Archive of SID

بهینه سازی نانوریزپوشانی اسید فولیک به کمک روش تاگوچی

الهام اسدپور[۱]، یحیی مقصودلو[۲]، سید مهدی جعفری[۳*]، محمد قربانی[۴]، مهران اعلمی[۵]

۱- استادیار، گروه صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی بهاران، ایران.
۲- استاد گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۳- دانشیار گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۴- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.
۵- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۵/۲۶)

چکیده

به دلیل حساسیت اسید فولیک همانند بسیاری از ویتامین‌های دیگر به شرایط محیطی و عملیات فرآوری، ضروری است که توسط روش‌هایی با کارایی بالا نظیر میکرو/نانوانکپسولاسیون از این ویتامین محافظت شود. هدف پژوهش حاضر، پیداکردن شرایط بهینه تولید امولسیون‌های دوگانه پکتین-کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC[1]) برای نانوانکپسوله‌کردن اسیدفولیک ازطریق فرآیند خشک‌کردن پاششی بود. برای این منظور، ۵ متغیر مستقل همراه با محدوده عملیاتی آنها شامل غلظت پکتین، غلظت WPC، میزان فاز پراکنده، pH و نوع سامانه سورفکتانت به‌عنوان متغیرهای تیمار و راندمان انکپسولاسیون (EE[2]) به‌عنوان متغیر پاسخ اصلی انتخاب شدند. طرح‌ریزی آزمایش‌ها دراین مرحله به کمک روش تاگوچی صورت گرفته و ۱۶ تیمار تعیین گردید. امولسیون‌های دوگانه نهایی، فرمولاسیون‌هایی بودند که حاوی یک نانو/میکروامولسیون داخلی متشکل از سامانه آب (دارای اسیدفولیک محلول) در روغن و یک فاز آبی بیرونی متشکل از کمپلکس بیوپلیمری پکتین-WPC بودند. میانگین کلی راندمان انکپسولاسیون اسیدفولیک در این سامانه حدود ۸۸/۳ درصد در محدوده ۸۲/۳ تا ۹۵/۰ درصد بدست آمد. آنالیز اثرات اصلی با روش تاگوچی نشان داد که میزان فاز پراکنده امولسیون-های دوگانه، مهمترین تیمار اثرگذار بر EE بوده (۳۶٪) و سامانه سورفکتانت دارای کمترین تاثیر (۵٪) بود. همچنین، نتایج این مرحله مشخص نمود که مهمترین برهم‌کنش بین متغیرهای مستقل با توجه به اثرگذاری بر EE، مربوط به اثر متقابل بین WPC و میزان فاز پراکنده می‌باشد درحالی‌که اثر متقابل پکتین-pH دارای کمترین تاثیر بود. درمجموع، شرایط بهینه عبارت بود از غلظت پکتین ۱٪، غلظت WPC ۴٪، میزان فاز پراکنده ۱۵٪، pH برابر ۶ و سامانه سورفکتانت PGPR[3] با نانوامولسیون داخلی که قادر است راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک را به ۹۹٪ برساند.

کلیدواژگان: اسید فولیک، نانوانکپسولاسیون، بهینه‌سازی، خشک‌کردن پاششی، امولسیون دوگانه.

* مسئول مکاتبات: smjafari@gau.ac.ir

1. Whey Protein Concentrate
2. Encapsulation Efficiency
3. Poly Glycerol Poly Ricinoleate

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده است که رژیم‌های حاوی غلظت‌های پایین یا ناکافی فولات ممکن است منجر به بروز برخی ناهنجاری‌ها و اختلالات عملکردی در انسان شود. در بسیاری از کشورها، بویژه کشورهای در حال توسعه، مردم از کمبود مصرف فولاتها رنج می‌برند و جذب فولات کمتر از مقدار توصیه‌شده است. لذا غنی‌سازی محصولات غذایی با اسید فولیک به‌صورت اجباری انجام می‌شود. برای غنی‌سازی مواد غذایی، آرد غلات یکی از گزینه‌های اصلی می باشد چراکه توسط عمده مردم مصرف می شوند. برای‌مثال مقدار غنی سازی در ایالات‌متحده آمریکا ۱۴۰ µg و در انگلستان ۲۴۰µg اسید فولیک به ازای هر ۱۰۰gr آرد می‌باشد [۱]. در کشور ما نیز در سال‌های اخیر غنی سازی آرد با اسید فولیک به‌صورت اجباری انجام می‌شود که البته این روش با مشکلاتی همراه است. اسید فولیک به خاطر دارابودن ویژگی‌های ویتامینی و سلامتی‌بخش، باید در مقابل شرایط نامساعد محیطی، مورد محافظت قرار گرفته و میزان رهایش آن پایش گردد زیرا اسید فولیک و فولات‌ها به شرایط عملیاتی و فرآوری و همچنین شرایط نگهداری بسیار حساس می‌باشند و از بین می روند. به‌همین منظور، در این پژوهش برای افزایش پایداری این ترکیبات، فناوری نانوریزپوشانی ارایه شده است که روشی مؤثر در حفظ ترکیبات حساس در مقابل فراوری می‌باشد.

رایج ترین روش آزادسازی کنترل‌شده در صنعت غذا میکروانکپسولاسیون[1] یا ریزپوشانی نام دارد که عبارت است از به دام افتادن یک ماده در ماده‌ی دیگر که منجر به تولید ذراتی با قطر چند نانومتر تا چند میکرومتر می‌گردد. ماده محصور شده تحت عنوان هسته[2]، عامل فعال[3]، یا فاز داخلی[4]، و ماده احاطه‌کننده تحت عنوان ماده دیواره[5]، پوشش[6]، و یا فاز خارجی[7] نامیده می‌شود.

انتخاب روش انکپسولاسیون و مواد مورد استفاده بستگی به کاربرد محصول انکپسوله‌شده شامل رهایش ترکیبات هسته‌ای دارد. امولسیفیکاسیون و مواد امولسیفیه‌کننده نقش مهمی را در ریزپوشانی ایفا می‌کنند. بر اساس مطالعات انجام‌شده، قطرات کوچکتر روغن با ثبات بیشتری در محصول ریزپوشانی‌شده باقی می‌مانند و میکروکپسول‌های تولید شده با امولسیون با قطرات کوچک دارای روغن بدون پوشش کمتری هستند [۲]. بسیاری از خصوصیات امولسیون‌ها از قبیل پایداری، رئولوژی، ظاهر، حفظ طعم، رنگ و بافت به قطر متوسط و توزیع اندازه قطرات بستگی دارد [۳ و ٤]. به‌عنوان مثال هر چه اندازه قطرات کوچک‌تر باشد، ظاهر امولسیون از سفید به شفاف میل می‌کند و در عین حال پایداری امولسیون نیز افزایش می‌یابد [۳]. از این‌رو واضح است که کنترل دقیق اندازه قطرات در امولسیون‌های تهیه شده برای کاربردهای مختلف اهمیت بسیار زیادی دارد.

بر اساس اندازه قطرات نیز امولسیون‌ها را می‌توان به انواع میکروامولسیون[8] (۱۰-۱۰۰nm)، مینی یا نانوامولسیون[9] (۱۰۰-۱۰۰۰nm) و ماکروامولسیون[10] (۰/۵-۱۰۰µm) تقسیم کرد [۵]. کاربرد نانوامولسیون‌ها به‌عنوان سامانه‌های رسانش نوین ترکیبات زیست فعال در صنایع غذایی و دارویی روزبه روز درحال گسترش است. نانوامولسیون‌های واقعی، سامانه‌هایی هستند که حاوی قطراتی با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر در فاز پراکنده خود هستند و موسوم به میکروامولسیون‌ها می‌باشند [۳]. فواید بالقوه میکروامولسیون‌ها عبارت است از شفافیت ظاهری، پایداری بالا در مقابل دوفازشدن، به‌هم چسبیدن قطرات و ملحق شدن آنها، جذب بالا و زیست‌دسترسی مناسب به ترکیبات زیست فعال و فراسودمند. میکروامولسیون یک سامانه پایدار ازنظر ترمودینامیکی است که به صورت خودبه‌خودی تشکیل شده و دارای ظاهری کاملا شفاف است.

در سال های اخیر، سامانه‌های معلق پیچیده‌ای از یک مایع در مایع دیگر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است که به آنها امولسیون‌های دوگانه گفته می‌شود. در این امولسیون‌ها (که امولسیون‌های چندگانه یا دوبلکس هم نامیده می‌شوند)، امولسیونی از یک امولسیون دیگر تهیه می‌شود مانند امولسیون روغن در آب در روغن (O/W/O) و یا امولسیون آب در روغن در آب (W/O/W). در حالت دوم، قطرات آب (W_1) در یک قطره بزرگتر روغن (O) پخش شده‌اند که خود در یک فاز پیوسته آبی دیگر (W_2) قرار گرفته است. در این نوع

1. Microencapsulation
2. Core material
3. Active agent
4. Internal phase
5. Wall material
6. Coating
7. External phase
8. Microemulsion
9. Nanoemulsion
10. Macroemulsion

www.SID.ir

Archive of SID

امولسیون، دو لایه بین‌سطحی متفاوت وجود دارد یکی لایه بین سطحی W_1-O دراطراف قطرات آب داخلی و دیگری، لایه بین سطحی O-W_2 در اطراف قطرات روغن. متعاقب آن، معمولا دو نوع امولسیفایر متفاوت برای پایدارسازی امولسیون $W_1/O/W_2$ نیاز است: یک امولسیفایر محلول در روغن برای قطرات آب داخلی و یک امولسیفایر محلول در آب برای قطرات روغن. به دلیل افزایش سطح تماس، امولسیون‌های دوگانه نسبت به امولسیون‌های ساده و معمولی دارای پایداری ترمودینامیکی پایین‌تری هستند. درمجموع، امولسیون‌های دوگانه دربرابر شرایط فرآوری حساس بوده و امکان تخریب آنها مثلا ازطریق مهاجرت آب بین فازهای آبی داخلی و بیرونی وجود دارد که در این صورت، تبدیل به امولسیون‌های ساده و تک گانه خواهند شد [۶ و ۷].

روش تاگوچی یک تکنیک بهینه‌سازی فرآیند-محصول برپایه مراحل مختلف شامل طرح‌ریزی، اجرا و ارزیابی نتایج ماتریس آزمایش‌ها برای تعیین بهترین سطوح فاکتورهای کنترل و تاثیر آنها بر ویژگی‌های مشخص و درنهایت، پیداکردن شرایط بهینه فرآیند می‌باشد. این تکنیک در بسیاری از فرآیندهای تولیدی از دهه ۱۹۶۰ به‌کاررفته و امروزه تعداد زیادی از کارخانه‌های تولیدی و شرکت‌های مهندسی از آن به‌عنوان یک روش کارآمد و موثر استفاده می‌کنند. درواقع، روش تاگوچی به‌عنوان یک روش جایگزین طرح‌ریزی فاکتوریل مطرح شده است. به‌دلیل اینکه این روش منجر به کاهش تعداد آزمایش‌ها می‌شود، کاربرد ساده‌تر و سریع‌تری داشته و درعین حال، دقیق و قابل اتکا می‌باشد و می‌تواند باعث کاهش زمان انجام آزمایش‌ها و صرفه‌جویی در هزینه‌ها شود. به‌طورکلی، روش تاگوچی می‌تواند شرایطی از آزمایش را که دارای بهترین اثر بر ویژگی‌های مورد نظر هستند (شرایط بهینه)، مشخص نماید [۸].

باتوجه به مطالب گفته‌شده می‌توان گفت که ریزپوشانی، روشی کارآمد در حفظ اسید فولیک و مشتقات آن در شرایط مختلف فرآوری بوده است. البته در هیچ روش مورد مطالعه از امولسیون دوگانه و نانوامولسیون استفاده نشده است و با توجه به فواید این روش می توان پایداری این ماده حساس در شرایط محیطی و در عین حال، ضروری از نظر تغذیه‌ای را با حداکثر کارایی انجام داد و با پیاده‌سازی شرایط مختلف در سیستم مدل، امکان استفاده از آن درغنی سازی محصولات غذایی را فراهم نمود. اگرچه برای ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال مختلف از انواع بیوپلیمرها استفاده شده است اما پژوهش خاصی در مورد طراحی سامانه نانوحامل کمپلکسی که قادر به رهایش کنترل شده اسید فولیک از امولسیون‌های دوگانه W/O/W باشد، گزارش نشده است. در این پژوهش، هدف اصلی تولید یک نانوحامل جدید برای اسید فولیک از طریق تهیه امولسیون‌های چندگانه W/O/W و پایدارشده با بیوپلیمرهای پروتئینی-پلی ساکاریدی (پروتئین آب پنیر-پکتین) است. ازآنجایی که پارامترهای مختلفی بر تشکیل کمپلکس بیوپلیمری و امولسیون‌سازی نهایی اثرگذار هستند مانند نسبت بیوپلیمرهای به‌کاررفته، pH محیط، غلظت هریک از بیوپلیمرها، مقدار ترکیب زیست‌فعال، درصد حجمی فاز پراکنده امولسیون، نوع سورفکتانت و غیره، لذا ضروری است مهمترین فاکتورها انتخاب شده و دانش و اطلاعات کافی درزمینه برهمکنش بین این فاکتورها نیز وجود داشته باشد و درنهایت اینکه، فرآیند مذکور بهینه شود. روش تاگوچی می تواند روشی کارآمد برای این منظور باشد طوری که به کمک آن می توان حداقل تعداد تیمارهای آزمایشی را با حداکثر تعداد متغیرهای مستقل طرح‌ریزی نمود. با هدف بهبود راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در فرمولاسیون‌های امولسیونی W/O/W و با به‌کارگیری کمپلکس پکتین-پروتئین آب پنیر در فاز بیرونی آنها، برای اولین بار از روش تاگوچی در این پژوهش استفاده می‌شود.

۲- مواد و روش ها

اسید فولیک با درجه خلوص بالای ۹۷٪ از شرکت سیگما، آمریکا خریداری شد. کنسانتره پروتئین آب پنیر و پکتین به‌ترتیب از شرکت آرلا، دانمارک (حداقل پروتئین ۸۰٪) و سیگما، آمریکا (درجه متیل استریفیکاسیون ۷۱٪) تهیه شدند. سوربیتان مونواولئات با نام تجاری اسپن ۸۰ از شرکت مرک آلمان و پلی گلیسرول پلی رسینولئات از شرکت پالسگارد دانمارک خریداری شد. مالتودکسترین با دکستروز اکی‌والان ۱۶ تا ۲۰ از شرکت کینهوانگ چین تهیه شد. سایر مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های معتبر و با درجه خلوص بالا تهیه شدند.

به‌منظور تهیه میکروامولسیون‌ها، در ابتدا برای هر تیمار، طبق میزان بیان‌شده در جدول ۱، فاز پراکنده حاوی اسید فولیک و سورفکتانت با یکدیگر مخلوط شده و توسط همزن مغناطیسی

www.SID.ir

Archive of SID

با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه، در شرایط محیط آزمایشگاه همزده شدند. سپس، مخلوط حاصل قطره قطره به فاز روغنی اضافه شده و همزدن آنها ادامه یافت. درارابطه با نمونه‌های نانوامولسیون نیز پس از انجام فرمولاسیون‌های موردنظر، امولسیون‌های نهایی با هموژنایزر اولتراتوراکس با دورrpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه هموژن شدند [۹].

۲-۱- تهیه محلول بیوپلیمرها

محلول پروتئین آب پنیر: ابتدا پودر پروتئین آب پنیر به آب اضافه گردیده و بعد از هم زدن به‌مدت یک شب در داخل یخچال نگهداری شد. سپس pH محلول با استفاده از بافر فسفات روی ۷ تنظیم شده و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل حمام آب ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا ساختار پروتئینی جهت کارایی بالا باز شود. غلظت‌های وزنی-وزنی تهیه شده برای محلول پروتئین آب پنیر عبارت بودند از ٤، ٦، ٨ و ١٠ درصد (جدول ۱).

تهیه محلول پکتین: ابتدا پودر پکتین به آب با pH=۳ اضافه شده و برای حل شدن بهتر به مدت ۲ ساعت روی هات پلیت استایرر در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد هم زده شد. برای تغییر pH محلول پکتین ازHCL ۰/۱ نرمال و بافر فسفات استفاده گردید. غلظت‌های تهیه شده برای محلول پکتین، ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۰ درصد وزنی-وزنی بود.

محلول کمپلکس پروتئین آب پنیر و پکتین: برای این کار، ابتدا محلول پروتئین آب پنیر و محلول پکتین مطابق توضیحات فوق به صورت جداگانه تهیه شده و سپس این دو محلول، باهم مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت با هات پلیت استایرر هم زده شده و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری گردید. برای تغییر pH محلول با توجه به مقادیر تعیین شده در جدول ۱ از HCL ۰/۱ نرمال و بافر فسفات استفاده شد [۱۰].

تهیه محلول مالتو دکسترین: ابتدا پودر مالتودکسترین به آب اضافه شده و بعد از هم زده شدن، به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری گردید تا به صورت کامل حل شود [۱۱].

ضمنا به‌تمامی محلول‌ها، سدیم‌آزاید به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی باغلظت ۰/۰۲ درصد اضافه گردید.

۲-۲- تهیه امولسیون دوگانه W/O/W

امولسیون دوگانه اسید فولیک به شکل آب در روغن در آب در دو مرحله تشکیل شد. در مرحله اول امولسیون‌سازی، محلول آبی اسید فولیک در روغن به صورت میکروامولسیون یا نانوامولسیون مطابق توضیحات قبلی تولید شد. در مرحله دوم میکرو/نانوامولسیون تولیدی به فاز آبی خارجی حاوی بیوپلیمرها اضافه شده و دو مرتبه در دورهای rpm ۱۲۰۰۰و rpm ۱۵۰۰۰ هموژن گردید تا امولسیون دوگانه تولید شود [۱۲].

۲-۳- تولید پودرهای حاوی اسیدفولیک ریزپوشانی شده توسط خشک‌کن پاششی

به‌منظور تبدیل نمونه های امولسیون دوگانه به پودرهای نهایی در دستگاه خشک‌کن پاششی پایلوت، برای هر تیمار ۳۰۰ میلی‌لیتر نمونه آماده شد و در مخزن خوراک قرار گرفت. سایر شرایط خشک‌کردن بر اساس شرایط بهینه خشک‌کردن پاششی نمونه‌های پیش تست شده تعیین شد.

Table 1 Design factors of Taguchi experiment applied in this study

Factors	Used levels			
Independent variables	1	2	3	4
Pectin content (A) (%, w/w)	0.5	1.0	1.5	2.0
WPC content (B) (%, w/w)	4.0	6.0	8.0	10.0
Dispersed phase volume fraction, DPVF[1] (C) (%, v/v)	10.0	15.0	20.0	30.0
pH	6	7	8	9
Surfactant type	Span[a]	Span[b]	PGPR[a]	PGPR[b]
Dependent variables	Responses			
Encapsulation efficiency (%)	Y			

[a] Internal phase was composed of micro-emulsions (with a droplet size of less than 100 nm)
[b] Internal phase was a nano-emulsion (100-1000 nm).

1. Dispersed Phase Volume Fraction

www.SID.ir

Archive of SID

این شرایط شامل دمای ورودی و خروجی به ترتیب ۱۸۰ و ۹۰ درجه سانتی گراد، شدت جریان خوراک ۴۵۰ میلی‌لیتر در ساعت، دمای خوراک ورودی ۲۵ °c، شدت جریان هوا ۷۵ مترمکعب در ساعت، و فشار اتمیزاسیون ۲۰ psi بود. پس از خشک‌شدن درزمان حدود ۳۰ دقیقه، پودرهای تولید شده از سایکلون جمع‌آوری شده و بلافاصله در ظروف شیشه‌ای قهوه‌ای درب‌دار با درب پیچشی ریخته شدند و تا انجام آزمون‌های نهایی در فریزر نگهداری شدند [۱۱].

۲-۴- اندازه گیری میزان اسیدفولیک سطحی [1]

میزان ترکیب سطحی (ریزپوشانی نشده) بر روی پودرهای ریزپوشانی‌شده شاخصی تاثیرگذار در فرآیند ریزپوشانی است که به همراه راندمان، نشان‌دهنده توانایی مواد دیواره‌ای در به دام انداختن مواد هسته‌ای می‌باشد. تعیین مقدار ماده سطحی در مواد محلول در آب همچون اسیدفولیک نسبتا دشوار است زیرا ماهیت مشابه مواد دیواره‌ای و هسته، امکان تعیین دقیق میزان اسیدفولیکی را که صرفا بر روی سطح نانوکپسول مانده است با مشکل روبه رو می‌کند. در این پژوهش به منظور تعیین اسیدفولیک سطحی از روش اصلاح شده پرز و همکاران (۲۰۱۵) استفاده شد. به این صورت که ۵۰۰ میلی گرم نمونه پودر به طور مستقیم به مدت ۲ دقیقه با ۲۰ میلی لیتر هگزان توسط ورتکس همزده شده و بعد از اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر اتانول، به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۰ °c ، با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. بعد از جداشدن فازها، سوپرناتانت به‌دست آمده جمع آوری و با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۱ صاف شد. میزان اسیدفولیک سطحی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۸۲/۵ نانومتر تعیین شد [۱۳]. به منظور مقایسه کارایی این روش در تعیین اسیدفولیک سطحی، یک نمونه قرص تجاری اسید فولیک نیز موردآنالیز قرار گرفت تا با بررسی نتایج، صحت اندازه گیری میزان اسیدفولیک سطحی توسط روش اسپکتروفتومتری تایید شود.

۲-۵- تعیین راندمان ریزپوشانی

میزان حفظ اسیدفولیک پس از ریزپوشانی با راندمان و به صورت معادله ۱ گزارش می‌شود که در این معادله EE راندمان ریزپوشانی، TFA میزان اسیدفولیک کل نمونه‌های پودر پس از ریزپوشانی و SFA میزان اسیدفولیک سطحی به‌دست آمده در بخش۲-۴ می‌باشد. به منظور تعیین میزان اسیدفولیک کل، مقدار ۱۰۰ میلی گرم پودر، وزن شده و در ۷ میلی لیتر هگزان و ۳ میلی لیتر بافر فسفات (pH=9.5) حل شد. سپس به منظور تخریب غشای نانوکپسول‌ها، نمونه ها توسط به مدت ۵ دقیقه تحت تاثیر امواج اولتراسوند با شدت قرار گرفته و در دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. درادامه فاز سوپرناتانت استخراج شده و پس از رقیق سازی نمونه ها به اندازه کافی، میزان اسید فولیک مطابق بخش قبلی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. درنهایت، راندمان ریزپوشانی بر اساس معادله ۱ محاسبه شد [۱۴].

$$\% EE = \frac{(TFA-SFA)}{TFA} \times 100 \qquad \text{معادله (۱)}$$

۲-۶- روش های آماری

برای بهینه‌سازی نانوانکپسوله کردن اسید فولیک توسط خشک‌کن پاششی، آزمایش‌ها به کمک روش تاگوچی و با نرم-افزار مینی‌تب (نسخه ۱۶) طرح‌ریزی شدند. داده‌های به‌دست آمده پس از انجام آزمایش‌ها به وسیله نرم افزار Qualitek (نسخه ۴، نوتک، آمریکا) مورد تحلیل قرار گرفتند. برمبنای آزمایشات اولیه، فاکتورهای مستقل و وابسته انتخاب شدند (مطابق جدول ۱) و پس از تعیین سهم هر یک از فاکتورهای مستقل بر پاسخ ها و همچنین اثر متقابل آنها، بهینه سازی فرمولاسیون‌ها انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین فاکتورهای مهم و سطوح آنها

به منظور انتخاب مهمترین فاکتورها و محدوده قابل بررسی آنها که بر روی راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک اثرگذار است، ابتدا یک سری پیش آزمایش انجام گرفت. محدوده آزمایشی پکتین، کنسانتره پروتئین آب پنیر، درصد حجمی فاز پراکنده و pH به ترتیب معادل ۰/۵ تا ۲ درصد وزنی-وزنی، ۴ تا ۱۰ درصد وزنی- وزنی، ۱۰ تا ۳۰ درصد حجمی و ۶ تا ۹ تعیین گردید که در جدول ۲ نمایش داده شده است. همچنین، دو نوع سورفکتانت اسپن و پلی گلیسرول پلی رسینولئات (PGPR) نیز برای آماده سازی فاز داخلی امولسیون‌های دوگانه در دو نوع متفاوت میکرو و نانوامولسیون بعنوان فاکتور پنجم درنظر گرفته شد. به‌منظور دستیابی به فرمولاسیون بهینه،

1. Surface content

www.SID.ir

Archive of SID

در هر زمان یک فاکتور باید تغییر یابد که باعث افزایش بیش ازحد تعداد تیمارها و در نتیجه، هدر رفتن مواد مصرفی و طولانی شدن زمان انجام آزمایشات می‌گردد. بنابراین، برای به‌حداقل رساندن تعداد تیمارها و مطالعه تاثیر فاکتورها در تمام شکل‌های ترکیبی ممکن، طرح‌ریزی تاگوچی در مرحله طراحی آزمایشات به‌کارگرفته شد تا بادرنظرگرفتن محدوده تعریف‌شده متغیرها، بتوان فرمولاسیون بهینه‌ای حاوی اسیدفولیک با بیشترین راندمان انکپسولاسیون تولید نمود.

Table 2- Experiment design performed by Taguchi and results for encapsulation efficiency (EE)

EE (%)	Surfactant*	pH	DPVF	WPC	Pectin	Treatment No.
93.18	1	6	10	4	0.5	1
91.22	2	7	15	6	0.5	2
82.49	3	8	20	8	0.5	3
83.94	4	9	30	10	0.5	4
95.00	4	8	15	4	1.0	5
90.46	3	9	10	6	1.0	6
90.02	2	6	30	8	1.0	7
88.53	1	7	20	10	1.0	8
82.30	2	9	20	4	1.5	9
84.96	1	8	30	6	1.5	10
83.83	4	7	10	8	1.5	11
90.57	3	6	15	10	1.5	12
94.19	3	7	30	4	2.0	13
84.56	4	6	20	6	2.0	14
87.36	1	9	15	8	2.0	15
90.01	2	8	10	10	2.0	16

* Level 1: Microemulsion formulated with Span; Level 2: Nanoemulsion formulated with Span; Level 3: Microemulsion formulated with PGPR; Level 4: Nanoemulsion formulated with PGPR.

۳-۲- نتایج اندازه قطرات امولسیون های دوگانه

همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، متوسط اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه تولیدی حدود ۸۰ تا ۱۰۰ نانومتر بوده و آنالیز اندازه آنها به روش تفرق نور دینامیک (DLS[1]) با دستگاه زتاسایزر (مالورن، انگلستان) تاییدکننده این مطلب است.

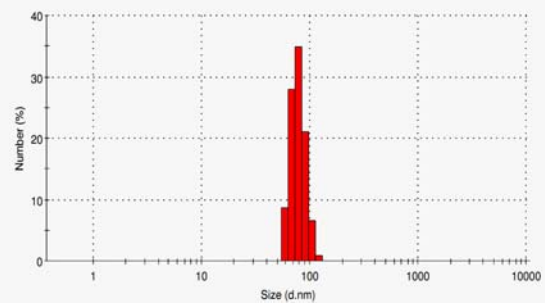


Fig 1 Droplet size analysis results of double emulsions containing folic acid by Dynamic Light Scattering (DLS) technique for the formulation No. 1: 0.5% pectin; 4.0% WPC; 10% dispersed phase volume fraction of Span based nano-emulsion containing folic acid with a pH= 6.

۳-۳- تاثیر اصلی متغیرهای مستقل بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک

اگرچه تیمارهای طراحی‌شده با روش تاگوچی منجر به تولید نمونه‌هایی با راندمان انکپسولاسیون مناسب در محدوده ۸۲/۳ تا ۹۵ درصد گردید (جدول ۲)، اما انتخاب بهترین فرمولاسیون کار ساده‌ای نبود. بنابراین، پاسخ به‌دست آمده یعنی راندمان انکپسولاسیون برای هر تیمار باتوجه به متغیرهای مستقل تعریف‌شده مورد بررسی و تحلیل قرار گرفت. این کار همچنین باعث مشخص‌شدن اهمیت هر فاکتور و تعیین سطوح بهینه آنها در فرمولاسیون بهینه نهایی می‌گردد. نتایج مربوط به پاسخ راندمان انکپسولاسیون با درنظرگرفتن "بهترین پاسخ، بیشترین است" برای صحت بهتر و دقیق‌تر داده‌های ثبت‌شده تفسیر شد. بیشترین و کمترین مقدار راندمان انکپسولاسیون به ترتیب برای نمونه‌های شماره ۵ (۹۵ درصد) و ۹ (۸۲/۳ درصد) بدست آمد. در رابطه با هر فاکتور در سطوح مختلف آن، نمودار اثرات اصلی ترسیم شد به‌طوری که سطوح متغیرها در محور افقی و راندمان انکپسولاسیون در محور عمودی نمایش داده شد (شکل ۲). این نمودار بیانگر تاثیر جداگانه هر

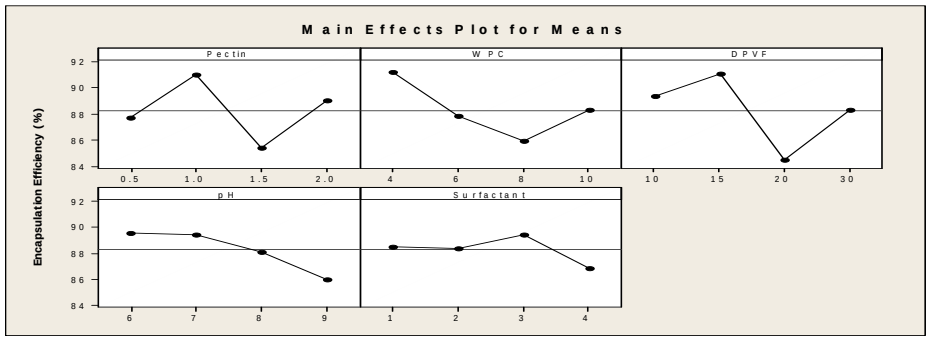
1. Dynamic Light Scattering

www.SID.ir

Archive of SID

یک از فاکتورهای اصلی بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در فرمولاسیون‌های مختلف می باشد.

یک شرط مهم برای تشکیل کمپلکس های الکترواستاتیک، طبیعتا وجود بارهای الکتریکی مختلف بر روی ترکیبات واکنش‌دهنده می باشد. به‌طور معمول این فرآیند از طریق به‌کارگیری یک پلی ساکارید آنیونی (مثلا پکتین) در ترکیب با یک پروتئین (کنسانتره پروتئین آب پنیر در پژوهش حاضر) صورت می‌گیرد که دارای بار مثبت در pH کمتر از نقطه ایزوالکتریک خود می‌باشد [۱۵ و ۱۶]. درمورد پلی‌ساکاریدهایی نظیر پکتین، بار منفی عمدتا ناشی از حضور گروه‌های کربوکسیل بوده و درمورد پروتئین‌ها، بار مثبت معمولا در pHهای اسیدی و پایین تر از نقطه ایزوالکتریک آنها وجود خواهد داشت [۱۷ و ۱۸]. نتایج ما (شکل ۲) نشان داد که غلظت فاز پراکنده یعنی میزان نانومولسیون آب در روغن اسید فولیک بعنوان فاز داخلی امولسیون دوگانه و همچنین، غلظت بیوپلیمرهای بکاررفته در فاز آبی بیرونی امولسیون‌های دوگانه تاثیر قابل توجهی بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در فرمولاسیون‌های تولیدی داشت.



Delta	Level 4	Level 3	Level 2	Level 1	Factors
5.59	89.03	85.41	91.00	87.71	Pectin
5.24	88.26	85.92	87.80	91.17	WPC
6.57	88.28	84.47	91.04	89.37	DPVF
3.57	86.02	88.11	89.44	89.58	pH
2.59	86.83	89.43	88.39	88.51	Surfactant

Fig 2 Taguchi analysis for main effects: EE (%) of folic acid versus Pectin; WPC; DPVF; pH; Surfactant.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، بیشترین راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک زمانی به‌دست آمده است که غلظت پکتین و کنسانتره پروتئین آب پنیر به ترتیب برابر ۱ و ٤ درصد وزنی بوده است. به عبارت دیگر، یک نسبت وزنی ۱ به ٤ از پکتین: پروتئین آب پنیر منجر به تولید نمونه‌ای با بالاترین راندمان انکپسولاسیون شده است. این نتایج نشان می‌دهد که امولسیون‌های دوگانه تولیدی با ۱ درصد پکتین و ٤ درصد پروتئین آب پنیر دارای پایداری مناسبی بوده و رهایش کمی از اسید فولیک از نانوامولسیون‌های فاز داخلی به فاز آبی بیرونی در امولسیون‌های دوگانه رخ داده است که در نتیجه، بیشترین راندمان انکپسولاسیون را به‌همراه داشته است. در نسبت‌های کمتر یا بیشتر پکتین: پروتئین آب پنیر، تشکیل کمپلکس بین این دو بیوپلیمر با بار مخالف دارای استحکام و قدرت کافی برای حفاظت از اسید فولیک انکپسوله‌شده در فاز داخلی نبوده و به‌دنبال آن، منجر به رهایش و مهاجرت این ترکیب ویتامینی از فاز داخلی به فاز بیرونی امولسیون‌های دوگانه و درنتیجه، کاهش راندمان انکپسولاسیون می‌گردد. لوتز و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ [۱۹] با مطالعه برروی امولسیون‌های دوگانه تولید شده از ایزوله پروتئین آب پنیر–پکتین دریافتند که نسبت وزنی ٤ به ۰/۵ (پکتین) از این دو بیوپلیمر باعث تولید امولسیون‌هایی با کوچکترین اندازه قطرات و بیشترین پایداری گردید. شاید اختلاف بین نسبت بهینه این پژوهشگران با نسبت بهینه‌ای که در پژوهش حاضر به‌دست آمده است مربوط به اختلاف در درجه خلوص بیوپلیمرهای پروتئین (کنسانتره پروتئین آب پنیر در مقایسه با ایزوله آن) و پکتین (دارای متوکسیل کم در مقایسه با پکتین اصلاح شده) مصرفی و در نتیجه، وجود اختلاف در داده‌های رئولوژیکی/فیزیکوشیمیایی بین نمونه های این دو پژوهش باشد.

با بررسی درصد حجمی فاز پراکنده، به‌طور کلی، مقادیر کمتر این فاز منجر به تولید امولسیون‌های دوگانه با راندمان انکپسولاسیون بالاتری شد که با نتایج شوچ و همکاران در سال ۲۰۱۳ [۲۰] مطابقت دارد. این پژوهشگران دریافتند که در

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت‌های بالای فاز امولسیون داخلی، قطرات فاز پراکنده به یکدیگر ملحق شده و ناپایداری امولسیون افزایش می‌یابد. همچنین، با بزرگ‌تر شدن قطرات فاز پراکنده داخلی، سرعت رهایش ترکیبات انکپسوله‌شده در فاز داخلی نیز افزایش می‌یابد که متعاقب آن، راندمان انکپسولاسیون کاهش خواهد یافت. در پژوهش حاضر، فاز داخلی بکار رفته خود یک نانوامولسیون آب در روغن متشکل از سورفکتانت (اسپن یا PGPR)، فاز روغنی و فاز آبی حاوی اسید فولیک بود. بنابراین می توان نتیجه‌گیری کرد که با افزایش درصد حجمی فاز پراکنده در امولسیون‌های دوگانه، حجم و تعداد قطرات فاز پراکنده افزایش یافته و به نوبه خود منجر به بزرگ‌تر شدن این قطرات و ناپایداری بیشتر امولسیون‌های دوگانه تولیدی خواهد شد [۵ و ۲۱]. به عبارت دیگر، مولکول‌های اسید فولیک موجود در فاز داخلی (قطرات پراکنده نانوامولسیون) می‌توانند به راحتی از آنها خارج شده و وارد فاز آبی بیرونی امولسیون‌های دوگانه نهایی شوند جایی که هیچ محافظتی از آنها توسط لایه کمپلکس بیوپلیمری پکتین-پروتئین آب پنیر صورت نمی‌گیرد و بدین‌ترتیب، راندمان انکپسولاسیون کاهش می‌یابد.

نکته جالب توجه این بود که با افزایش pH از ٦ به ٩، راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در امولسیون‌های دوگانه تولیدی به‌طور مداوم کاهش یافت. فاکتور pH تاثیر قابل توجهی هم بر تعادل بار الکتریکی سطحی بیوپلیمرها و هم بر اثر متقابل بین آنها دارد. علاوه براین، بار الکتریکی سطح قطرات امولسیون (پتانسیل زتا) می تواند پایداری امولسیون را تحت تاثیر قرار دهد [۱۲ و ۱۹]. در مرحله انجام پیش آزمون-ها، نتایج نشان داد که در pH برابر ٤ یعنی نقطه ایزوالکتریک محلول ترکیبی پکتین-پروتئین آب پنیر، این دو بیوپلیمر تقریبا خنثی بوده و کواسرواسیون کمپلکسی رخ می‌دهد که منجر به تشکیل توده های رسوبی نسبتا بزرگی می‌شود. به‌دلیل اینکه جذب این توده‌های بیوپلیمری بزرگ در سطح تماس روغن/آب ضعیف و ناقص می‌باشد، نیروی دافعه بین قطرات نیز ناکافی بوده و در نهایت، منجر به تشکیل قطرات نسبتا بزرگی از فاز پراکنده می شود که مناسب نیستند [۱۵ و ١٦]. از طرف دیگر، در نقاط پایین‌تر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های آب پنیر یعنی در pH برابر ۲، پروتئین های غالبا دارای بار مثبت بوده و بار تعادلی سطح پکتین، منفی می‌باشد که درمجموع باعث ایجاد پتانسیل زتای مثبت خواهد شد. توده-های کمپلکسی تشکیل شده در این pH کوچکتر از توده های به‌وجودآمده در pH برابر ٤ بودند اما اندازه آنها بزرگتر از توده‌هایی بود که در pH برابر ٦ به‌دست آمدند.

در pH برابر ٦، امکان تاثیر متقابل بین چندین گروه با بار مثبت بر روی شاخه پروتئینی آب پنیر و گروه های کربوکسیلی با بار منفی بر روی پکتینی که کاملا منفی است، وجود دارد. این اثرات متقابل نیروی محرکه لازم برای تشکیل کمپلکس-های قوی بیوپلیمری را فراهم می‌نماید. به‌عبارت دیگر، این پیوندهای جاذبه‌ای قوی اما محدود، قادر به جداسازی فازهای امولسیون نیستند اما می‌توانند توده‌های مولکولی کوچکی را تشکیل دهند که برای پایداری امولسیون کافی است. در طرف مقابل، توده‌های تشکیل شده در pH برابر ۲، خیلی بزرگ بوده و دارای قابلیت جذب مولکولی محدودی در سطح تماس قطرات فاز پراکنده هستند و لذا نمی‌توانند به‌عنوان یک امولسیفایر مناسب عمل نمایند. درنتیجه، تنها کمپلکس پکتین-پروتئین آب پنیر در pH برابر ٦ می تواند نقش یک امولسیفایر خوب را ایفا نموده و منجر به تشکیل امولسیون-هایی با کوچکترین اندازه قطرات شود. این نتایج کاملا با یافته های لوتز و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. علاوه براین، کمپلکس های تشکیل شده در pH برابر ٦ دارای بار منفی بوده و براساس نیروهای دافعه بین قطرات، پایداری امولسیون را بهبود می‌دهند. اما در pH برابر ۸، گروه های آمینی موجود بر روی پروتئین آب پنیر، پروتونه نبوده و گروه‌های کربوکسیلی کاملا یونیزه شده هستند. بنابراین، بار کلی سطحی در سیستم، منفی می‌باشد.

در بررسی تاثیر نوع و فرمولاسیون سورفکتانت بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در امولسیون‌های دوگانه پکتین-پروتئین آب پنیر، نتایج نشان داد که میکروامولسیون‌های هر دو نوع سورفکتانت اسپن و PGPR (با اندازه قطرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر) دارای راندمان انکپسولاسیون بالاتری بودند که می‌تواند ناشی از پایداری ترمودینامیکی این امولسیون‌ها باشد درحالیکه نمونه‌های مشابه نانوامولسیون آنها (با اندازه قطرات ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر) تنها دارای پایداری سینتیکی هستند. همچنین به‌طور کلی، سورفکتانت PGPR دارای عملکرد بهتری بود که احتمالا به خاطر شاخه‌های منشعب شده آن و درنتیجه، محافظت بهتر و بیشتر سطح تماس بین آب/روغن و

www.SID.ir

Archive of SID

جلوگیری از پدیده به هم پیوستن و بزرگ شدن قطرات می-باشد [٢٢].

٣-٤- تعیین مهمترین فاکتورها و اثر متقابل آنها

به ترتیب در جدول های ٣ و ٤، ضرایب برآوردشده مدل مربوط به میانگین راندمان انکپسولاسیون و آنالیز واریانس متغیرهای مستقل آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ٣ دیده می شود، با توجه به عدد ثابت بدست آمده، میانگین کلی راندمان انکپسولاسیون برای تمام تیمارها معادل ٨٨/٢٩ درصد می‌باشد. زمانی که تاثیر متغیرهای مستقل بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک مثبت است، یک علامت مثبت قبل از ضریب مربوطه در مدل قرار می‌گیرد و علامت منفی، نشان‌دهنده منفی بودن تاثیر متغیر مربوطه است. این تغییرات کاملا با نتایج شکل ٢ هماهنگ است. با بررسی نتایج جدول ٤ و شکل ٣، می توان نتیجه‌گیری کرد که ترتیب اهمیت تاثیر فاکتورهای مستقل بر راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک در داخل امولسیون‌های دوگانه تولیدی به‌صورت زیر است (درصد حجمی فاز پراکنده دارای بیشترین تاثیر معادل ٣٦٪ است):

سورفکتانت < pH < پروتئین آب پنیر < پکتین < درصد حجمی فاز پراکنده

Table 3- Linear model analysis: Estimated model coefficients for means of encapsulation efficiency.

Coef	Level Description	Term/Factor
88.2887	---	Constant
-0.5812	0.5	Pectin
2.7138	1.0	Pectin
-2.8738	1.5	Pectin
2.8788	4	WPC
-0.4888	6	WPC
-2.3638	8	WPC
1.0813	10	DPVF
2.7487	15	DPVF
-3.8187	20	DPVF
1.2938	6	pH
1.1537	7	pH
-0.1737	8	pH
0.2188	1	Surfactant
0.0988	2	Surfactant
1.1387	3	Surfactant

Table 4 Analysis Of Variance (ANOVA)

Percent	Pure Sum	F-Ratio	Variance	Sum of Squares	DOF	Factor
25.163	66.041	0	22.014	66.041	3	Pectin
21.511	56.456	0	18.819	56.456	3	WPC
35.524	93.231	0	31.077	93.231	3	DPVF
12.505	32.820	0	10.940	32.820	3	pH
5.296	13.900	0	4.633	13.900	3	Surfactant
100%				**262.448**	**15**	**Total**

همچنین، براساس نتایج شکل ٤، بیشترین اثر متقابل در بین متغیرهای مستقل مربوط به پروتئین آب پنیر-سورفکتانت با شدت تاثیر متقابل حدود ٦٧ درصد و کمترین آن مربوط به پکتین-pH با شدت کمتر از ٥ درصد است.

٣-٥- نتایج بهینه سازی با تاگوچی

ازطریق تحلیل نتایج به‌دست آمده با روش تاگوچی، نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای داشتن فرمولاسیونی به حداکثر

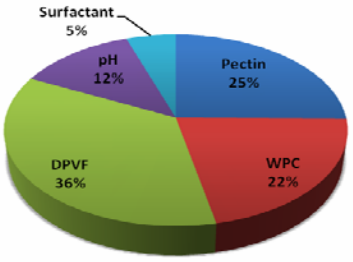


Fig 3 Ranking of independent factors and their individual share on encapsulation efficiency of folic acid.

www.SID.ir

Archive of SID

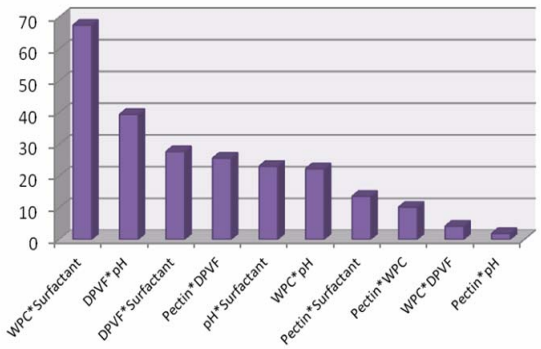


Fig 4 Interaction Severity Index showing the order of interactions between two independent factors affecting encapsulation efficiency of folic acid**.**

راندمان انکپسولاسیون عبارت است از پکتین با غلظت ۱ درصد وزنی، کنسانتره پروتئین آب پنیر با غلظت ٤ درصد وزنی درصد حجمی فاز پراکنده معادل ۱۵٪، pH برابر ٦ و به-کارگیری سورفکتانت PGPR با تهیه میکروامولسیون اسید فولیک به‌عنوان فاز داخلی امولسیون‌های دوگانه نهایی (جدول ۵).

از نظر تئوری، این شرایط منجر به راندمان انکپسولاسیون حدود ۹۹ درصد می‌شود که تقریبا با نتایج آزمایشگاهی ما (۹۸/۳ درصد) مطابقت دارد.

Table 5 Optimum conditions and performance

Contribution	Level No.	Level Description	Factor
2.714	2	1.0	Pectin
2.879	1	4	WPC
2.749	2	15	DPVF
1.294	1	6	pH
1.139	3	3	Surfactant

Sum of contribution from all factors: 10.775
Current total mean of efficiency: 88.289
Predicted result in optimum conditions: 99.064

٤- نتیجه گیری کلی

از آنجایی که اسید فولیک یک ترکیب زیست‌فعال و حیاتی برای بدن انسان می‌باشد، در این پژوهش، روش تاگوچی برای بهینه‌سازی انکپسولاسیون اسید فولیک ازطریق امولسیون‌های دوگانه آب در روغن در آب به‌کارگرفته شد. متغیرهای مستقل عبارت بودند از غلظت پکتین و غلظت پروتئین آب پنیر (کاربرد همزمان هر دو به صورت یک کمپلکس بیوپلیمری دولایه)، درصد حجمی فاز پراکنده، pH و نوع سامانه سورفکتانت. داده‌های به‌دست آمده نشان داد که مهمترین پارامتر تاثیرگذار بر راندمان انکپسولاسیون اسیدفولیک، میزان فاز پراکنده (۳٦ درصد) بوده و نوع سامانه سورفکتانت با ۵ درصد دارای کمترین تاثیر بود. همچنین، آنالیز نتایج نشان داد که بین کنسانتره پروتئین آب پنیر و سورفکتانت و به دنبال آن بین میزان فاز پراکنده و pH یک اثر متقابل قوی وجود داشت. موضوع مهم دیگر این بود که در pH برابر ٦، بیشترین راندمان انکپسولاسیون به‌دست آمد زیرا در این شرایط، کمپلکسی قوی بین پکتین و پروتئین آب پنیر تشکیل می‌گردد که منجر به تولید امولسیون‌های دوگانه قوی با پایداری مناسب و اندازه قطرات کوچک‌تر می‌شود. در نهایت اینکه شرایط بهینه برای دستیابی به بالاترین راندمان انکپسولاسیون اسید فولیک ازطریق امولسیون‌های دوگانه عبارت بود از غلظت پکتین ۱٪، غلظت پروتئین آب پنیر ٤٪، میزان فاز پراکنده ۱۵٪، pH برابر ٦ و سامانه سورفکتانت PGPR با میکروامولسیون بعنوان فاز داخلی.

۵- منابع

[1] Gujska, E., J. Michalak, et al. (2009). "Folates Stability in Two Types of Rye Breads During Processing and Frozen Storage." Plant Foods for Human Nutrition 64(2): 129-134.

[2] Pérez-Masiá, R., R. López-Nicolás, et al. (2015). "Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications." Food Chemistry 168: 124-133.

[3] McClements, D. J. (2012). "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." Soft Matter 8(6): 1719-1729.

[4] McClements, D. J. (2015). "Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active

www.SID.ir

Archive of SID

[14] Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Sadeghi, A.R., Rajabzadeh, G. (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 51, 327–337.

[15. Salminen, H. and J. Weiss (2014). "Effect of Pectin Type on Association and pH Stability of Whey Protein—Pectin Complexes." Food Biophysics 9(1): 29-38.

[16. Teng, Z., R. Xu, et al. (2015). "Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review." RSC Advances 5(44): 35138-35154

[17] Bouyer, E., G. Mekhloufi, et al. (2012). "Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?" International Journal of Pharmaceutics 436(1–2): 359-378.

[18] Hosseini, S. M. H., Z. Emam-Djomeh, et al. (2015). "Nanocomplexes arising from protein-polysaccharide electrostatic interaction as a promising carrier for nutraceutical compounds." Food Hydrocolloids 50: 16-26.

[19] Lutz, R., A. Aserin, et al. (2009). "Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 74(1): 178-185.

[20] Schuch, A., J. Wrenger, et al. (2013). "Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects(0).

[21] Hosseini, A., S. M. Jafari, et al. (2015). "Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum." Carbohydrate Polymers 126: 1-8.

[22] Sapei, L., M. A. Naqvi, et al. (2012). "Stability and release properties of double emulsions for food applications." Food Hydrocolloids 27(2): 316-323.

components: Potential and limitations of colloidal delivery systems." Advances in Colloid and Interface Science 219(0): 27-53.

[5] Jafari, S. M., E. Assadpoor, et al. (2008). "Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification." Food Hydrocolloids 22(7): 1191-1202.

[6] Garti, N. and A. Aserin (2013). Double Emulsions. Encyclopedia of Colloid and Interface Science. T. Tadros, Springer Berlin Heidelberg: 303-337.

[7] Hemar, Y., L. Cheng, et al. (2010). "Encapsulation of Resveratrol Using Water-in-Oil-in-Water Double Emulsions." Food Biophysics 5(2): 120-127.

[8] Sonam, H. Chaudhary, et al. (2014). "Taguchi design for optimization and development of antibacterial drug-loaded PLGA nanoparticles." International Journal of Biological Macromolecules 64: 99-105.

[9] Esfanjani, A. F., S. M. Jafari, et al. (2015). "Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate." Journal of Food Engineering 165: 149-155.

[10] Mohammadi, A., S. M. Jafari, et al. (2016). "Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil." Food Chemistry 190: 513-519.

[11] Mahdavee Khazaei, K., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Kakhki, A.H., (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. Carbohydrate Polymers, 105, 57–62.

[12] Lutz, R., A. Aserin, et al. (2009). "Double emulsions stabilized by a charged complex of modified pectin and whey protein isolate." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 72(1): 121-127.

[13] Matias, R., P. R. S. Ribeiro, et al. (2014). "A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests." Analytical Methods 6(9): 3065-3071.

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of Folic Acid Nano-encapsulation by A Taguchi Approach

Assadpour, E. [1], Maghsoudlou, Y. [2], Jafari, S. M. [3*], Ghorbani, M. [4], Aalami, M. [5]

1. Assistant Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering,University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Prof.Department of Food Materials and Process Design Engineering,University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering,University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering,University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
5. Associate Prof Department of Food Materials and Process Design Engineering,University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

(Received: 2016/05/15 Accepted: 2016/08/16)

Due to susceptibility of folic acid[1] like many other vitamins to environmental and processing conditions, it is necessary to protect it by highly efficient methods such as micro/nano-encapsulation. Our main goal was to find the optimum conditions in pectin-WPC[2] double emulsion preparations for nano-encapsulation of FA by spray drying. Five independent variables and their practical range including pectin and WPC content, dispersed phase content, pH, and surfactant type of Span and PGPR[3] were considered along with encapsulation efficiency[4] as the main response. The experiment design was performed by Taguchi approach and 16 treatments were determined. Final double emulsions were formulations containing an internal nano/micro-emulsion composed of a W/O system with FA present in the water phase, the whole dispersed within an aqueous phase of pectin-WPC complexes. The grand average of folic acid EE was approximately 88.3% in a range of 82.3 to 95.0%. The main effect analysis with Taguchi technique revealed that dispersed phase content of double emulsions was the most important factor affecting EE (36%) and surfactant had the minimum influence (5%). Also, it was revealed that the most important interaction between independent variables in terms of EE was between WPC and dispersed phase content while pectin-pH had the lowest interaction. Finally, optimum conditions were determined as 1.0% pectin, 4.0% WPC, 15% dispersed phase, pH=6, with a PGPR nano-emulsion which resulted in 99.0% EE of folic acid.

Keywords: Folic acid, Nano-encapsulation, Optimization, Spray drying, Double emulsions.

* Corresponding Author E-Mail Address: smjafari@gau.ac.ir

1. FA
2. Whey Protein Concentrate
3. Poly Glycerol Poly Ricinoleate
4. EE

www.SID.ir