخیر انداخته و دسترسی به آن را محدود کرده است. انتخاب نوع دیواره در قدرت مهار تاثیر داشته و ترکیب WPC + صمغ عربی + زئین نسبت به ترکیب دو ماده در دیواره عملکرد بهتری نشان داد و قدرت مهار افزایش داشت. فعالیت آنتی اکسیدانی کنترل مثبت BHA در غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر ۷۶/۰۹٪ بود. استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی نشان داد که افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد در آن‌ها با بهبود پایداری اکسیداتیو در امولسیون‌ها ارتباط دارد و نوع فرمولاسیون و ریزپوشانی در تقویت اثرات آنتی اکسیدانی تاکید می‌کند. و تعامل بالقوه در اجزاء امولسیون و فرمولاسیون که ممکن است اثر بخشی فعالیت آنتی اکسیدانی را کاهش دهد باید در نظر گرفته شود (۲۴).



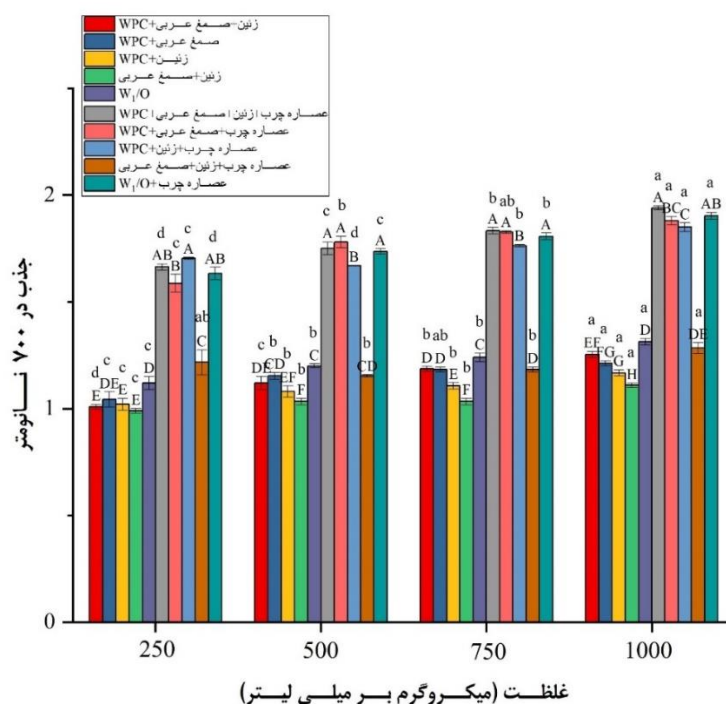
شکل ۱- قدرت مهار رادیکال آزاد در امولسیون های مضاعف

نتایج به صورت میانگین ۳ تکرار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان دهنده اختلاف آماری در غلظت های مختلف می باشد ($p < 0.05$).

۳-۳- قدرت احیا یون فلزی

آزمون قدرت آنتی اکسیدانی کاهنده آهن برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی نمونه ها با اندازه گیری توانایی آن ها در کاهش یون های (Fe^{3+}) به یون های (Fe^{2+}) استفاده گردید. این ارزیابی با پوشش های مختلف دیواره و غلظت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۲ نشان داده شد. مقادیر جذب بالاتر نشان دهنده ی قدرت کاهشی بیشتر می باشد که با افزایش قدرت آنتی اکسیدانی مرتبط است. جذب اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت $1/89$ در غلظت 1000 میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. نمونه های دارای عصاره چرب قدرت کاهندگی بالاتری داشتند که این امر را می توان به آستازانتین موجود در عصاره نسبت داد. استفاده از ترکیب مختلف دیواره نیز بر قدرت کاهندگی موثر بود. تیمار WPC+ صمغ عربی + زئین + عصاره چرب ($1/94$) عدد جذب را نشان داد. عدد جذب تیمار با همین ترکیب دیواره بدون حضور عصاره چرب ($1/23$) بوده است. Pan و همکاران (2018)، اعلام کردند که غلظت آستازانتین در قدرت احیاء یون فلزی موثر بوده است (25). در مطالعه حاضر با افزایش غلظت، قدرت احیاء یون فلزی بیشتر شده و اثر کاهندگی بهتری نشان داد. تیمارها در غلظت 1000 میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین میزان کاهندگی را نشان دادند. بین تیمارها اختلاف معنی دار در غلظت های 250 تا 1000 میکروگرم بر میلی لیتر دیده شد. امولسیون اولیه بدون حضور

عصاره عدد جذب (۱/۳۳) کمتری نسبت به امولسیون اولیه حاوی عصاره چرب (۱/۹۰) نشان داد. حضور پروتئین هیدرولیز شده ماهی در فاز آبی داخلی نیز خاصیت آنتی اکسیدانی داشته ولی این خاصیت با حضور عصاره چرب افزایش یافت. گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه‌ی اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و اسیدهای آمینه‌ی بازی (آرژنین، هیستیدین و لایزین) در مهار یون‌های فلزی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند (۲۶). می‌توان این گونه استنباط نمود که در زمان هیدرولیز پروتئین و تولید FPH بیشترین میزان این اسیدهای آمینه در دسترس می‌باشند و به همین دلیل در نمونه‌های بدون عصاره چرب نیز قدرت کاهندگی دیده شد. Chaudhary و همکاران (۲۰۲۰)، پایداری غلظت‌های مختلف عصاره محلول در آب (گیاه گاسبری هندی) در فاز آبی داخلی امولسیون مضاعف در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ روز بررسی کردند. کارایی ریزپوشانی با افزایش غلظت عصاره به طور قابل توجهی افزایش یافت. آزمون‌های DPPH و FRAP نشان داد هر چه زمان نگهداری بیشتر شد، پایداری آنتی اکسیدانی کمتر شد. با این حال روند کاهش کمتر از عصاره بدون ریزپوشانی بود که نشان دهنده اثر محافظتی نسبتاً قوی ساختار امولسیون مضاعف بوده است (۲۷).



شکل ۲- قدرت احیاء یون فلزی در امولسیون‌های مضاعف

نتایج به صورت میانگین ۳ تکرار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری در غلظت‌های مختلف می‌باشد ($p < 0.05$).

۴-۳- درصد روغن ریزپوشانی و کارایی ریزپوشانی

نتایج در جدول ۳ ارائه گردید. کاهش در کارایی ریزپوشانی می‌تواند به علت نبود مواد کافی در دیواره‌ها برای تولید ماتریکسی قوی، ایجاد لایه‌های نازک‌تر از مواد دیواره بین قطرات روغن کپسوله و یا بی‌ثباتی قطرات امولسیون طی فرایند خشک کردن باشد. بین تیمار صمغ عربی + زئین با WPC + صمغ عربی + زئین و WPC + صمغ عربی + زئین + عصاره چرب اختلاف معنی‌داری در کارایی ریزپوشانی دیده شد ($p < 0.05$). اما در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p > 0.05$). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که نوع دیواره و هسته، ویژگی‌های امولسیون و پارامترهای خشک کردن بر میزان کارایی اثرگذارند (۲۸). امولسیونی که کارایی ریزپوشانی بالاتری داشته باشد، مقدار کمتری از مواد ریزپوشانی شده در سطح ذرات باقی مانده و پایداری بالاتری دارد (۲۹). در مطالعه حاضر نیز تیمار WPC + صمغ عربی + زئین، پایداری بالاتر و ریزپوشانی بالاتری را از خود نشان داد. Chen و همکاران (۲۰۱۳) روغن ماهی حاوی استر فیتوسترول و لیمونن را در پروتئین آب‌پنیر و مواد دیواره فیبر ذرت محلول با استفاده از روش‌های خشک کردن به روش اسپری و انجماد ریزپوشانی کردند. مشخص شد که در میکروکپسول‌های خشک شده به روش اسپری، روغن سطحی کمتر به دست آمده و پایداری اکسیداتیو بالاتری در میکروکپسول‌های خشک شده به روش انجماد در ابتدا به دست آمد، اما به‌طور کلی تفاوت‌های قابل توجهی بین روش‌های خشک کردن به روش اسپری و انجماد از نظر حفاظت از مواد هسته‌ای وجود ندارد (۳۰).

جدول ۳- ویژگی‌های فیزیکی میکروکپسول‌ها

تیمارها	روغن ریزپوشانی شده	کارایی ریزپوشانی میکروکپسول
	درصد (%)	درصد (%)
WPC + صمغ عربی + زئین	$54/46^{ab} \pm 4/41$	$75/55^a \pm 9/00$
WPC + صمغ عربی	$56/99^a \pm 2/16$	$74/03^a \pm 3/23$
WPC + زئین	$43/80^{ab} \pm 3/03$	$63/45^{abc} \pm 3/45$
صمغ عربی + زئین	$44/13^{ab} \pm 9/17$	$55/25^c \pm 7/50$
WPC + صمغ عربی + زئین + عصاره چرب	$55/80^{ab} \pm 1/59$	$70/71^{ab} \pm 3/03$

۶۵/۴۶ ^{abc} ± ۳/۳۲	۴۲/۱۹ ^b ± ۴/۸۶	WPC + صمغ عربی + عصاره چرب
۶۲/۶۸ ^{abc} ± ۲/۲۱	۴۲/۴۷ ^b ± ۳/۸۶	WPC + زئین + عصاره چرب
۵۸/۰۰ ^{bc} ± ۴/۴۶	۴۵/۳۳ ^{ab} ± ۵/۵۸	صمغ عربی + زئین + عصاره چرب

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. حروف متفاوت لاتین در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد ($p < 0.05$).

۴-۴-اندازه ذرات، توزیع اندازه و پتانسیل زتا

اندازه‌گیری اندازه ذرات نشان‌دهنده پایداری امولسیون‌ها است و پتانسیل زتا پایداری الکتروستاتیک فرمولاسیون که برای جلوگیری از تجمع بسیار مهم است را نشان می‌دهد. پراکنش و اندازه ذرات با دستگاه DLS از d_0 تا d_{100} اندازه‌گیری شد. ریزترین ذره با کمترین پراکنش از ۵۳۶ nm تا $15/2 \mu m$ با پراکنش ۱۰۰٪ در تیمار WPC + صمغ عربی + زئین مشاهده شد. برای تیمار WPC + صمغ عربی پراکنش ذرات از ۶۲۷ nm تا $17/7 \mu m$ ، برای تیمار WPC + زئین پراکنش ذرات از ۳۲۰ nm تا $9/50 \mu m$ ، برای تیمار صمغ عربی + زئین پراکنش ذرات از ۷۴۴ nm تا $20/1 \mu m$ ، در تیمار WPC + صمغ عربی + زئین + عصاره چرب از $1/14 \mu m$ تا $34/2 \mu m$ و در امولسیون اولیه (W_1/O) از ۳۸۰ nm تا $10/8 \mu m$ مشاهده شد. میانگین پتانسیل زتا (بر حسب mv) برای تیمارهای فوق به ترتیب از $13/48 \pm 0/0$ ، $12/35 \pm 0/12$ ، $11/37 \pm 0/14$ ، $17/97 \pm 0/10$ ، $14/34 \pm 0/09$ و $0/13 \pm 25/83$ - بود. تأثیر هموژنیزاسیون فشار بالا امولسیون‌های حاوی روغن ماهی بر یکنواختی اندازه میکروکپسول مشاهده شد، به طوری که میکروکپسول‌های تحت فشار بالا توزیع اندازه ذرات با مقدار کمتر نشان دادند، در حالی که آن‌هایی که بدون هموژنیزاسیون تحت فشار بالا تولید شدند، توزیع اندازه ذرات با دامنه‌ای از اعداد بزرگتر داشتند (۳۱). در مطالعه حاضر از هموژنیزاسیون اولتراتراکس استفاده شد. کمترین اندازه ذرات در تیمار WPC + زئین دیده شد. بیشترین اندازه ذرات در تیمار WPC + صمغ عربی + زئین + عصاره چرب مشاهده شد. حضور عصاره چرب در اندازه ذرات تأثیر داشت و تیمار WPC + صمغ عربی + زئین نسبت به حضور عصاره چرب در همین تیمار، اندازه ذرات کمتری نشان داد.

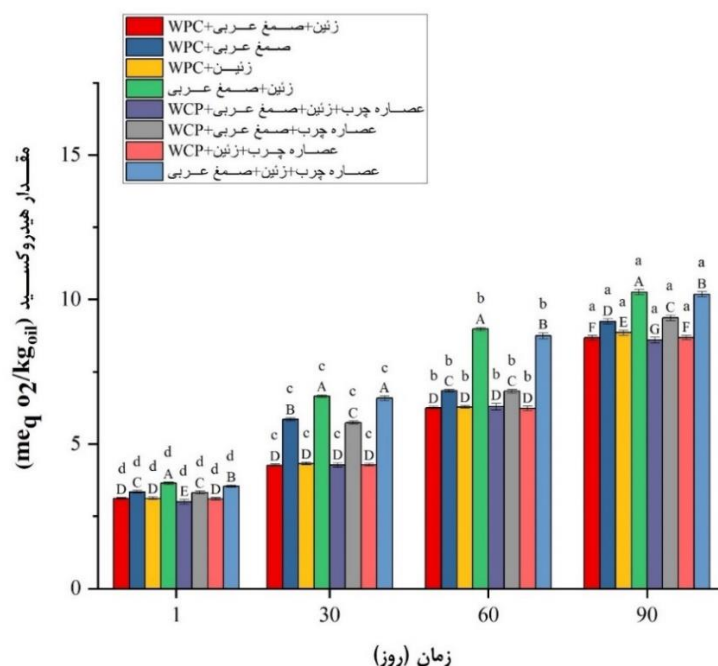
۴-۵-پایداری اکسایشی میکروکپسول‌ها

حفاظت از روغن ماهی به منظور افزایش پایداری آن در طول استفاده و نگهداری ضروری است. علاوه بر کنترل شرایط محیطی که شامل جلوگیری از قرارگیری در معرض نور و اکسیژن، و نگهداری در دماهایی برابر یا پایین‌تر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی می‌شود، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها تأثیرات قابل توجهی بر حفاظت از روغن ماهی دارد (۳۲). در این مطالعه، با استفاده از میزان

پراکسید مراحل اولیه اکسیداسیون در میکروکپسول های تولیدی مورد سنجش قرار گرفت. و با مقدار پیوند مزدوج حین نگهداری تکمیل شد. شاخص p-آنیسیدین، برای اندازه گیری محصولات ثانویه ی اکسیداسیون مانند آلدئیدها سنجیده شد.

۴-۱-۵-پراکسید (PV)

روغن ماهی به دلیل ماهیت اشباع نشده خود در برابر اکسیداسیون آسیب پذیر هست. تعیین پراکسید در محصولات نشان دهنده میزان هیدروپراکسید ها یعنی محصولات اولیه اکسیداسیون لیپیدها است. تغییرات میزان پراکسید میکروکپسول های تولیدی در شکل ۴ نشان داده شد. میزان پراکسید طی زمان نگهداری، اختلاف معنی داری نشان داد. روند افزایشی در میزان پراکسید دیده شد. میزان بیشتر این شاخص، نشان دهنده اکسیداسیون بیشتر است که می تواند منجر به طعم بد و کاهش کیفیت تغذیه ای روغن گردد. و مقدار کمتر نشان دهنده پایداری بهتر اکسیداتیواست که برای حفظ کیفیت روغن ریزپوشانی شده مطلوب است. مقایسه بین تیمارها برای ارزیابی اینکه کدام فرمولاسیون پایداری بهتر اکسیداتیو را منجر می شود صورت گرفت. در روز اول تولید بیشترین میزان پراکسید مربوط به تیمار صمغ عربی + زئین و صمغ عربی + زئین + عصاره چرب بوده است. روند افزایشی میزان پراکسید بین تیمارها طی زمان نگهداری دیده شد. تا روز ۳۰ نگهداری، تیمار صمغ عربی + زئین بدون و با عصاره چرب بالاترین اکسایش و مقدار پراکسید را نشان دادند. و با سایر تیمارها اختلاف معنی داری نشان دادند. این روند تا روز ۶۰ نگهداری ادامه داشت. در روز ۹۰ نگهداری، بین تمامی تیمارها اختلاف معنی داری دیده شد. بیشترین مقدار این شاخص در تیمار صمغ عربی + زئین دیده شد. حضور عصاره چرب در فاز میانی (روغن) تیمارها، در میزان پراکسید تاثیر داشته است. و میزان عددی این تیمارها در طی زمان نگهداری کمتر از تیمارهای بدون عصاره بوده است. Einsinaite و همکاران (۲۰۲۱)، اثر عصاره تمشک سیاه را بر پایداری اکسیداتیو طی ۶۰ روز مورد بررسی قرار دادند. آن ها افزایش مقدار پراکسید در نمونه های بدون عصاره را نسبت به نمونه های حاوی عصاره مشاهده کردند. در مطالعه آن ها روغن خالص به دلیل سطح بالاتر بین فازی قطرات امولسیون و در نتیجه تماس بیشتر با اکسید کننده ها، نرخ اکسیداسیون بیشتر و پراکسید را نشان داد (۳۳). در مطالعه حاضر نیز حضور عصاره چرب میگو به کاهش نرخ اکسیداسیون و پراکسید طی زمان منجر گردید. ترکیب مختلف دیواره در ریزپوشانی مورد مطالعه قرار گرفت. پایداری اکسایشی میکروکپسول ها طی نگهداری ۸ هفته در دمای یخچال بررسی گردید. نتایج حاکی از پایداری اکسیداتیو بالاتر ترکیب دیواره WPC + فوکوئیدان نسبت به سایر ترکیب ها بوده است (۱۴). در مطالعه حاضر نیز ترکیب دیواره WPC + صمغ عربی + زئین بدون و با عصاره چرب بالاترین پایداری اکسیداتیو را نشان داد.



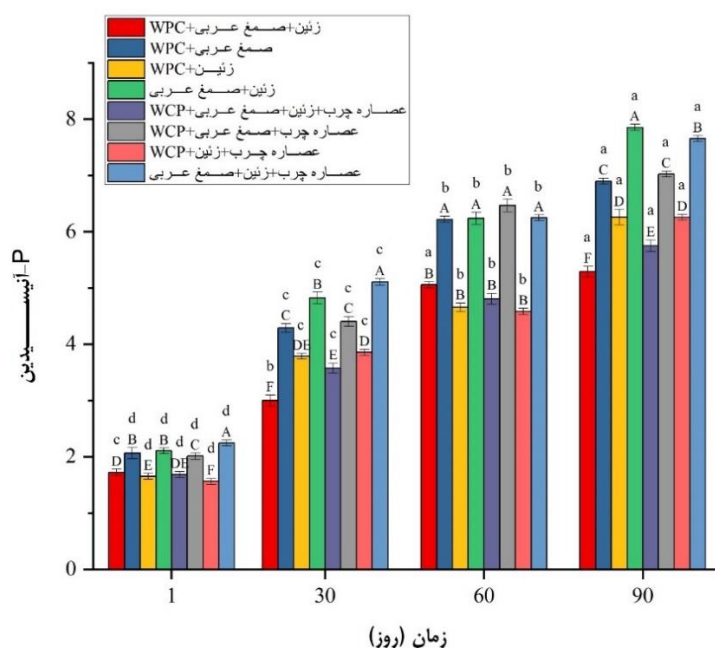
شکل ۴- مقدار پراکسید در میکروکپسول ها طی نگهداری در ۳ ماه.

نتایج به صورت میانگین ۳ تکرار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان دهنده اختلاف آماری در طی زمان می باشد ($p < 0.05$).

۴-۲-۵- شاخص p-آنیسیدین

مقدار P-آنیسیدین شاخص مهمی از محصولات ثانویه اکسیداسیون می باشد. در واقع میزان آلدئیدها طی فرآیند اکسیداسیون سنجیده می شود. مقدار بالاتر این شاخص نشان دهنده اکسیداسیون بیشتر و در نتیجه کیفیت پایین تر روغن می باشد. این شاخص طی زمان نگهداری بررسی گردید. نتایج برای کیفیت تغذیه ای میکروکپسول مهم است. مقادیر پایین تر تخریب کمتر اسیدهای چرب امگا ۳ روغن ماهی را طی زمان نشان می دهد. نتایج در شکل ۵ ارائه گردید. تیمارها در طی زمان اختلاف معنی داری نشان دادند. کمترین میزان در روز اول تولید مربوط به تیمار WPC + زئین + عصاره چرب بود. که این تیمار نیز اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشته است. روند افزایشی در بین تیمارها در زمان نگهداری مشاهده شد. در روز ۳۰ نگهداری، بیشترین میزان در تیمار صمغ عربی + زئین + عصاره چرب بوده است. این روند در روز ۹۰ نیز قابل مشاهده بود. بالاترین بودن مقدار این شاخص در تیمار صمغ عربی + زئین می تواند به بالاتر بودن مقدار روغن سطحی در این تیمار مربوط باشد. و حضور عصاره چرب سبب کاهش اندکی در اکسیداسیون تیمار صمغ عربی + زئین + عصاره چرب شده است. مقادیر P-آنیسیدین رفتارهای متفاوتی را در بین نمونه ها نشان

دادند که به نوع دیواره بستگی داشت. مقادیر متفاوتی از روغن سطحی و محصور شده در میان میکروکپسول‌ها و حضور و عدم حضور عصاره چرب میگو ممکن است بر نرخ تشکیل ترکیبات اکسیداسیون لیپید در طول زمان نگهداری و مقادیر P-آنیسیدین تأثیر گذاشته باشد. احتمالاً، منافذی که به دلیل فرآیند انجماد و خشک کردن ایجاد شدند، امکان جذب اکسیژن را فراهم کردند که منجر به تشکیل پراکسیدها شد. نتایج اکسیداسیون در این مطالعه با نتایج Jamshidi و همکاران (۲۰۱۸) در یک راستا قرار دارد، در مطالعه آن‌ها، میکروکپسول WPC+ فوکوئیدان مقدار کمتری از روغن سطحی را در مقایسه با سایر میکروکپسول‌ها نشان داد که کمترین میزان P-آنیسیدین را داشت (۱۴). در مطالعه حاضر میکروکپسول WPC+ صمغ عربی + زئین کمترین میزان روغن سطحی و مقدار کمتری P-آنیسیدین را نشان داد.

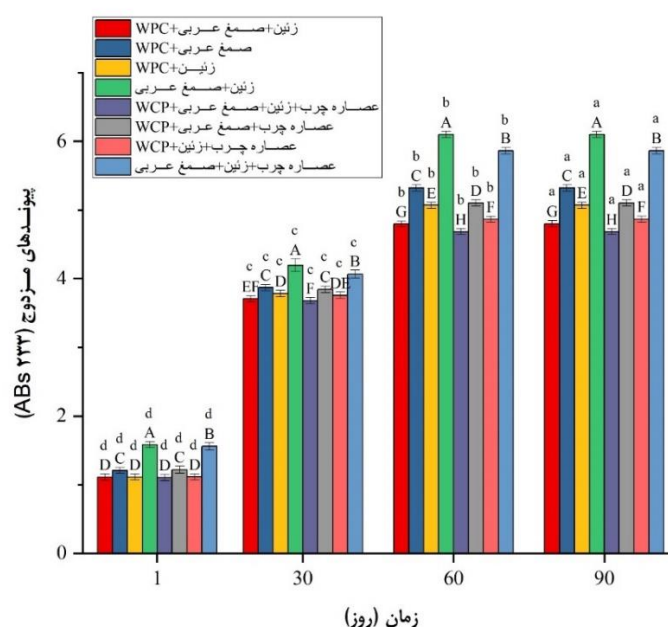


شکل ۵- مقدار P-آنیسیدین در میکروکپسول‌ها طی نگهداری در ۳ ماه.

نتایج به صورت میانگین ۳ تکرار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان‌دهنده اختلاف آماری در طی زمان می‌باشد ($p < 0.05$).

۴-۳-۵- پیوند مزدوج (CD)

اکسیداسیون اولیه با استفاده از پراکسید ارزیابی و با بررسی پیوند مزدوج در طول زمان نگهداری تکمیل گردید (شکل ۶). از روز تولید تا روز ۹۰، اختلاف معنی دار در طی زمان نگهداری دیده شد. همچنین روندی افزایشی در این شاخص بین تیمارها در حین نگهداری مشاهده گردید. در تیمارهای دارای عصاره چرب، مقدار عددی این شاخص کمتر بود. حضور عصاره بر اکسیداسیون اثر مثبتی نشان داد. ترکیب دیواره WPC + صمغ عربی + زئین + عصاره چرب در بین تیمارها، از روز تولید تا روز ۹۰ نگهداری، کمترین میزان این شاخص را نشان داد. بیشترین میزان نیز در تیمار صمغ عربی + زئین دیده شد که در طول زمان نگهداری بالاترین مقدار و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها داشت. حضور WPC در ترکیب دیواره نقش موثری در تاخیر اکسیداسیون داشته است، زئین همراه با WPC کارکرد موثرتری داشته است. Carnino و همکاران (۲۰۱۳)، نیز در مطالعه خود اعلام داشتند پایداری اکسیداتیو میکروکپسول ها تحت تاثیر ماده دیواره در طول نگهداری بوده است (۲۹).



شکل ۶- مقدار پیوند مزدوج در میکروکپسول ها طی نگهداری در ۳ ماه.

نتایج به صورت میانگین ۳ تکرار گزارش شده است. حروف بزرگ لاتین نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار در بین تیمارها و حروف کوچک لاتین نشان دهنده اختلاف آماری در طی زمان می باشد ($p < 0.05$).

۶- نتیجه گیری

محتوای بالای اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در روغن ماهی و تأثیرات مفید آن بر سلامتی انسان (به ویژه برای عملکردهای قلب، مغز و سیستم عصبی) باعث شده تا به عنوان اجزای کارآمد در نظر گرفته شود. به همین خاطر، صنایع دارویی و غذایی به استفاده از روغن ماهی توجه زیادی داشته اند. استفاده از روغن ماهی در رژیم غذایی یکی از روش ها برای تأمین نیاز روزانه به اسیدهای چرب

است. به همین منظور، در این مطالعه، روغن ماهی با تکنیک امولسیون مضاعف ($W_1/O/W_2$) ریزپوشانی شد. همچنین از پروتئین هیدرولیز شده ماهی و عصاره چرب میگو که از ترکیبات زیست فعال دریایی محسوب می شوند در تهیه امولسیون استفاده گردید. از بین ترکیبات مختلف پروتئین و پلی ساکارید در دیواره خارجی، حضور سه ترکیب در دیواره، WPC + صمغ عربی + زئین در بین خواص مورد بررسی امولسیون مضاعف و میکروکپسول های تولیدی نتایج بهتری نشان داد. حضور عصاره چرب در فاز روغن به افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی کمک کرد. و پایداری اکسایشی را بهبود بخشید. در مجموع ریزپوشانی روغن ماهی بر پایداری اکسایشی موثر واقع شد.

۷- منابع

1. Ghorbanzade T, Akhavan-Mahdavi S, Kharazmi MS, Ibrahim SA, Jafari SM. Loading of fish oil into β -cyclodextrin nanocomplexes for the production of a functional yogurt. *Food Chemistry*: 2022;15:100406.
2. Perez-Palacios T, Ruiz-Carrascal J, Solomando JC, De-la-Haba F, Pajuelo A, Antequera T. Recent developments in the microencapsulation of fish oil and natural extracts: procedure, quality evaluation and food enrichment. *Foods*. 2022;11(20):3291.
3. Xie F, Fang Y, Liu X, Cong X, Luo Y, Zhou J, et al. Transformation of W/O/W emulsions and O/W/O emulsions for co-loading selenium-enriched peptide and vitamin E: Design and characteristics. *Journal of Food Engineering*. 2024;360:111702.
4. Hema S, Karmakar A, Das RK, Srivastava P. Simple formulation and characterization of double emulsion variant designed to carry three bioactive agents. *Heliyon*. 2022;8(9).
5. Kocaman E, Karaca AC, Van der Meeren P. Release of amino acids encapsulated in PGPR-stabilized W/O/W emulsions is affected by temperature and hydrophobicity. *Food research international*. 2020;137:109527.
6. Artiga-Artigas M, Molet-Rodríguez A, Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O. Formation of double (W 1/O/W 2) emulsions as carriers of hydrophilic and lipophilic active compounds. *Food and Bioprocess Technology*. 2019;12:422-35.
7. Akhavan-Mahdavi S, Sadeghi R, Esfanjani AF, Hedayati S, Shaddel R, Dima C, et al. Nanodelivery systems for d-limonene; techniques and applications. *Food Chemistry*. 2022;384:132479.
8. Kaushik P, Dowling K, Barrow CJ, Adhikari B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. *Journal of functional foods*. 2015;19:868-81.
9. Huang X, Ge X, Wang Y. Single-layer and double-layer zein–gum arabic nanoencapsulations: Preparation ,structural characterization, thermal properties, and controlled release in the gastrointestinal tract. *Journal of Food Science*. 2022;87(10):4580-95.
10. Hamed SF, Soliman TN, Hassan LK, Abo-Elwafa G. Preparation of functional yogurt fortified with fish oil-in-water nanoemulsion. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2019;62(Special Issue (Part 1) *Innovation in Chemistry*):301-14.
11. McClements DJ, Öztürk B. Utilization of nanotechnology to improve the handling, storage and biocompatibility of bioactive lipids in food applications. *Foods*. 2021;10(2):365.
12. Gómez-Estaca J, Calvo M, Álvarez-Acero I, Montero P, Gómez-Guillén M. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and α -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chemistry*. 2017;216:37-44.
13. Choi M-J, Choi D, Lee J, Jo Y-J. Encapsulation of a bioactive peptide in a formulation of W1/O/W2-type double emulsions: Formation and stability. *Food Structure*. 2020.100-145.

14. Jamshidi A, Shabanpour B, Pourashouri P, Raeisi M. Using WPC-inulin-fucoidan complexes for encapsulation of fish protein hydrolysate and fish oil in W1/O/W2 emulsion: Characterization and nutritional quality. *Food research international*. 2018;114:240-50.
15. Sapei L, Naqvi MA, Rousseau D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. *Food hydrocolloids*. 2012;27(2):316-23.
16. Jiao Z, Wang X, Yin Y, Xia J, Mei Y. Preparation and evaluation of a chitosan-coated antioxidant liposome containing vitamin C and folic acid. *Journal of microencapsulation*. 2018;35(3):272-80.
17. Montero P, Calvo M, Gómez-Guillén M, Gómez-Estaca J. Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and functional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility. *LWT*. 2016;70:229-36.
18. Velasco J, Marmesat S, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(5):1722-9.
19. Feldsine P, Abeyta C, Andrews WH. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *Journal of AOAC international*. 2002;8.
20. Zuta P, Simpson B, Zhao X, Leclerc L. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*. 2007;100(2):800-7.
21. Society AOC. Official methods and recommended practices of the AOCS: *American Oil Chemists' Society*; 1998 .
22. Dickinson E. Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*. 2011;6(1):1-11.
23. Moriano ME, Alamprese C. Whey protein concentrate and egg white powder as structuring agents of double emulsions for food applications. *Food and Bioprocess Technology*. 2020;13:1154-65.
24. Noon J, Mills TB, Norton IT. The use of natural antioxidants to combat lipid oxidation in O/W emulsions. *Journal of Food Engineering*. 2020;281:110006.
25. Pan L, Zhang S, Gu K, Zhang N. Preparation of astaxanthin-loaded liposomes: characterization, storage stability and antioxidant activity. *CyTA-journal of food*. 2018;16(1):607-18.
26. Giménez B, Alemán A, Montero P, Gómez-Guillén M. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*. 2009;114(3):976-83.
27. Chaudhary N, Sabikhi L, Hussain SA, Kumar R, Choudhary U. Emblicanin rich *Emblica officinalis* encapsulated double emulsion and its antioxidant stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2020;122(4):1900316.
28. Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker EA, McClements DJ. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International*. 2006;39(4):449-57.
29. Carneiro HC, Tonon RV, Grosso CR, Hubinger MD. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of food engineering*. 2013;115(4):443-51.
30. Chen Q, Zhong F, Wen J, McGillivray D, Quek SY. Properties and stability of spray-dried and freeze-dried microcapsules co-encapsulated with fish oil, phytosterol esters, and limonene. *Drying Technology*. 2013;31(6):707-16.
31. Solomando J, Antequera T, Ruiz-Carrascal J, Perez-Palacios T. Improvement of encapsulation and stability of EPA and DHA from monolayered and multilayered emulsions by high-pressure homogenization. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2020;44(1):e14290.
32. Boran G, Karaçam H, Boran M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. *Food chemistry*. 2006;98(4):693-8.
33. Eisinaitė V, Kazernavičiūtė R, Kaniauskienė I, Venskutonis PR, Leskauskaitė D. Effect of black chokeberry pomace extract incorporation on the physical and oxidative stability of water-in-oil-in-water emulsion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(11):4570-7.

Production of double emulsion containing fish oil using a freeze-drying method and investigation of oxidative stability

Abstract

In this study, fish oil was microencapsulated using a double emulsion technique and freeze-drying. In the inner aqueous phase, fish protein hydrolysate was used, while the middle oil phase contained fish oil and fish oil + shrimp fat extract. Microcapsules were produced with varying combinations and ratios of the outer wall using whey protein concentrate (WPC) + Arabic gum + zein (4:2:1 (w/w)), WPC + Arabic gum (4:3 (w/w)), WPC + zein (4:3 (w/w)), and Arabic gum + zein (4:3 (w/w)). The creaming index, Antioxidant characterization (DPPH free radical scavenging and Ferric reducing power (FRAP) assay), efficiency of fish oil microencapsulation, particle size distribution, and zeta potential were assessed. Additionally, the oxidative stability (peroxide value, p-anisidine, and conjugated dienes) of the microcapsules was evaluated during three months of storage. The results indicated that the presence of shrimp fat extract in the middle phase contributed to increased antioxidant properties and improved oxidative stability. The WPC + Arabic gum + zein treatment showed the lowest creaming index and the highest stability over time. The highest encapsulation efficiency of oil (75.55%) was also observed in this treatment. The oxidative stability assessment results showed that the type and composition of the outer wall affected oxidation. The WPC + Arabic gum + zein microcapsule exhibited the lowest oxidation levels over the three months.

Keywords: fish oil, microencapsulation, double emulsion, zein, WPC