



ریزپوشانی اسانس لیمو ترش (*Citrus Limon L.*) در کمپلکس کیتوزان-نشاسته اصلاح شده با استفاده از امواج فراصوت

شیرین حسنی^۱، سید مهدی اجاق^{۲*}، محمد قربانی^۳

۱. دانشجوی دکتری، فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. دانشیار، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

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

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۶، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۶/۱۲/۲۰، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۶)

چکیده

در سال‌های اخیر با افزایش گرایش مصرف کنندگان به استفاده از محصولات غذایی فاقد نگه‌دارنده‌های شیمیایی، کاربرد انواع اسانس‌ها و گیاهان معطر با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در صنایع غذایی و دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود اسانس‌ها ترکیباتی فرار، حساس به حرارت و غیرقابل حل در آب بوده که سبب محدودیت استفاده از آن‌ها می‌گردد. لذا این پژوهش با هدف بررسی قابلیت تکنیک ریزپوشانی به‌عنوان روشی مناسب برای حفاظت اسانس در مقابل شرایط محیطی و ارزیابی ویژگی‌های کلوئیدی نانوکپسول‌های تولید شده می‌باشد. بدین منظور شناسایی ترکیبات فعال اسانس لیمو ترش (*Citrus Limon L.*) با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) انجام شد. امولسیون روغن در آب با نسبت ۱:۴ اسانس: پوشش با پوشش‌هایی از کیتوزان و نشاسته اصلاح شده با نسبت‌های متفاوت (۰/۵: ۹/۵، ۱: ۹ و ۱/۵: ۸/۵) با کمک امواج فراصوت تهیه و توسط خشک‌کن انجمادی، خشک گردید. در مطالعه حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت دیواره بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی امولسیون و نانوکپسول مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد افزایش غلظت کیتوزان سبب پایداری بیشتر و افزایش ویسکوزیته نانوامولسیون تهیه شده با پوشش ۱/۵: ۸/۵ کیتوزان: نشاسته اصلاح شده گردید. نانوامولسیون‌های حاوی مقادیر بالاتر کیتوزان از قطراتی کوچک‌تر با توزیع اندازه یکنواخت-تری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند. بررسی خصوصیات نانوکپسول‌ها نشان از تأثیر معنی‌دار ($p \leq 0/05$) نسبت‌های متفاوت ترکیبات دیواره بر مقادیر رطوبت، راندمان ریزپوشانی و اندازه ذرات داشت. مورفولوژی نانوکپسول‌ها نشان داد کپسول‌های با راندمان ریزپوشانی بالاتر دارای سطوحی صاف، بدون شکاف با کم‌ترین خلل و فرج بودند.

واژه‌های کلیدی: خشک‌کن انجمادی، راندمان ریزپوشانی، کیتوزان، مورفولوژی، نانوامولسیون.

۱. مقدمه

ماده دیواره مناسب با حداکثر پایداری و توانایی محافظت از ماده دیواره در مقابل عوامل خارجی و با گذشت زمان می‌باشد. از نشاسته طبیعی و مشتقات آن (نشاسته‌های اصلاح شده، مالتودکسترین‌ها و بتاسیکلودکسترین‌ها) به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی به‌عنوان جایگزین چربی، پایدارکننده امولسیون‌های غذایی و محافظت از ترکیبات مولد طعم و بو استفاده می‌شود [۵]. نشاسته اصلاح شده در فرایند ریزپوشانی می‌تواند در ترکیب با سایر پلی‌ساکاریدها مانند کیتوزان نیز استفاده شود. پلی‌ساکارید کاتیونی کیتوزان با نشاسته اصلاح شده آنیونی تشکیل پیوندهای الکترواستاتیکی می‌دهد که در نتیجه کپسول‌هایی پایدار را به‌وجود می‌آورند [۶].

قاسمی و همکاران [۷] گزارش نمودند که استفاده از کنستانتره آب پنیر و پکتین با نسبت ۱:۴ به‌عنوان ترکیبات دیواره‌ای در ریزپوشانی مقادیر بالای د-لیمون موفقیت آمیز بوده است. در مطالعه دیگری که توسط حسینی و همکاران [۸] انجام گرفت میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حامل پپتید در محدوده ۱۳۴-۶۲۱ نانومتر با شاخص پراکندگی ۰/۲۷-۰/۴۹ و پتانسیل زتای ۰/۰۶-۸/۶۵ تعیین گردید. هم‌چنین مطالعه ژان ژیا و همکاران [۹] نشان دادند کپسول‌های اسانس پرتقال با دیواره‌ای از صمغ عربی و ایزوله پروتئین سویا تولید شده به روش خشک‌کن پاششی، دارای اشکالی کروی فاقد هرگونه تورفتگی و شکاف در سطح بوده و آن را با بالا بودن راندمان ریزپوشانی مرتبط دانستند.

خشک کردن انجمادی یکی از سودمندترین و مناسب‌ترین روش‌ها برای خشک کردن و ریزپوشانی ترکیبات حساس به حرارت محسوب می‌شود. با توجه به این‌که تاکنون تحقیقی مبنی بر تولید نانوکپسول‌های حاوی اسانس لیموترش در کمپلکس کیتوزان و نشاسته اصلاح شده به‌عنوان ترکیبات دیواره توسط خشک‌کن انجمادی صورت نپذیرفته است. این تحقیق با هدف مقایسه نسبت‌های متفاوت ترکیبات دیواره جهت ریزپوشانی نانوامولسیون اسانس لیمو ترش و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

اسانس لیمو ترش از شرکت باریج اسانس ساخت کشور ایران (بر اساس ۱۹-۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لیمونن استاندارد شده

لیموترش یکی از گونه‌های بسیار مهم از جنس *Citrus* است که در نقاط مختلف دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. بخش‌های مختلف این گیاه جهت مصارف گوناگون درمانی به‌کار گرفته شده‌است. از جمله برگ‌ها و پوست آن برای درمان چاقی، دیابت، کاهش چربی خون، بیماری‌های قلبی و عروقی، اختلالات مغزی، انواع درد، و انواعی از سرطان‌ها استفاده گردیده است. اسانس لیموترش از برگ‌ها و پوسته آن به‌روش تقطیر با بخار به‌دست می‌آید [۱]. اندازه کوچک ملکول‌های روغن اسانس، به آن‌ها اجازه می‌دهد تا از بین دیواره سلولی نفوذ کرده و فرایندهای بیوشیمیایی مختلف را تحت تأثیر قرار دهند. فعالیت بیولوژیکی روغن اسانس وابسته به ترکیبات فنولی نظیر تیمول و کارواکرول می‌باشد که دارای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی قوی هستند [۲]. مشتقات ترپنی لیمو از جمله لیمونن (۴-یزوپروپنیل-متیل سیکلوهگزان) یکی از مهم‌ترین اجزاء طعم‌دهنده موجود در لیمو هستند که بیش از ۳۵٪ روغن پوسته آن را تشکیل می‌دهد. از این ترکیب به‌عنوان ماده خوشبوکننده و طعم‌دهنده در مواد غذایی، مواد معطره و شوینده استفاده می‌شود. این ترکیب نسبت به شرایط محیطی حساس بوده و در مجاورت اکسیژن به سرعت به محصولات مختلفی نظیر اکسید لیمونن و کاروون تبدیل می‌شود [۳]. بوی مطبوع اسانس لیمو مربوط به وجود سیترال است که به مقدار ۷-۴٪ در آن یافت می‌شود. به‌علاوه دارای ژرانیول آزاد، لینالول، سیترونلول و به مقدار کم از آلدئید نونیلیک و اسید آنترانیلیک است [۱].

بنابراین با توجه به حساسیت لیمونن یافتن روشی که این ترکیب را در مقابل اکسیداسیون محافظت کند و آزاد شدن آن را در زمان مورد نیاز و به‌صورت کنترل شده محقق نماید، اهمیت به‌سزایی دارد و نقطه عطفی در تولید، تجارت و نیز کاربرد ترکیبات مولد عطر و طعم در صنعت محسوب می‌شود. ریزپوشانی فرایندی است که در آن یک ماده و یا مخلوطی از مواد توسط مواد دیگری پوشانیده و یا به دام انداخته می‌شوند که به ماده حبس شده، مواد هسته‌ای یا فعال و به ماده پوشش دهنده، مواد دیواره‌ای می‌گویند. بیش‌ترین کاربری فن کپسوله کردن در صنایع غذایی به منظور حفظ بو و طعم می‌باشد [۴]. یکی از مهم‌ترین چالش‌های پیش‌رو در زمینه ریزپوشانی، انتخاب

حداکثر شدت امواج فراصوت انجام شده و دمای محلول در طول مدت صوت‌دهی از طریق سیرکولاسیون آب در جداره مخزن در 20°C حفظ شد [۱۱]. سپس آزمایشات مربوط به امولسیون‌ها انجام شده و پس از آن امولسیون‌ها جهت خشک شدن به روش انجمادی آماده گردیدند.

۴.۲. خشک کردن انجمادی امولسیون‌ها

امولسیون تهیه شده به مدت ۲۴ h ساعت در دمای 80°C - منجمد و پس از آن در خشک کن انجمادی مدل FDB-5503، شرکت Operon، ساخت کشور کره، در دمای 40°C - و فشار ۰/۷ mbar به مدت ۷۲ h خشک گردیدند. این پودرها در کیسه‌های پلاستیکی کاملاً درب بسته در فریزر 70°C - نگهداری شدند تا آزمایشات فیزیکی شیمیایی لازم بر روی آن‌ها به عمل آید.

۵.۲. آزمایشات انجام گرفته بر روی امولسیون‌ها

۱.۵.۲. اندازه گیری شاخص خامه‌ای شدن

۲۵ mL از هر امولسیون به درون یک استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتری منتقل و سپس به مدت ۲۴ h در دمای اتاق نگهداری شد. پس از ۲۴ h ارتفاع فاز پایینی (سرم) در نمونه‌ها اندازه‌گیری و نتایج به صورت شاخص خامه‌ای شدن با استفاده از رابطه (۱) تعیین گردید [۱۲].

$$(1) \quad 100 \times \frac{\text{ارتفاع لایه سرم تشکیل شده}}{\text{ارتفاع کل امولسیون}} = \text{شاخص خامه‌ای شدن}$$

۲.۵.۲. تعیین ویسکوزیته ظاهری

ویسکوزیته ظاهری نمونه‌های امولسیون بلافاصله پس از تهیه آن‌ها با استفاده از ویسکومتر چرخشی بروکفیلد مدل RVDV-II⁺، ساخت کشور آمریکا، بر حسب mPa.s اندازه‌گیری شد. ویسکوزیته در دمای 25°C ، در سرعت برشی 40 s^{-1} تعیین شد. در انجام آزمون از دوک SC4-31 به عنوان پروب سنجش ویسکوزیته استفاده گردید [۱۳].

۳.۵.۲. اندازه قطرات امولسیون و شاخص بس پاشیدگی (PDI)

برای اندازه‌گیری متوسط قطر و توزیع اندازه قطرات از دستگاه انکسار نور لیزر مدل Malvern, Zetasizer nano، ساخت

(است)، نشاسته اصلاح شده با نام تجاری Hi-Cap 100TM از شرکت National Starch کشور آلمان، کیتوزان با وزن مولکولی پائین از شرکت سیگما آلدریج و امولسیفایر توئین ۸۰ (سوربیتان منو-۹-اکتادکنوات) از شرکت سیگما آلدریج تهیه گردیدند. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بالا از شرکت مرک خریداری شدند. برای تهیه و آماده‌سازی کلیه محلول‌ها از آب دیونیزه استفاده گردید.

۲.۲. شناسایی ترکیبات اسانس لیمو ترش

جهت آنالیز کمی اسانس، از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent ساخت آمریکا، ستون DB-5 به طول ۳۰ m، قطر داخلی ۰/۳۲ mm و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ μm ، دتکتور FID، درجه حرارت تزریق کننده: 250°C ، درجه حرارت دتکتور: 280°C ، برنامه‌ریزی حرارتی به ازای افزایش ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، میزان تزریق ۱ میکرولیتر، جریان گاز ازت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به کار برده شد.

۳.۲. تهیه امولسیون

کیتوزان و نشاسته اصلاح شده با نسبت‌های مشخص ۵/۰:۹/۵، ۱:۹ و ۵/۱:۸/۵ درصد وزنی/حجمی در اسید استیک ۱٪ حجمی/حجمی به مدت یک شبانه روز بر روی همزن مغناطیسی در دمای محیط حل گردید. بعد از انحلال کامل، توئین ۸۰ در غلظت ۰/۱٪ به عنوان عامل فعال سطحی به محلول اضافه و به مدت ۲ h تا رسیدن به محلولی به طور کامل یکنواخت هم زده شد. محلول تری سدیم پلی فسفات (عامل ژل کننده) به میزان ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به صورت قطره قطره افزوده شد. در ادامه اسانس لیمو ترش به نسبت ۲۵٪ ماده خشک کلیه محلول‌ها استفاده گردید. سپس محلول در دمای اتاق با همزن مغناطیسی همزده شده و به مدت ۳۰ min در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Hermle, Z323K، ساخت کشور آلمان) شدند. محلول حاصل در دمای 50°C حمام آب به مدت ۱۵ min حرارت دیده و با هموژنایزر با دور ۵۲۰۰ به مدت ۲/۵ min هموژن شد [۱۰]. در ادامه مخلوط داخل یک مخزن فلزی دو جداره منتقل و سپس سونوتروود دستگاه مولد امواج فراصوت مدل Vibracl, 750 VCX، ساخت کشور آمریکا، زیر سطح مخلوط غوطه‌ور گردید. سونیکاسیون در

جهت استخراج و تعیین میزان روغن کپسوله، نانوکپسول‌ها وزن شده و در آب مقطر حل گردید. روغن کپسوله به روش تقطیر با کلونجر استخراج گردید. مقادیر روغن غیر کپسوله از اختلاف بین روغن کل و روغن کپسوله به دست آمد. راندمان ریزپوشانی با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد [۱۵].

$$(3) \quad \text{راندمان ریزپوشانی} = \frac{\text{روغن کل} - \text{روغن غیر کپسوله (۱۰۰ گرم پودر / گرم)}}{\text{روغن کل (۱۰۰ گرم پودر / گرم)}} \times 100$$

۵.۶.۲. بررسی مورفولوژی نانوکپسول‌ها

بررسی سطوح خارجی و مورفولوژی سطحی نانوکپسول‌های تولید شده با تهیه تصویر توسط میکروسکوب الکترونی روبشی مدل KYKY, KYKY-EM3200، ساخت کشور چین، صورت گرفت. بدین منظور نمونه‌ها روی استاب‌های آلومینیومی دستگاه ثابت شده و با استفاده از طلا: پالادیوم (۴۰:۶۰) پوشانده شدند. جهت بررسی شکل و ویژگی‌های سطحی (شکستگی، فرورفتگی، چین‌خوردگی و غیره) از سطح نانوکپسول‌ها تصویر تهیه گردید [۱۷].

۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی حاضر برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف و لون به ترتیب نرمال بودن و همگنی داده‌ها ارزیابی گردید. با اطمینان از نرمال و همگن بودن داده‌ها جهت تجزیه و تحلیل، از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و هم‌چنین برای تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح $p < 0.05$ استفاده شد. کلیه تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS15 و رسم نمودارهای موجود با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 انجام پذیرفت.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. ترکیبات شیمیایی اسانس

درصد ترکیبات عمده اسانس لیمو (Citrus Limon L.) در جدول (۱) آورده شده است. در این بررسی ۲۲ ترکیب شناسایی شده، لیمونن با ۸۰/۲۵ درصد بیش‌ترین ترکیب موجود در اسانس و پس از آن β -پینن و γ -ترپینن با مقادیر ۵/۸۷ و ۴/۵۱٪ تعیین گردید.

انگلستان، استفاده شد. برای محاسبه قطر متوسط قطرات که با نماد d_{43} (قطر حجم - طول) نمایش داده می‌شود، از رابطه (۲) استفاده شد [۱۴].

$$(2) \quad D_{4,3} = \frac{\sum z_i d_i^4}{\sum z_i d_i^3}$$

در این معادله تعداد ذرات z_i با قطر d_i می‌باشد. هم‌چنین شاخص بس پاشیدگی با توجه به منحنی توزیع اندازه ذرات توسط نرم افزار دستگاه، در دمای محیط و با سه تکرار محاسبه گردید.

۶.۲. آزمایشات انجام شده بر روی نانوکپسول‌ها

۱.۶.۲. اندازه‌گیری رطوبت

مقدار رطوبت میکروکپسول‌ها به روش وزن سنجی محاسبه شد. نتایج به صورت میزان رطوبت در ۱۰۰ g پودر گزارش گردید [۱۵].

۲.۶.۲. اندازه ذرات پودر و شاخص بس پاشیدگی (PDI)

برای اندازه‌گیری متوسط قطر و توزیع اندازه ذرات از دستگاه انکسار نور لیزر مدل Malvern Zetasizer nano، ساخت انگلستان، استفاده شد. قطر متوسط ذرات که با نماد d_{43} (قطر حجم - طول) نمایش داده می‌شود، از رابطه (۱) محاسبه گردید.

۳.۶.۲. دانسیته حجمی

جهت تعیین دانسیته حجمی، ۲ g پودر به داخل یک استوانه مدرج ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید. دانسیته حجمی بر اساس ارتفاع پودر در استوانه، محاسبه گردید [۱۶].

۴.۶.۲. راندمان ریزپوشانی

اندازه‌گیری راندمان ریزپوشانی در نانوکپسول‌ها بر اساس روش برینگاس لانتیگا و همکاران [۱۵] با اندکی اصلاحات انجام شد. برای شست‌وشوی روغن سطحی، ۲۰ mL هگزان به ۲ g پودر در یک شیشه ۳۰ میلی لیتری درب‌دار افزوده و به مدت ۲۰ min در دمای محیط هم زده شد. محلول از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد و پودر باقی‌مانده روی کاغذ صافی سه مرتبه توسط هگزان شست‌وشو گردید. سپس نانوکپسول‌ها، خشک‌شده و حلال نیز در دمای محیط تا رسیدن به وزن ثابت تبخیر شد.

احتمالا به دلیل افزایش ویسکوزیته امولسیون و تغییر رفتار رئولوژیکی در نواحی بین قطرات روغن می باشد که سرعت جداسازی فاز را کنترل می کند [۲۰]. با توجه به نتایج به دست آمده از اندازه گیری ویسکوزیته ظاهری، می توان دریافت علت اصلی افزایش پایداری امولسیون های تهیه شده، افزایش ویسکوزیته ظاهری ناشی از غلظت های بالاتر کیتوزان است. کلایپرادیته و هانگ [۲۱] دریافتند ظرفیت امولسیون کنندگی کیتوزان ناشی از مکانیسم های پایداری الکترواستاتیک و ویسکوزیته است. به علاوه کیتوزان یک پلی ساکراید منحصر به فرد با طبیعت کاتیونی دارای بخش های آبدوست و آبگریز بوده که آن را قادر می سازد تا در سطوح حد فاصل آب/روغن جذب گردد. تعامل بین کیتوزان و نشاسته اصلاح شده و هم چنین جذب آن ها در سطح بین آب و روغن سبب پایداری بیش تر امولسیون ناشی از افزایش پایداری الکترواستاتیک می شود.

۳.۳. ویسکوزیته ظاهری

مقایسه میانگین ویسکوزیته امولسیون های تهیه شده با نسبت های متفاوت ترکیبات دیواره در جدول (۲) آورده شده است. ویسکوزیته امولسیون تهیه شده با نسبت ۱/۵: ۸/۵ کیتوزان: نشاسته اصلاح شده به علت بالاتر بودن میزان کیتوزان نسبت به سایر فرمولاسیون ها دارای بیش ترین مقدار یعنی به میزان ۱۹۲۹/۴۹ mPa.s بود و اختلاف معنی داری ($p \leq 0.05$) با سایر نمونه ها داشت. افزایش ویسکوزیته را می توان به دلیل تشکیل شبکه و ساختار قوی تر در حضور مقادیر بالاتر کیتوزان موجود در ترکیب دیواره دانست. در سیستم های امولسیونی، ویسکوزیته ظاهری با غلظت و نوع ترکیبات مورد استفاده در دیواره و اندازه قطرات تغییر می یابد و متأثر از طبیعت کلوییدی

اسانس لیمو مخلوطی از ترکیبات فرار، مونوترپن ها، هیدروکربن های سس کوئی ترپن و مشتقات اکسیژن دار شده آن ها هستند [۱۸]. بورگو و همکاران [۱۹] ترکیبات مهم و عمده اسانس به دست آمده از دانه لیموترش را به ترتیب لیمون، C- پینن، J- ترپینن و P- کیمین گزارش کردند. یافته ها همسو با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر بود. فاکتورهای بسیاری از جمله شرایط متفاوت کاشت و برداشت، شرایط آب و هوایی، درجه رسیدگی میوه می توانند ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس را تحت تأثیر قرار دهند. نتایج مشابهی در ترکیبات شیمیایی اسانس لیمو توسط بوقنجیو و جد [۱۸] ارائه گردید. آن ها ترکیبات عمده اسانس را به ترتیب لیمونن (۶۱/۶۴٪)، β - پینن (۱۳/۸۵٪) و γ - ترپینن گزارش نمودند.

۲.۳. شاخص خامه ای شدن

بررسی پایداری امولسیون از طریق مشاهده ظاهری امولسیون و اندازه گیری شاخص خامه ای شدن مشخص می گردد. خامه ای شدن نشانه اولیه عدم پایداری امولسیون های روغن در آب می باشد و منجر به دو فاز شدن امولسیون می شود [۶]. نتایج شاخص خامه ای شدن در امولسیون های تهیه شده در جدول (۲) آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، مقادیر شاخص خامه ای شدن در تیمارهای مورد بررسی از صفر تا ۱۸٪، متغیر بود (جدول ۲). علت ناپایداری بیش تر در امولسیون با غلظت های کم تر کیتوزان را می توان به حرکت آزادانه قطرات روغن در سیستم نسبت داد. به طوری که در این غلظت از کیتوزان، نیروهای ضعیف ویسکوز در فاز آبی برای جلوگیری از برخورد قطرات روغن کافی نبوده و در اثر برخورد قطرات با یکدیگر تجمع قطرات را در بر دارد. افزایش پایداری امولسیون با افزایش در غلظت کیتوزان

جدول (۱) ترکیبات شیمیایی اسانس لیمو ترش (*Citrus limon L.*)

Table 1 Chemical composition of the essential oil of lemon (*Citrus limon L.*)

اجزاء	غلظت (%)	اجزاء	غلظت (%)
Components	Concentration (%)	Components	Concentration (%)
Limonen	80.25	β Bisabolene	0.49
4-Terpineol	0.2	α Thujene	0.27
α Terpineol	0.23	α Pinene	1.34
Nerol	0.12	Sabinene	0.98
β Citral	0.61	β Pinenene	5.87
α Citral	0.98	β myrcene	2.29
Neryl Acetate	0.43	P-Cymol	0.25
Geranyl Acetate	0.11	γ Cerpine	4.51
β Caryophyllene	0.21	Terpinolene	0.16
Trans α Bergamotene	0.28	Linalool	0.18
α Farnesene	0.14	Benzyl Acetate	0.1

ویسکوزیته و میانگین قطر قطرات امولسیون مشخص شد که با افزایش ویسکوزیته امولسیون، اندازه قطرات امولسیون کاهش می‌یابد.

پتروویچ و همکاران [۲۲] نیز رفتار مشابهی را در برهم کنش هیدروکسی متیل سلولز و سدیم دودسیل سولفات مشاهده نمودند. با این وجود، اندازه قطرات فقط تحت تاثیر ویسکوزیته امولسیون نمی‌باشد و خصوصیات امولسیون کنندگی طبیعی هر نوع ماده نیز عاملی موثر خواهد بود [۱۷]. آغباشلو و همکاران [۲۳] و تونن و همکاران [۲۴] نیز گزارش کردند که ارتباط معکوسی بین اندازه ذرات و ویسکوزیته امولسیون وجود دارد که همسو با نتایج تحقیق حاضر بود. توزیع اندازه قطرات امولسیون سهم مهمی در تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری آن دارد، به طوری که سرعت و روند کلیه مکانیسم‌های ناپایداری به خصوص به هم پیوستن، درهم آمیختن، خامه‌ای شدن و شکست امولسیون و نیز صفات ظاهری، ارگانولپتیک و رئولوژیک را مستقیماً تحت الشعاع قرار می‌دهد. شاخص بس پاشیدگی کم‌تر نشان دهنده توزیع محدودتر اندازه ذرات است [۲۵]. شاخص بس پاشیدگی بیش‌تر، توزیع وسیع‌تری را نشان می‌دهد که بدان معنی است که ذرات، کم‌تر هموژن شدند و هم‌چنین می‌تواند به ثبات کم‌تر امولسیون‌های تولید شده نیز مربوط باشد.

۵.۳. رطوبت

مقادیر رطوبت نانوکپسول‌های تولید شده در جدول (۳) آورده شده است. نتایج نشان داد نانوکپسول‌های تهیه شده با پوشش ۱:۹ کیتوزان: نشاسته اصلاح شده بیش‌ترین میزان رطوبت با

ویسکوزیته ظاهری با غلظت و نوع ترکیبات مورد استفاده در دیواره و اندازه قطرات تغییر می‌یابد و متأثر از طبیعت کلونیدی فاز پیوسته، میانگین اندازه قطرات و میزان پراکندگی آن‌ها است [۴]. بنابر این هر گونه تغییر در غلظت ترکیبات پلی مری منجر به تغییرات در ویژگی‌های رئولوژیکی سیستم خواهد شد.

۴.۳. اندازه قطرات امولسیون و شاخص بس پاشیدگی (PDI)

جدول (۲) نتایج مربوط به اندازه قطرات امولسیون‌ها را نشان می‌دهد. امولسیون‌های تهیه شده با فرمولاسیون‌های (۹/۵:۰/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده با میانگین ۸۶۱/۴۷ nm و (۱/۵:۰/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده با میانگین ۵۸۳/۵۷ nm به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر اندازه قطرات را دارا بودند. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، با افزایش ویسکوزیته امولسیون، اندازه قطرات امولسیون کاهش می‌یابد و علت آن افزایش تراکم ذرات در واحد حجم نمونه می‌باشد. به طوری که نمونه با کم‌ترین ویسکوزیته به میزان ۳۴۴/۸۵ mPa.s، دارای بیش‌ترین قطر ذرات امولسیون بود. طبق جدول فوق بیش‌ترین شاخص بس پاشیدگی مربوط به تیمار تهیه شده با فرمولاسیون (۹/۵:۰/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده با مقدار ۰/۳۴ می‌باشد که دارای بالاترین شاخص خامه‌ای شدن است.

نتایج اندازه قطرات امولسیون‌ها نشان داد امولسیون‌های تهیه شده با فرمولاسیون‌های (۹/۵:۰/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده و (۱/۵:۰/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میانگین اندازه قطرات را دارا بودند. با بررسی نتایج

جدول (۲) خصوصیات امولسیون‌های تهیه شده با نسبت‌های متفاوت ترکیبات دیواره ای.

Table 2 characterization of emulsions prepared with different ratios of wall materials.

۸/۵:۰/۵ (1.5%: 8.5%)	۹:۱ (1%: 9%)	۹/۵:۰/۵ (0.5%: 9.5%)	کیتوزان: نشاسته اصلاح شده (وزنی/حجمی) CS: Hicap (w/v)
0 ^b ± 0	0 ^b ± 0	1 ^a ± 18	شاخص خامه‌ای شدن (%) Creaming Index (%)
16.77 ^c ± 583.57	4.56 ^b ± 667.73	11.07 ^a ± 861.47	اندازه قطرات (nm) Droplet size (nm)
0.01 ^b ± 0.28	0.01 ^a ± 0.32	0.02 ^a ± 0.34	شاخص بس پاشیدگی Poly dispersity index
72.63 ^a ± 1929.49	69.92 ^b ± 1042.23	13.52 ^c ± 344.85	ویسکوزیته (mPa.s) Viscosity (mPa.s)

مقادیر در جدول نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. حروف لاتین غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده معنی‌داری (p ≤ ۰/۰۵) بین تیمارها می‌باشد. Reported means (± standard deviations) derived from 3 replications with 3 samples per replication. Means with in row followed by different superscripts are significantly different at p ≤ 0.05

جمله عوامل تاثیر گذار بر میزان راندمان ریزپوشانی می‌باشند [۲۹]. کاهش در راندمان ریزپوشانی می‌تواند به علت مواد دیواره-ای ناکافی در تولید ماتریکسی قوی، ایجاد لایه‌های نازک‌تر از مواد دیواره بین قطرات روغن کپسوله و یا بی‌ثباتی قطرات امولسیون طی فرایند خشک کردن باشد و افزایش راندمان ریزپوشانی احتمالاً به دلیل تشکیل سریع پوسته بر سطح ذرات می‌باشد. به‌طور معمول این دیدگاه وجود دارد که پایداری ترکیبات با افزایش راندمان ریزپوشانی، افزایش می‌یابد و برای دستیابی به شرایط بهینه باید تا حد امکان سعی در افزایش راندمان نمود [۵]. کارنیرو و همکاران [۱۷] گزارش کردند راندمان ریزپوشانی را نمی‌توان متأثر از اندازه قطرات امولسیون یا ویسکوزیته دانست و تفاوت در راندمان، احتمالاً به علت تفاوت موجود بین مواد پلی‌مری تشکیل دهنده دیواره و نسبت‌های مختلف مورد استفاده است که مطابق با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر بود.

۸.۳. اندازه ذرات نانوکپسول‌ها و شاخص بس پاشیدگی

اندازه ذرات در نانوکپسول‌ها با نسبت‌های متفاوت در ترکیبات دیواره، بین ۳۳۹/۳ تا ۵۵۳/۳ نانومتر متغیر بود. با توجه به منحنی توزیع اندازه ذرات نانوکپسول‌ها، کپسول‌های تهیه شده با هر سه فرمولاسیون، تک قله‌ای بوده که نشان‌دهنده یکنواخت بودن توزیع اندازه ذرات می‌باشد (شکل ۱). هم‌چنین شاخص بس پاشیدگی در نانوکپسول‌ها از ۰/۴۲۴ تا ۰/۴۴۴ متغیر بود که نشان‌دهنده پراکندگی کم‌تر و همگن بودن اندازه ذرات می‌باشد. لگاکو و همکاران [۳۰] عدم یکسانی شکل و اندازه پودرها را ناشی از تفاوت میزان رطوبت پودر حاصله دانستند. تحقیقات نشان داد ترکیبات مختلف دیواره و تکنیک ریزپوشانی، فاکتورهای مؤثر بر اندازه ذرات و مورفولوژی کپسول‌ها است [۱، ۳۱].

۹.۳. مورفولوژی نانوکپسول‌ها

مطالعات مورفولوژیکی بر روی ذرات خشک شده دیدگاه‌های با ارزشی را در رابطه با خشک کردن ذرات و فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی مؤثر بر ساختار ذرات را فراهم می‌نماید. بر اساس تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، نانوکپسول‌های حامل اسانس لیموترش با راندمان ریزپوشانی بالاتر، تصاویر ورقه-ای شکل با سطوحی صاف داشتند و خروج اسانس در آن‌ها کم‌تر

و نمونه‌های تهیه شده با ۱/۵: ۸/۵٪ کیتوزان: نشاسته اصلاح شده کم‌ترین میزان رطوبت با ۱/۱۳٪ را داشتند. نتایج تحقیق حاضر گزارش نمود که مقادیر متفاوت ترکیبات دیواره بر میزان رطوبت نانوکپسول‌ها علی‌رغم آن‌که این تأثیر در تیمارهای مورد بررسی معنی‌دار نبود ($p \leq 0.05$)، تأثیر گذار می‌باشد. انتشار آب، فاکتور کنترل‌کننده سرعت خشک شدن در خشک‌کن انجمادی است، از این‌رو کاهش اندازه ذرات می‌تواند فرایند خشک شدن را سرعت ببخشد. مقادیر استاندارد رطوبت در مورد پودر-های خشک مورد استفاده در صنایع غذایی ۳ تا ۴٪ می‌باشد [۲۶، ۲۷]. لذا با توجه به نتایج، استفاده از نانوکپسول‌های تولید شده در صنعت غذا با محدودیتی مواجه نمی‌باشد.

۶.۳. دانسیته حجمی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری دانسیته حجمی نانوکپسول‌های تولید شده در جدول (۳) آورده شده‌است. طبق نتایج، نانوکپسول تهیه شده با (۱/۵: ۹/۵٪) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده دارای بیش‌ترین دانسیته حجمی (0.96 g/cm^3) و نانوکپسول تهیه شده با (۱/۵: ۸/۵٪) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده دارای کم‌ترین دانسیته حجمی (0.34 g/cm^3) بود. بر اساس تحقیقات آغباشلو و همکاران [۲۳] افزایش در اندازه ذرات باعث کاهش دانسیته حجمی خواهد شد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت. اختلاف در مقادیر دانسیته حجمی ناشی از تفاوت در ترکیب شیمیایی، اندازه ذرات و مقدار رطوبت هم‌چنین شرایط فرایند و نگهداری می‌باشد [۱۷]. دانسیته بالاتر شاید مربوط به درجه بالای آگلومریزاسیون و از هم پاشیدگی ساختاری آن‌ها باشد که می‌تواند موجب کاهش حجم کپسول‌ها گردد.

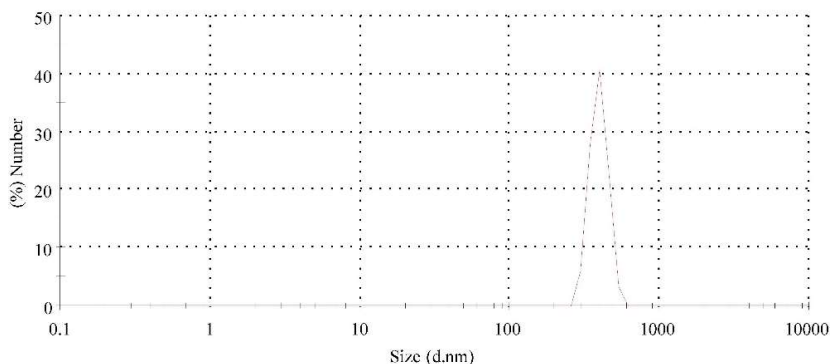
۷.۳. راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین پایداری ترکیبات کپسوله شده می‌باشد که مانع از دست رفتن مواد فرار و سبب افزایش مدت ماندگاری محصولات با کاهش مقدار روغن سطحی بر سطح ذرات می‌گردد [۲۸]. نانوکپسول‌های تهیه شده با (۱/۵: ۸/۵٪) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده دارای بالاترین راندمان ریزپوشانی (۸۵/۴۳٪) بودند و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) را نشان دادند. تفاوت در نوع دیواره و هسته، انواع روش‌های خشک‌کردن و ویژگی‌های امولسیون از

	Diam. (nm)	Intensity %	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 553.8	Peak 1 : 396.4	100.0	35.26
PDI : 0.444	Peak 2 : 0.000	0.0	0.000
Intercept : 0.591	Peak 3 : 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

Size Distribution by Number



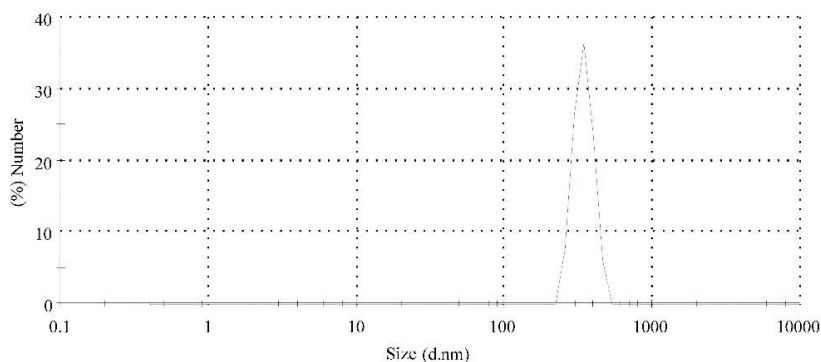
Record 3892: 14 1

(a)

	Diam. (nm)	Intensity %	Width (nm)
Z-Average (d.nm) : 459.1	Peak 1 : 347.6	100.0	37.17
PDI : 0.439	Peak 2 : 0.000	0.0	0.000
Intercept : 0.773	Peak 3 : 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report

Size Distribution by Number



Record 3867: 13 1

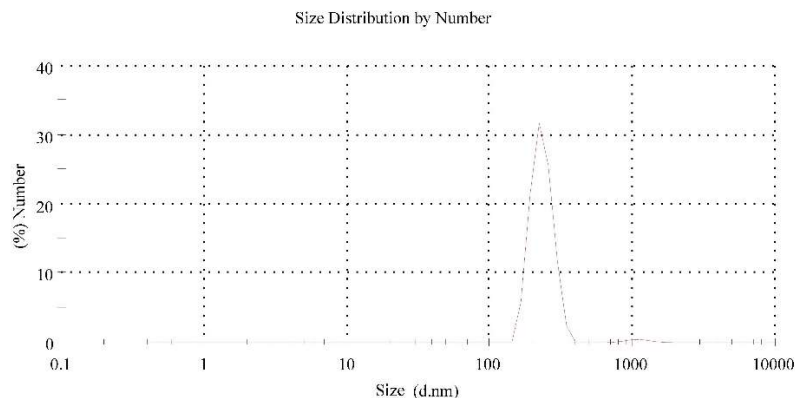
(b)

شکل (۱) توزیع اندازه ذره‌ای نانوکپسول‌های حامل اسانس (a) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۹/۵ : ۰/۵ درصد) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده؛ (b) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۹ : ۱ درصد) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده؛ (c) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۸/۵ : ۱/۵ درصد) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده

Fig. 1 polydispersity index of nanocapsules containing essential oil a) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (0.5%: 9.5%) (w/v); b) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (1%: 9%) (w/v); c) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (1.5%: 8.5%) (w/v)

	Diam. (nm)	Intensity %	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 339.2	Peak 1 : 239.6	84.9	33.10
PDI : 0.426	Peak 2 : 1142	15.1	170.5
Intercept : 0.568	Peak 3 : 0.000	0.0	0.000

Result quality : Refer to quality report



Record 3883: 2 1

(c)

ادامه شکل (۱) توزیع اندازه ذره‌ای نانوکپسول‌های حامل اسانس (a) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۰/۵ : ۹/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده؛ (b) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۱ : ۹) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده؛ (c) میانگین اندازه ذرات در نانوکپسول‌های با پوشش (۱/۵ : ۸/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده

Fig. 1 polydispersity index of nanocapsules containing essential oil a) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (0.5%: 9.5%) (w/v); b) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (1%: 9%) (w/v); c) Mean particle size of nanocapsules with CS: Hicap ratio (1.5%: 8.5%) (w/v)

جدول (۳) مقادیر راندمان ریزپوشانی، رطوبت و دانسیته حجمی نانوکپسول‌های تولید شده.

Table 3 The values of encapsulation efficiency, moisture and bulk density of nanocapsules.

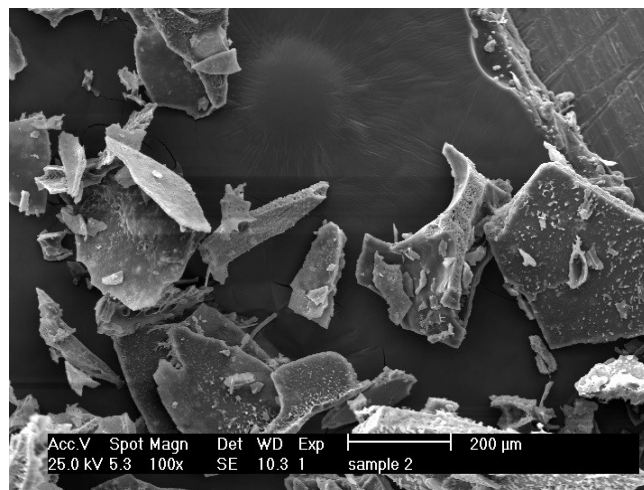
دانسیته حجمی (g/cm ³) Bulk density (g/cm ³)	رطوبت (%) Moisture (%)	راندمان ریزپوشانی (%) Encapsulation efficiency (%)	کیتوزان: نشاسته اصلاح شده (وزنی /حجمی) CS: Hicap (w/v)
0.1 ^a ± 0.6	0.1 ^a ± 2	0.71 ^b ± 68.09	۰/۵ : ۹/۵ (0.5%: 9.5%)
0.03 ^a ± 0.54	0.09 ^b ± 2.92	1.65 ^b ± 69.79	۱ : ۹ (1%: 9%)
0.05 ^b ± 0.34	0.05 ^c ± 1.13	2.35 ^a ± 85.43	۱/۵ : ۸/۵ (1.5%: 8.5%)

مقادیر در جدول نشان دهنده میانگین ± انحراف معیار می‌باشد. حروف لاتین غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده معنی‌داری (p ≤ ۰/۰۵) بین تیمارها می‌باشد.

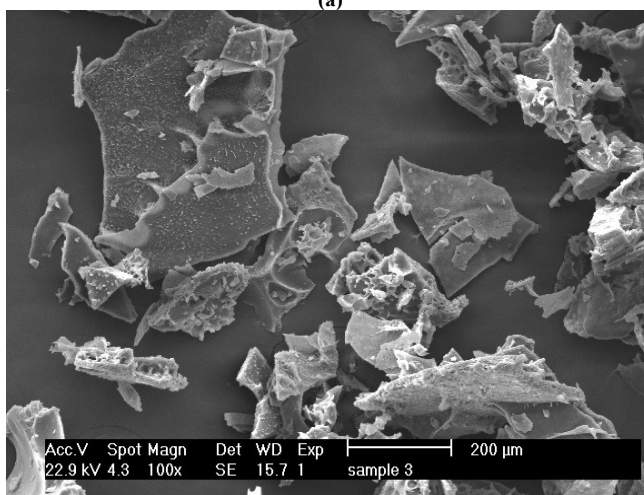
Reported means (± standard deviations) derived from 3 replications with 3 samples per replication. Means with in column followed by different superscripts are significantly different at p ≤ 0.05

مشاهده شد (شکل c-۲). همان‌طور که در شکل (a-۲) مشاهده می‌گردد، بر سطح نانوکپسول‌ها شکاف‌ها و منافذی وجود دارند که می‌تواند با پایین بودن راندمان ریزپوشانی و بالاتر بودن میزان رطوبت در پودر نانوکپسوله توجیه گردد.

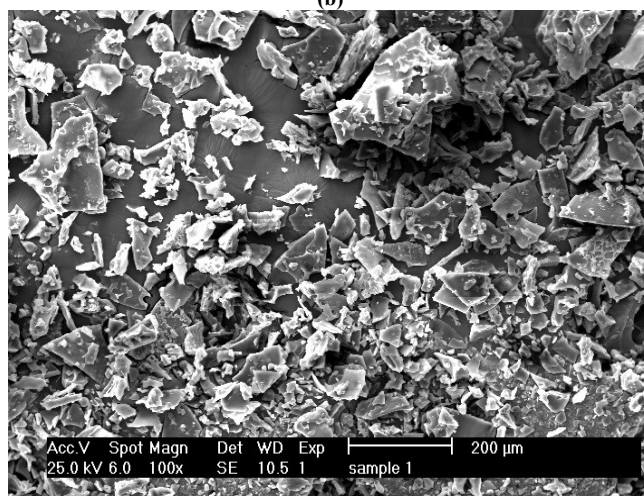
مطابق تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوب الکترونی روبشی، نانوکپسول‌های حاوی اسانس ساختاری ورقه‌ای شکل داشتند که در پودرهای به‌دست آمده از روش خشک‌کن انجمادی معمول می‌باشد [۳۲]. خلل و فرج موجود در ساختار نانوکپسول‌ها



(a)



(b)



(c)

شکل (۲) ساختار سطحی پودرهای حاصل از ریزپوشانی اسانس لیموترش با پوشش (a) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده، (b) (۹:۱) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده، و (c) (۸/۵:۱/۵) کیتوزان: نشاسته اصلاح شده.

Fig. 2 SEM images showing the morphology of dried Lemon essential oil nano-capsules (powder form) produced from different ratio of wall material combinations: a) CS: Hicap (0.5%: 9.5% w/v); b) CS: Hicap (1%: 9% w/v); c) CS: Hicap (1.5%: 8.5% w/v).

حاوی اسانس لیمو همچون راندمان ریزپوشانی، اندازه ذرات و ساختار سطحی از نوع و نسبت ترکیبات مورد استفاده در فرایند ریزپوشانی تأثیر می پذیرند. با بررسی ساختار سطحی پودرهای نانوکپسوله اسانس لیموترش، راندمان ریزپوشانی و سایر شاخص-ها، استفاده از کمپلکس کیتوزان و نشاسته اصلاح شده با نسبت ۱/۵: ۸/۵ درصد) به عنوان بهترین فرمولاسیون جهت ریزپوشانی اسانس لیمو ترش در تحقیق حاضر تعیین گردید.

می تواند به دلیل تشکیل کریستال های کوچک یخ در طول فرایند فریز کردن باشد.

۴- نتیجه گیری

یافته های حاصل از این بررسی به خوبی نشان داد که خصوصیات فیزیکوشیمیایی امولسیون از قبیل پایداری امولسیون، ویسکوزیته، اندازه قطرات، و هم چنین ویژگی های نانوکپسول های

منابع

- smoke in chitosan-maltodextrin based nanoparticles. *Int. Food Res. J.*, 20 (3), 1269–1276.
- [11] Najaf Najafi, M., Kadkhodae, R., Mortazavi, S.A. (2010). Effect of Drying Process and Wall Material on the Properties of Encapsulated Cardamom Oil. *Food Biophysics.*, 6(4), 254-262.
- [12] Danviriyakul, S., McClements, D.J., Decker, E., Nawar, W.W., Chinachoti, P. (2002). Physical stability of spray-dried milk fat emulsion as affected by emulsifiers and processing conditions. *J. Food Sci.*, 67(6), 2183–2189.
- [13] Hogan, S.A., McNamee, B.F., Dolores O’Riordan, E., O’Sullivan, M. (2001). Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends. *Int Dairy J.*, 11(3), 137–144.
- [14] García, M.C., Alfaro, M.C., Calero, N., Munoz, J. (2014). Influence of polysaccharides on the rheology and stabilization of α -pinene emulsions. *Carbohydr. Polym.*, 105, 177–183.
- [15] Bringas-Lantigua, M., Expósito-Molina, I., Reineccius, G.A., López-Hernández, O., Pino, J.A. (2011). Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated mandarin oil. *Dry. Technol.*, 29 (5), 520–526.
- [16] Goula, A.M., Adamopoulos, K.G. (2012). A new technique for spray-dried encapsulation of lycopene. *Dry. Technol.*, 30(6), 641–652.
- [17] Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J. Food Eng.*, 115 (4), 443–451.
- [18] Boughendjioua, H., Djedd, S. (2017). Organoleptic and Physicochemical Properties of Algerian Lemon Essential Oil. *WJAC.*, 2 (3), 96–100.
- [19] Bourgou, S., Rahali, S.F.Z., Ourghemmi, I., Tounsi, M.S. (2012). Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation, the Scientific World Journal. Article ID 528593, 10 p.
- [1] Cortés-Camargo, S., Cruz-Olivares, J., Barragán-Huerta, B.E., Dublán-García, O., Román-Guerrero, A., Pérez-Alonso, C. (2017). Microencapsulation by spray drying of lemon essential oil: Evaluation of mixtures of mesquite gum–nopal mucilage as new wall materials. *J. Microencapsul.*, 4 (6), 395-407.
- [2] Vasudeva, N., Sharma, T. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Citrus limettioides Tanaka. *HOAJ.*, 1(2), 1–7.
- [3] Souza, J.M., Caldas, A.L., Tohidi, S.D., Molina, J., Souto, A.P., Fanguero, R., Zille, A. (2014). Properties and Controlled Release of Chitosan Encapsulated Limonene Oil. *Revi. Bras. Farmacogn.*, 24(2), 691–698.
- [4] Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Dry. Technol.*, 26 (7), 816–835.
- [5] Drusch, S., Serfert, Y., Berger, A., Shaikh, M.Q., Ratzke, K., Zaporozhchenko, V., Schwarz, K. (2012). New insights into the microencapsulation properties of sodium Caseinate and hydrolyzed casein. *Food Hydrocoll.*, 27(2), 332–338.
- [6] Hasani, M., Elhami Rad, A.H., Hosseini, M.M., Shahidi Noghahi, M. (2015). Physicochemical characteristic of microencapsulated fish oil by freeze-drying using different combinations of wall materials. *Biosci., Biotech. Res. Asia.*, 12(2), 45–51.
- [7] Ghasemi, S., Jafari, S.M., Assadpour, E., Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. *Carbohydr. Polym.*, 177, 369–377.
- [8] Hosseini, S.F. Ramezanzade, L., Nikkhah, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 105, 1455–1463.
- [9] Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem.*, 125, 1267–1272.
- [10] Saloko, S., Darmadji, P., Setiaji, B., Pranoto, Y., Anal, A.K. (2014). Encapsulation of coconut shell liquid

- [20] Dickinson, E. (2008). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.*, 23(6), 1473–1482.
- [21] Klaypradit, W., Huang, Y.W. (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer, *LWT - J. Food Sci. Technol.*, 41(6), 1133–1139.
- [22] Petrovic, L.B., Sovilj, V.J., Katona, J.M., Milanovic, J.L. (2010). Influence of polymer-surfactant interactions on o/w emulsion properties and microcapsule formation. *J. Colloid Interface Sci.*, 342(2), 333–339.
- [23] Aghbashlo, M., Mobli, H., Madadlou, A., Rafiee, S.H. (2012). The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. *Food Res Int.*, 49(1), 379–388.
- [24] Tonon, R. V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D. (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Res Int.*, 44(1), 282–289.
- [25] Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., Young Quek, S. (2013). Co-encapsulation of fish oil with phytosterol esters and limonene by milk proteins. *J. Food Eng.*, 117(4), 505–512.
- [26] Klinkesorn, U.P., Sophanodora, P., Chinachoti, E.A., Decker, D.J., McClements, H. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Res Int.*, 39(4), 449–457.
- [27] Lim, H.K., Tan, C.P., Bakar, J., Ng, S.P. (2011). Effects of different wall materials on the physicochemical properties and oxidative stability of spray-dried microencapsulated red-flashed Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed oil. *Food Bioproc Tech.*, 5(4), 1220–1227.
- [28] Hosseini, S.F., Ramezanzade, L., Nikkhah, M. (2017). Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *Int. J. Biol. Macromol.*, 105 (1), 1455-1463.
- [29] Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization, *Eur. Food Res. Technol.*, 225(5), 733–74.
- [30] Legako, J., Dunford, N.T. (2010). Effect of spray nozzle design on fish oil-whey protein microcapsule properties. *Food Sci.*, 75(6), 394–400.
- [31] Hundre, S.Y., Karthik, P., Anandharamakrishnan, C. (2015). Effect of whey protein isolate and beta cyclodextrin wall systems on stability of microencapsulated vanillin by spray-freeze drying Method. *Food Chem.*, 174(1), 16–24.
- [32] Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review, *Food Bioproc Tech.*, 6(3), 628–647.