

Optimizing Production of Persian Shallot Essential Oil Emulsion Loaded with Omega 3 Fatty Acids by Nano Polyaniline-Fiber/Gas Chromatography

NASRIN FARAJI¹, MOHAMMAD ALIZADEH², SAJAD PIRSA^{3*}, HADI ALMASI⁴

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

(Received: Nov. 13, 2017- Revised: Jan. 17, 2018- Accepted: Feb. 3, 2018)

ABSTRACT

The aim of this study was to produce Persian shallot essential oil nano-emulsion containing omega-3 fatty acids by spontaneous emulsification method and obtain the optimum conditions by head space-solid phase microextraction/gas chromatography (HS-SPME/GC) technique and polyaniline (PANI) nano fiber. The effects of four factors including omega 3 percent, surfactant type (TWEEN 20, 80 and caseinate sodium), surfactant-to-oil ratio (SOR 10-300%), and storage time on the encapsulation efficiency and chromatographic characteristics (including total peak area and total peak height) were studied. The Central Composite Design (CCD) was used to design 32 experiments. The effects of factors was considered on the emulsion, and P-value of <0.05 statistically significant. Desirability function (D) was used for determination of optimum conditions. Results showed that all four factors affected GC chromatogram characteristics, essential oil release and encapsulation efficiency. According to the results at the optimum conditions, the emulsion has the maximum amount of encapsulation and the best release power: Omega 3(75%), Storage Time (57 days), SOR (238%) and Surfactant type (T20). Values of dependent variables at the optimum conditions were obtained: total peak area (534.9), total peak height (15) and encapsulation efficiency (78.3 %).

Keywords: Emulsion, Omega 3 fatty acids, spontaneous emulsification, Persian shallot, encapsulation, Nano-polyaniline, Head space- Gas chromatography

بهینه سازی تولید امولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی امگا سه با تکنیک ریز استخراج فاز جامد بوسیله نانوفیبر پلی آنیلین/کروماتوگرافی گازی

نسرین فرجی^۱، محمد علیزاده^۲، سجاد پیرسا^{۳*}، هادی الماسی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۳. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۴. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۲ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴)

چکیده

هدف از این پژوهش تولید امولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه به روش امولسیفیکاسیون خود به خودی و بدست آوردن شرایط بهینه تولید امولسیون با روش آنالیز مواد فرار با تکنیک ریز استخراج فاز جامد/کروماتوگرافی گاز بوسیله نانوفیبر پلی آنیلینی می باشد. تأثیر چهار متغیر مستقل غلظت امگا سه (۷۵-۲۵ درصد)، نوع سورفاکتانت (توئین ۸۰، توئین ۲۰، توئین ۸۰:۲۰ و سدیم کازئینات)، درصد نسبت سورفاکتانت به روغن (SOR) (۱۰-۳۰ درصد) و زمان نگهداری (۶۰-۱ روز) بر ویژگی های کروماتوگرافی (شامل سطح زیر کل پیک ها و نیز ارتفاع کلی پیک ها) و راندمان درون پوشانی بررسی شدند. از طرح مرکب مرکزی برای طراحی آزمایشات استفاده شد و ۳۲ آزمایش طراحی گردید. تأثیر فاکتورهای موثر بر امولسیون در سطح احتمال ۹۵ درصد بررسی شد. تابع مطلوبیت برای بدست آوردن شرایط بهینه تولید امولسیون استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد هر ۴ فاکتور بررسی شده بر روی ویژگی های کروماتوگرافی، میزان رهایش اسانس و نیز راندمان درون پوشانی موثر می باشند. بر اساس نتایج بدست آمده در شرایط بهینه زیر امولسیون تهیه شده بیشترین مقدار درون پوشانی و نیز بیشترین رهایش را نشان می دهد: امگا سه (۷۵٪)، مدت زمان نگهداری (۵۷ روز)، SOR (% (۲۳۸٪) و نوع سورفاکتانت (توئین ۲۰) تعیین شدند. در این شرایط بهینه مقادیر متغیرهای وابسته مقدار سطح زیر پیک (۵۳۴/۹)، ارتفاع پیک (۱۵) و راندمان درون پوشانی (۷۸/۳٪) بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: امولسیون، اسیدهای چرب امگا سه، امولسیفیکاسیون خودبه خودی، اسانس موسیر ایرانی، درون پوشانی، نانو پلی آنیلین، کروماتوگرافی گازی - فضای فوقانی

مقدمه

2002). ترکیبات فرار برنجهای ایرانی و همچنین گز به عنوان یک فراورده ایرانی نیز به روش SPME بررسی شده است. (Lipan *et al.*, 2016 & Hojjati *et al.*, 2015).

نانوامولسیون‌ها (مینی امولسیون، امولسیون‌های ساب میکرون، امولسیون‌های با ذرات بسیار ریز) را می‌توان نوعی امولسیون متداول در نظر گرفت که حاوی قطرات فاز پراکنده بسیار ریز می‌باشند و شعاع ذرات در آن به طور متوسط، در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر قرار می‌گیرند. این امولسیون‌ها دارای یک سری مزیت‌هایی نسبت به امولسیون‌ها متداول می‌باشند: شفاف (تا حدی مات) می‌باشند؛ زیرا شعاع کوچک تر از طول موج نور می‌باشد. به این ترتیب می‌توان نوشیدنی‌های شفاف را بدون اینکه تغییری در خصوصیات ظاهری آن‌ها ایجاد شود، غنی‌سازی نمود (Dan Su & Qixin Zhong., 2016). از روش‌های مختلفی برای تولید امولسیون‌ها استفاده می‌شود، که بطور کلی می‌توان به انواع کم انرژی و پر انرژی تقسیم بندی نمود (Brandelli *et al.*, 2016). در روش‌های پرانرژی با استفاده از ابزار و تجهیزات گران قیمت نانوامولسیون تولید می‌شود اما در روش‌های کم انرژی، در سیستم مخلوط حاوی روغن، امولسیفایر و آب با تغییر شرایط محیطی یا شرایط محلول می‌توان موفق به تشکیل امولسیون شد. این روش‌ها شامل تولید خود به خودی امولسیون^۲ و روش‌های معکوس امولسیون^۳ می‌باشد. سادگی و ارزان بودن از مزیت‌های روش کم انرژی نسبت به روش پرانرژی کوچک تر خواهد بود (Lee & McClements., 2010). درامولسیفیکاسیون خود بخودی زمانیکه دو فاز در مجاورت هم قرار می‌گیرند، هر کدام از فازها حاوی اجزائی می‌باشند که با فاز دیگر غیر قابل امتزاج می‌باشند. یکی از فازها نیز حاوی ترکیبی می‌باشد که تا حدودی قابل امتزاج با هر دو فاز می‌باشد. سورفاکتانت و یا کمک سورفاکتانت (الکل آمفی‌فیلیک) به تدریج، از فازی که در آن حضور داشته به فاز دیگر مهاجرت می‌کند. با مهاجرت این ترکیب، مساحت بین سطحی افزایش می‌یابد، آشفتگی بین سطحی ایجاد می‌شود و در نهایت امولسیون تشکیل می‌شود. می‌توان با تغییر شرایط هم زدن و نوع فازهایی که برای تولید امولسیون از آن‌ها استفاده شده بود، اندازه ذرات را کنترل نمود (Rao & McClements., 2013). سورفاکتانت‌های کوچک مولکولی برای تشکیل و بهبود دیسپرسیون‌های کلونیدی مانند

اخیراً تکنیک ریزاستخراج فاز جامد با روش فضای فوقانی^۱ به عنوان یک روش ساده پیش تغلیظ برای استخراج ترکیبات فرار بکار برده شده است. این تکنیک برای نخستین بار توسط تیم تحقیقاتی پروفیسور پاولیژین در دانشگاه واترلو کانادا ابداع شد و روش آماده سازی نمونه ی سریع و بدون نیاز به حلال را فراهم نمود (Pawliszyn, 1995). در HS-SPME از یک سیلیکای گداخته ی نازک پوشیده شده با یک پلیمر جاذب استفاده می‌کند. اصول روش SPME بر مبنای استفاده از حجم خیلی کوچکی از فاز استخراجی است که روی سطح جاذب جامدی نشانده می‌شود. فاز استخراجی ممکن است یک مایع پلیمری با وزن مولکولی بالا باشد که در آن استخراج با انتقال گونه به داخل فاز آلی انجام می‌گیرد و یا ممکن است جاذب، جامد متخلخلی باشد که در آن استخراج به دنبال جذب گونه روی سطح جامد رخ می‌دهد. این تکنیک یک روش ایده آل برای نمونه‌برداری از مایعات، گازها و فضای فوقانی مایعات و جامدات می‌باشد. ریزاستخراج با فاز جامد علاوه بر اینکه یک روش استخراج است، یک وسیله برای واردسازی نمونه به دستگاه‌های تجزیه‌ای به ویژه کروماتوگرافی گازی محسوب می‌شود (Lambropoulou & Albanis, 2002) از جمله مزایای این روش عدم نیاز به حلال، سادگی، هزینه کمتر، نیاز به حجم کم نمونه، سازگار با محیط زیست، کوتاه تر شدن زمان استخراج (در حد چند دقیقه)، دارای حساسیت بالاتر (قابلیت تشخیص آنالیت‌ها در مقادیر پی پی ام و پی پی بی) امکان نمونه برداری میدانی (نمونه برداری از یک محل با دستگاه قابل حمل مجهز به کلاهک و سپس انتقال آن به آزمایشگاه) است و معایب این روش شامل محدود بودن به نمونه‌های گازی و مایع و دارای محدودیت استفاده درمورد آنالیت‌هایی با غلظت بالا می‌باشد (Matisova *et al.*, 2002).

Shirey (2000) به مطالعه برآنالیز ترکیبات فرار سولفور ه مانند دی متیل سولفید، تری سولفید در میوه جات با روش‌های SPME با GC-FID و GC-MS پرداختند. اکثر ترکیبات سولفور ه در پیاز دی پروپیل دی سولفید می‌باشد. در حدود ۶۰ ترکیب فرار بسته به سطح رسیدگی فلفل بطور عمده ۲-۳ بوتائیدین، هگزانول، ایزوبوتیل و لینولول در فلفل تازه با استفاده از روش SPME اندازه گیری شدند که این ترکیبات در تعیین کیفیت فلفل موثر هستند (Stenson *et al.*,

میکرومولسیون‌ها و نانومولسیون‌ها بکار گرفته شده‌اند. سورفاکتانت‌ها تمایل به جذب در سطح بینابینی ذرات را دارند و این سورفاکتانت‌ها جذب شده با کاهش کشش سطحی تشکیل ذرات با اندازه کوچک تر را سبب می‌شوند. وجود سورفاکتانت‌ها در سطح بینابینی از طریق ایجاد نیروهای دافعه مانند دافعه استریکی و الکتروستاتیکی سبب پایداری طولانی مدت می‌شوند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی یک امولسیون مانند تشکیل، پایداری و بافت به ماهیت لایه بین سطحی وابسته است. بنابراین عوامل موثر بر ترکیب این لایه نیز مهم می‌باشد که عبارتند از روش تهیه امولسیون، نوع و غلظت مولکول فعال سطحی موجود، تمایل نسبی آنها به لایه بین سطحی می‌باشد. سرعت نسبی مولکولهای سورفاکتانت به خصوصیات مولکولی (شکل، اندازه و قطبیت) بستگی دارد. در غلظت‌های پایین سورفاکتانت‌ها به صورت تک لایه در سطح بینابینی قرار می‌گیرد و سطح را اشباع می‌کند اما با افزایش غلظت مولکولهای سورفاکتانت بطور خود به خودی تجمع می‌یابند و ساختارهای پایدارتر ترمودینامیکی تشکیل می‌دهند که تحت عنوان کلوئیدهای تجمعی یاد می‌شود نیروی محرکه برای تشکیل این ساختارها اثر آبرگری می‌باشد (Anton & Vandamme., 2009). مولکول‌های سورفاکتانت به لایه بین سطحی روغن-آب جذب می‌شوند و طوری جهت‌گیری می‌کنند که قسمت آبدوست مولکول در فاز آبی و قسمت آبرگریز داخل فاز روغن قرار می‌گیرد به این ترتیب تماس بین دو منطقه آبدوست و آبرگریز حداقل شده و کشش سطحی کاهش می‌یابد. توئین‌ها (توئین ۸۰ یا پلی اکسی اتیلن سوربیتان منوآلانات و توئین ۲۰ یا پلی اکسی اتیلن سوربیتان منو لورات) از دسته سورفاکتانت‌های غیر یونی بوده که به طور گسترده ای در صنعت غذا استفاده می‌شود زیرا سمیت کمی دارند (Anton & Vandamme., 2011). کازئینات سدیم از دسته سورفاکتانت‌های بیوپلیمری درشت مولکول و جزو پروتئین‌های اصلی شیر بوده و چهار نوع عمده آن عبارتند از α_{s1} (۴۴٪)، α_{s2} (۱۱٪)، β (۳۳٪) و k (۱۱٪). این مولکولها ساختار تصادفی و انعطاف پذیری داشته و ساختار دوم بسیار محدودی دارند که دارای مناطق آبرگریز و آبدوست در زنجیره پپتیدی هستند. مکانیسم اصلی پایدار کننده قطرات در برابر انبوهش، توسط پروتئین‌های کازئینی دافعه الکتروستاتیکی است (Hu et al., 2003). بسیاری از سازمان‌ها در سطوح ملی و بین‌المللی توصیه‌هایی برای اسیدهای چرب امگا سه داشته‌اند. این توصیه در مورد ماهی، EPA، DHA، ALA، می‌باشد. انجمن دستورالعمل‌های غذایی آمریکا سال ۲۰۱۰، ۲۵۰ میلی گرم از EPA و DHA در هر روز از میانگین ۸ انس (۲۲۷ گرم) در هفته

مصرف غذاهای دریایی را پیشنهاد کردند. برای زنان باردار ۸ تا ۱۲ انس (۲۲۷ تا ۳۴۰ گرم) از غذاهای دریایی بدون جیوه در هر هفته توصیه می‌شود. رژیم غذایی اکثر کشورها، نمی‌تواند مقدار کافی از امگا سه را تامین کنند. پژوهش‌های گوناگون، اثرات سودمند مصرف اسیدهای چرب چند غیراشباعی امگا سه را در رشد و نمو سلسله اعصاب و بینایی و جلوگیری از بیماری‌های قلبی، فشارخون بالا، سرطان، دیابت، تورم مثانه، تنگی نفس، ورم مفاصل، افسردگی، جنون جوانی و اختلال حواس نشان داده‌اند (Kris-Etherton et al., 2009).

منبع اصلی اسیدهای چرب چند غیراشباعی در رژیم غذایی انسان، روغن ماهی و فرآورده‌های دریایی است. با توجه به اینکه برخی مردم از ماهی تنفر دارند، برخی مردم نمی‌توانند ماهی را تهیه کنند؛ ماهی تازه مستعد فساد است؛ ماهی ممکن است حاوی آلودگی‌های نامطلوب (مانند فلزات سنگین) باشد؛ مصرف بالای ماهی ممکن است تامین ماهی را دچار مشکل کند، رشد جمعیت تقاضای ماهی را افزایش می‌دهد بنابراین توجه زیادی در توسعه محصولات حاوی امگا سه و جایگزین‌های مناسب در رژیم غذایی شده است (Maki et al., 2014). مشکل مهم افزودن اسیدهای چرب چند غیراشباعی امگا سه به درون مواد غذایی، استعداد زیاد این نوع اسیدهای چرب به اکسایش و تند شدن است. اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع یکی از دلایل اصلی کاهش کیفیت غذاها بوده که به واسطه حضور رادیکال‌های آزاد آغاز می‌شود. حضور مقادیر زیاد اسیدهای چرب غیراشباع با چند باند دوگانه مانند اسید لینولئیک و اسید لینولنیک چربی‌ها و روغن‌ها می‌تواند آن‌ها را به اکسیداسیون آسیب پذیرتر کند. این مشکل وقتی شدیدتر می‌شود که روغن در مواجهه با عواملی مانند اکسیژن، نور، دمای بالا و یا فلزاتی مانند آهن و مس قرار گیرد (Kennedy et al., 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها اصلی‌ترین ترکیباتی هستند که باعث حفظ کیفیت روغن‌ها و چربی‌ها با به تأخیر انداختن اکسیداسیون آنها می‌شوند علاوه بر آنتی‌اکسیدان‌ها، میکروانکپسولاسیون با محافظت ترکیبات بیواکتیو لیپوفیلیک از عوامل اکسیداسیون می‌توانند در بهبود پایداری اکسیداسیونی موثر باشند. از طرف دیگر، اسیدهای چرب امگا سه، به علت محلولیت پایین در آب، ناپایداری شیمیایی و قابلیت دسترسی کم نمی‌توان به صورت مستقیم درون مواد غذایی غنی سازی کرد. بنابراین برای غلبه بر این مشکلات، از سیستم‌های کلوئیدی مانند نانومولسیون‌ها می‌توان استفاده کرد (Lavie et al., 2009).

اسانس موسیر ایرانی به عنوان فاز روغنی استخراج شده از گیاه موسیر ایرانی به عنوان عامل طعم دهنده، ضد میکروبی،

تهیه شده بودند بدون خالص سازی مجدد مورد استفاده قرار گرفتند. در تمام آزمایشات و برای تهیه ی محلول از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد تصاویر SEM با استفاده از میکروسکوپ الکترون روبشی S4160C Hitachi ساخت کشور ژاپن ثبت شد. سرنگ هاملتونی ۱۰ و ۲۵ میکرولیتری و پیپت های مدرج ۲ و ۵ میلی لیتری برای برداشتن حجم های مورد نیاز بکار رفت. شیشه‌های ۱۲ میلی لیتری با درب سیلیکونی و پارافیلیم و درپوش آلومینیومی پرسی برای انجام میکرو استخراج با روش HS-SPME-GC به کار گرفته شد.

دستگاه کروماتوگرافی گازی اجیلنت ۷۸۹۰ ساخت کشور آمریکا مجهز به شناساگر یونیزاسیون شعله ای و دریچه تزریق انشعابی/غیر انشعابی استفاده شد. از نرم افزار Chemstation برای ثبت پیک ها و آنالیز داده ها استفاده شد. برای جداسازی پیک های مواد فرار امولسیون دمای اولیه ستون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت سپس با سرعت ۲ درجه سلسیوس در دقیقه به دمای ۸۰ درجه سلسیوس رسید و به مدت ۵ دقیقه در آن دما نگه داشته شد. دمای دریچه تزریق و آشکارساز به ترتیب در دمای ۲۵۰ و ۲۰۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید. سرعت جریان گاز حامل نیتروژن ۲ میلی لیتر در دقیقه و سرعت جریان گاز نیتروژن به عنوان گاز کمکی ۲۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. ستون استفاده شده برای جداسازی ستون موئینه سیلیسی ساخت کشور آمریکا بوده و طول ستون ۳۰ متر و قطر آن ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز جامد ۰/۳۲ میکرومتر بود (Kataoka et al., 2009).

روش تهیه امولسیون

سیستم امولسیون حاوی امگا سه با استفاده از روش کم انرژی تشکیل خودبه خودی امولسیون روغن در آب با اضافه کردن قطره قطره فاز روغنی (محلول امگا سه در اسانس روغنی حامل به همراه سورفاکتانت های توئین ۲۰، توئین ۸۰ و کازئینات سدیم) بر روی آب دیونیزه مطابق جدول شماره یک، تولید شد. در حین تشکیل، امولسیون به طور مداوم توسط همزن مغناطیسی با سرعت بهینه ۸۰۰ دور بردقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت همزده شد. با توجه به تأثیر دما در اندازه ذرات امولسیون، از همزن مغناطیسی مجهز به سنسور تنظیم دما استفاده گردید، به این ترتیب امولسیون مورد نظر تهیه شد (Saberi et al., 2013).

اندازه گیری راندمان درون پوشانی

اندازه گیری روغن سطحی

۱ گرم از نمونه های امولسیون با ۱۰ میلی لیتر دی اتیل اتر

ضد قارچی و آنتی اکسیدانی به طور گسترده در صنعت غذا بکار برده می شود. موسیر ایرانی^۱ با نام علمی *Allium hirtifolium* Boiss از خانواده ی بزرگ لاله سانان است که گونه های مهم و شناخته شده ی دیگری از قبیل سیر، پیازها و تره فرنگی را در برمی گیرد اسانس موسیر ایرانی حاوی ترکیبات عمده ارگانوسولفوری شامل دی آلیل دی سولفید، سولفید سیستئین و فلاونول ها می باشند. در امولسیونها، اسانس موسیر اثرات مثبتی روی ثبات فیزیکی و اکسیداسیونی داشت (Jalal et al., 2007). Bahrani et al (2013) تولید نانو کمپلکس های بیوپلیمری پکتین کازئین به عنوان یک نانو حامل بالقوه برای ریزپوشانی امگاسه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج اندازه ذرات و پتانسیل زتا تشکیل دیسپرسیون پایدار با حداقل اندازه ۸۶ نانومتر را نشان دادند. کروماتوگرافی گازی، ریزپوشانی امگا سه در کمپلکس کازئین پکتین و راندمان ریزپوشانی ۹۱٪ را برای این سیستم نشان داد.

هدف از این پژوهش، بررسی بکارگیری روش میکرواستخراج با فاز جامد- فضای فوقانی برای ارزیابی پایداری اکسیداتیوی و راندمان درون پوشانیدر تولید نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه به روش تشکیل خودبه خودی به منظور استفاده در سیستم های غذایی می باشد.

مواد و روش ها

روغن ماهی از شرکت داروسازی زهراوی تبریز، کازئینات سدیم، DPPH، متانل از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical, Germany)، توئین ۸۰، توئین ۲۰، هیدروکسید سدیم، فنل فتالئین، تری کلرو استیک اسید، کلروفرم، چسب نشاسته از شرکت سیگما آلدریج آمریکا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شد. اسانس موسیر از شرکت دانش بنیان عطر و طعم ماگنولیا (ایران) تهیه شد و آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنجی جرمی (GCMS-QP2010SE) شرکت SHIMADZU ژاپن) انجام شد. آب دوبار تقطیر برای تمام نمونه ها تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند.

آنیلین استفاده شده قبل از مصرف تحت خلا تقطیر شد و با دی کرومات پتاسیم مورد استفاده قرار گرفت. مونومر آنیلین از شرکت مرک و سایر ترکیبات آلی مورد استفاده از شرکت آلدریج تهیه شدند. این ترکیبات که از شرکتهای مرک و آلدریج

خارج گردد. در انتها آن با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت خشک گردید. فیبر پلی آنیلین بعنوان فیبر SPME مورد استفاده قرار گرفت (Nam & Dong-Sun, 2004).

استفاده از فیبر پلی آنیلین برای استخراج

فیبر پلی آنیلین تهیه شده در تیوب نگهدارنده فیبر در سرنگ مخصوص SPME (که توسط گروه تحقیقاتی دکتر پیرسا و دکتر عزیزاده طراحی شده است) قرار داده شد. قبل از استفاده از فیبر برای آزمایش SPME فیبر برای ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس و سرانجام به مدت یک ساعت در دمای ۲۲۰ درجه سلسیوس تحت جریان گاز نیتروژن در منطقه تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی آماده سازی شد، به نحوی که آلودگی های آن کاملاً برطرف شد (Garcia-Esteban et al., 2004).

عملیات استخراج مواد فرار امولسیون

دو میلی لیتر از امولسیون در دخل شیشه های ۱۰ میلی لیتری حاوی مگنت با درب سیلیکونی و پارافیلیم و در پوش آلومینیومی تحت شرایط دمای ۴۰ درجه سانتی گراد، سرعت همزنی ۶۰۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سرنگ طراحی شده حاوی فیبر پلی آنیلین در فضای فوقانی شیشه قرار گرفت به طوری که فیبر در تماس با بخارات نمونه قرار گیرد. مواد فرار امولسیون ها جذب فیبر می شوند. بعد از جذب مواد فیبر، فیبر بدون سرنگ SPME کشیده شد و بلافاصله به محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی انتقال داده می شود (Sarafraz & Es'haghi 2005). شکل ۱ نمونه کروماتوگرام مربوط به مواد فرار استخراج شده از امولسیون و شناسایی شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی را نشان می دهد.

طرح آماری

در این تحقیق از روش مرکب مرکزی^۱ برای بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل شامل میزان امگا سه، زمان نگهداری، درصد SOR و نوع سورفاکتانت به منظور بررسی کارایی تولید امولسیون، میزان رهائش اسانس از امولسیون و ویژگی های کروماتوگرافی گازی مطابق جدول ۱ به تعداد ۳۲ فرمولاسیون استفاده گردید و پس از آنالیز رگرسیون و تعیین مدل های مناسب از روش تابع مطلوبیت عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شد. سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰/۰۵ در نظر گرفت شد. از نرم افزار Design Expert 7.1.6 جهت طراحی آزمایشی، تحلیل داده ها، مدل سازی، بهینه کردن پارامترها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده

خشک مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و توسط کاغذ صافی محلول صاف شد. سپس فاز آلی شفاف جدا شده و حلال آن در ۷۰ درجه سانتی گراد تبخیر گردید. سپس روغن، باقیمانده وزن شد (Uluata et al., 2015).

اندازه گیری روغن کل

۰/۵ گرم از نمونه های امولسیون با ۵ میلی لیتر آب مقطر در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه توسط همزن مغناطیسی همزده شد. ۲۵ میلی لیتر ایزوپروپانول و n-هگزان به نسبت ۳:۱ به آن افزوده شده و به مدت ۱ دقیقه همزده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و سپس فاز آلی شفاف جدا شده و حلال آن در ۷۰ درجه سانتی گراد تبخیر گردیده و سپس روغن، باقیمانده وزن شد (Uluata et al., 2015).

راندمان درون پوشانی

برای محاسبه راندمان درون پوشانی دو فاکتور روغن سطحی و روغن کل اندازه گیری میشود و راندمان براساس فرمول زیر محاسبه میشود:

(رابطه ۱)

$$\text{روغن کل} = \frac{\text{روغن سطحی} - \text{روغن کل}}{\text{روغن کل}} = \text{راندمان درون پوشانی}$$

تهیه فیبر استخراجی

پوشش دهی فیبر پلی استری با پلی آنیلین

پلی آنیلین بوسیله پلیمریزاسیون شیمیایی در دمای اتاق توسط همزن مغناطیسی بر روی پلی استر سنتز شد. جهت سنتز پلی آنیلین از دو محلول استفاده شد. محلول اول شامل ۱۰ میلی لیتر از آنیلین ۰/۱ مول در لیتر به عنوان منومر و محلول دوم شامل ۱۰ میلی لیتر محلول دی کرومات پتاسیم ۰/۲ مول در لیتر به عنوان اکسیدانت و همچنین اسید کلریدریک ۱ مول در لیتر مورد استفاده قرار گرفته شد، که به منظور پلیمریزاسیون اولیه محلول دوم به محلول اول افزوده گردید (۲۰ سانتی متر فیبر پلی استر در محلول اول غوطه ور بود) این محلول در دمای اتاق به مدت ۳ ساعت نگهداشته شد. در طول آزمایش محلول داخل بشر توسط همزن مغناطیسی همزده شد. پس از انجام عمل پوشش دهی، الیاف پلی استری پوشش داده شده از محلول خارج گردید و ابتدا با آب مقطر شسته شد و سپس در محلول آب و شوینده شستشو گردید تا مواد اضافی موجود در الیاف

¹ Central composite design

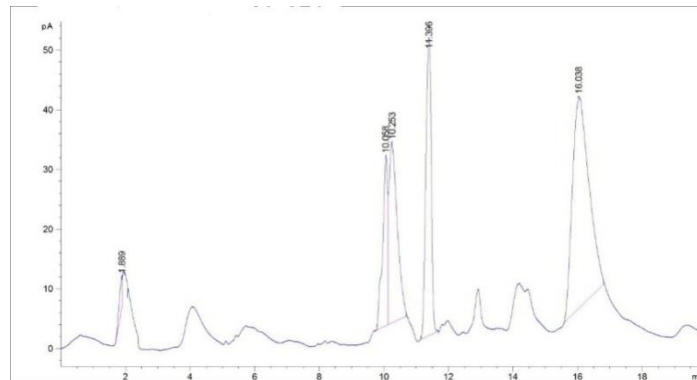
کل مدل شامل جملات خطی، درجه دوم و حاصل ضرب ها می باشد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیر های تابع در مدل رگرسیون با متغیر های مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتور پلات ترسیم شدند. به منظور ارزیابی صحت مدل های برازش داده شده با داده های آزمایشی در شرایط بهینه تعیین شده، آزمون های مورد نظر صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید (Zolgharnein *et al.*, 2013).

گردید. هر یک از متغیرهای تابع راندمان درون پوشانی و SPME در قالب مدل رگرسیون درجه دوم چند متغیره به صورت تابعی از متغیر های مستقل (A, B, C, D) به صورت زیر در جدول ۱ ارائه شدند.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2$$

(رابطه ۲)

در این مدل Y پاسخ پیش بینی شده، X_i و X_j متغیرهای مستقل (چهار فاکتور) و β_0 ضریب ثابت، β_i اثرات خطی، β_{ij} اثرات متقابل و β_{ii} اثرات مربعی می باشند.



شکل ۱. کروماتوگرام مواد فرار استخراج شده بوسیله فیبر پلی آنیلین

جدول ۱. طراحی آزمایشی مرکب مرکزی

Run order	Factors			
	A: Omega3(%)	B: Storage Time(day)	C: SOR (%)	D: Surfactant type
۱	۷۵	۲۴/۶	۳۰۰	SC
۲	۵۲/۷۵	۹/۲۶	۹۱/۴۳	T80
۳	۵۰	۳۸/۱۷	۱۵۵	T20
۴	۶۵	۱	۱۰	SC
۵	۵۰	۳۸/۱۷	۱۵۵	T20
۶	۷۵	۶۰	۳۰۰	T80
۷	۲۵	۶۰	۲۷۶/۸	T80:20
۸	۷۵	۳۰/۵	۱۰	T80
۹	۲۵	۶۰	۱۰	T80
۱۰	۷۵	۶۰	۶۸	SC
۱۱	۲۵	۱	۱۰	T20
۱۲	۷۵	۱	۱۳۴/۷	T80:20
۱۳	۵۲/۷۵	۹/۲۶	۹۱/۴۳	T80
۱۴	۲۵	۱	۱۰	T80
۱۵	۲۵	۳۶/۴	۱	SC
۱۶	۷۵	۱	۳۰۰	T80
۱۷	۷۱/۲۵	۶۰	۱۰	T80:20
۱۸	۲۵	۳۰/۵	۳۰۰	T80
۱۹	۲۵	۱	۲۴۲	SC
۲۰	۲۵	۱	۱۰	T80:20
۲۱	۷۱/۷۵	۳۷/۸۷	۱۶۱/۰۵	T80:20
۲۲	۲۵	۵۰	۳۰۰	T20
۲۳	۴۳/۶۰	۵۸/۸۲	۱۰	T20
۲۴	۲۵	۱	۱۰	T80:20
۲۵	۷۵	۶۰	۱۰	T20
۲۶	۵۰	۳۸/۱۷	۱۵۵	T20
۲۷	۴۰/۹۵	۱	۱۷۴/۰۴	T20
۲۸	۷۵	۱	۳۰۰	T20
۲۹	۲۵	۳۰/۵	۳۰۰	T80
۳۰	۴۷	۱	۳۰۰	T80:20
۳۱	۵۶/۰۷	۵۴/۱	۳۰۰	T80:20
۳۲	۳۵/۲۵	۶۰	۳۰۰	SC

نتایج و بحث

انتخاب مدل کارآمد به منظور پیشگویی پاسخ

در این آزمایشات از روش های آماری و تحلیلی برای تعیین پارامترهای تاثیر گذاری که بیشترین اثر بر روی متغیرهای پاسخ (خواص مورد نظر) دارند استفاده شده، روش سطح پاسخ^۱ (RSM) از روش های پیشرفته برای تحلیل و مدل سازی داده ها است که دارای روش های گوناگونی برای طراحی آزمایشی می باشد. در روش سطح پاسخ به ازای هر متغیر وابسته مدل رگرسیونی چند متغیره ای تعریف می شود که تاثیر خطی، درجه دوم و متقابل متغیرهای مستقل را بر روی هر متغیر وابسته بیان می کند (Joglekar & May 1987). مدل های بدست آمده از آنالیز داده های واقعی در جدول ۲ نشان داده شده است. ضرایب مربوط به مدل های رگرسیونی و نتایج آنالیز واریانس برای هر یک از متغیر های تابع در جداول ۲ و ۳ استخراج گردید. برای بررسی صحت مدل ها از تست عدم برازش، ضرایب تبیین R^2 و تبیین اصلاح شده $Adj R^2$ استفاده گردید. از نظر آماری مدلی مناسب است که عدم برازش^۲ آن معنی دار نبوده و دارای بالاترین مقادیر R^2 و $Adj R^2$ باشد. هر چه عدد R^2 به یک

1. Response Surface Methodology
2. Lack of fit

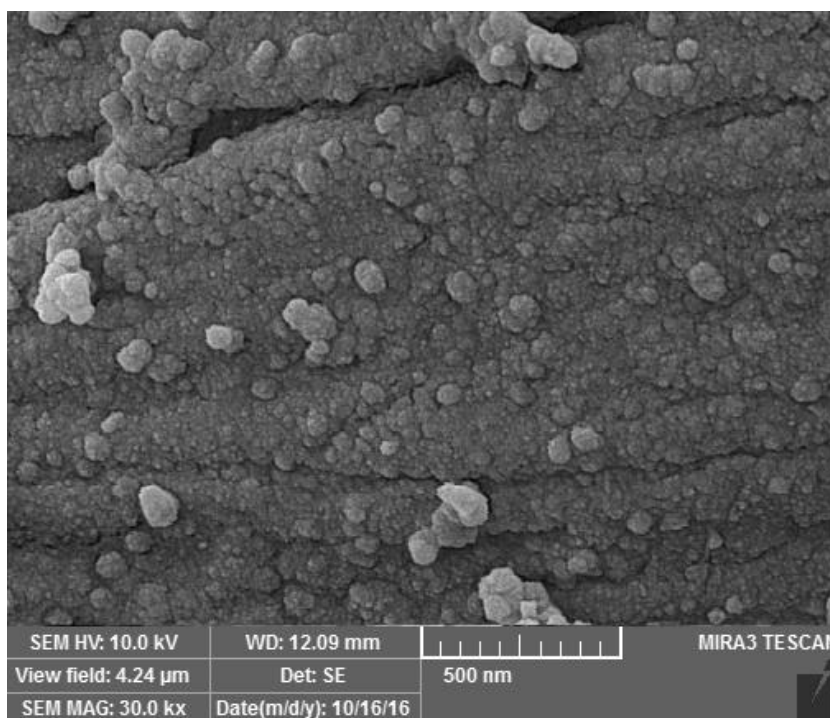
نزدیک تر باشد قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می باشد.

مطالعه مورفولوژی پلی آنیلین سنتز شده

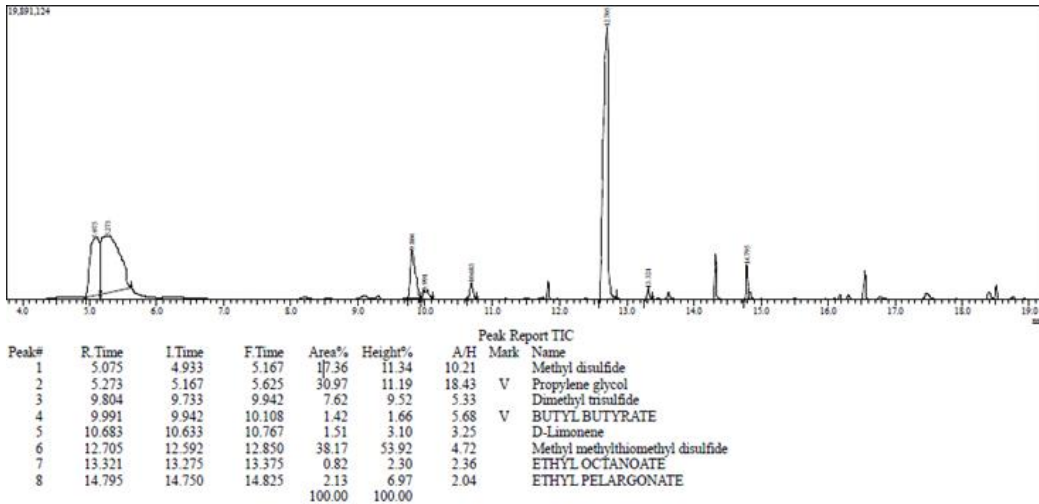
مورفولوژی و اندازه ذرات پلی آنیلین پوشیده شده بر روی فیبر پلی استر بوسیله تکنیک میکروسکوپ الکترون روبشی بررسی شد. شکل ۲ مورفولوژی و اندازه ذرات پلی آنیلین را نشان می دهد. نتایج بدست آمده نشان دادند که ذرات پلیمری به شکل دانه ای و به طور یکنواخت بر روی بستر پلی استری تشکیل شده اند. اندازه ذرات سنتز شده در حدود ۵۰ تا ۱۵۰ نانومتر می باشند که این مسئله از روی تصاویر میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است.

آنالیز گازکروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی اسانس موسیرایرانی

بر اساس آنالیز اسانس موسیرایرانی با استفاده از دستگاه GC-mass (GCMS-QP2010 SE) (شکل ۳) عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس موسیرایرانی شامل Methyl Propylene glycol (۳۸/۱۷٪)، methylthiomethyl disulfide Dimethyl (۳۰/۹۷٪)، Methyl disulfide (۱۷/۳۶٪)، Ethyl Pelargonate، و ترکیبات کم مقدار D-Limonene بوده است.



شکل ۲. کروماتوگرام مواد فرار استخراج شده بوسیله فیبر پلی آنیلین



شکل ۳. آنالیز کروماتوگرافی گازی-اسپکتروفتومتری جرمی اسانس موسیر ایرانی

جدول ۲ مدل های رگرسیونی

Regression equation	Model Summary
$\text{Total peak area} = 432/7234 - 131/1234 \times A + 349/0.167 \times B - 397/7478 \times C + 255/3293 \times D_1 - 274/3674 \times D_2 + 178/0.496 \times D_3 + 199/3496 \times AB + 190/7255 \times AD_1 + 181/4071 \times AD_2 - 334/9104 \times AD_3 + 436/9326 \times B^2 + 426/5936 \times C^2$	R-sq=0/920 R-sq(adj)=0/864
$\text{Total peak height} = 156/9531 - 20/3318 \times A + 49/9267 \times B - 72/7098 \times C + 17/3618 \times D_1 - 47.73236795 \times D_2 + 25/8087 \times D_3 - 56/9666 \times AB - 1/1733 \times BD_1 + 66/4986 \times BD_2 - 79/1359 \times BD_3 + 61/3883 \times CD_1 + 43/9940 \times CD_2 - 50/1679 \times CD_3 - 66/5751 \times A^2 + 83/6785 \times B^2$	R-sq=0/953 R-sq(adj)=0/91
$\text{Encapsulation Efficiency(\%)} = 78/4728 - 4/4182 \times B + 6/2417 \times C - 6/8671 \times D[1] + 2/6155 \times D_2 - 0/3663 \times D_3 - 12/1533 \times C^2$	R-sq=0/865 R-sq(adj)=0/84

A=Omega3 (%) B=storage time (day) C=SOR (%) D= Surfactant type (D1=SC, D2=T80, D3=T20, D4=T80:T20)

جدول ۳. ضرایب آنالیز واریانس

راندمن درون پوشانی		Total hight		Total area		مدل
Prob > F	F Value	Prob > F	F Value	Prob > F	F Value	
< 0/0001	26/74	< 0/0001	21/878	< 0/0001	16/430	مرجع
		0/3054	5/633	0/3054	1/116	A
< 0/0001	23/96	< 0/0001	41/748	< 0/0001	33/085	B
< 0/0001	53/005	< 0/0001	72/586	< 0/0001	58/127	C
< 0/0001	9/90	< 0/0001	13/9239	0/0016	7/887	D
		< 0/0001	36/184	0/0066	9/567	AB
		< 0/0001	14/491	0/0437	3/350	AD
		< 0/0001	16/451			BD
		0/0004	19/849			CD
		< 0/0001	36/945	0/0008	13/703	A2
0/0002	43/75			0/0039	11/148	B2
0/7196	0/73	0/127		0/1535	2/565	C2
						عدم برآش

A =Omega3 (%) B=storage time (day) C=SOR (%) D= Surfactant type

میشود. نتایج حاصل از جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) نشان می‌دهد که مدل نهایی ارائه شده در جدول ۲ دارای ضریب تبیین 0/865 و ضریب تبیین اصلاح شده 0/833 و دارای تست

راندمن درون پوشانی حفظ و نگهداشت ترکیبات بیواکتیو انکپسوله شده در طی مراحل تولید و نگهداری یکی از فاکتورهای مهم محسوب

فرمولاسیون نانوامولسیون های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم را بر این اساس می توان توضیح داد، به دلیل اینکه سورفاکتانت کازئینات سدیم درشت مولکول بوده و همچنین سورفاکتانت مذکور دارای ساختار ناهمگون می باشد، مولکول ها آن بصورت کاملاً متراکم و فشرده در لایه بین سطحی قرار نمی گیرند و زنجیرهای های بلند اسیدهای آمینه مختلف باهم تداخل کرده و از کنارهم چیده شدن متراکم مانع می کند و منجر به ایجاد منافذی در غشای سطحی می گردد که ترکیبات اسیدهای چرب امگا سه احتمال خروج و ترک ساختار نانوحامل به بیرون را بیشتر میکند که این پدیده تاثیر منفی بر راندمان درونپوشانی دارد (Walker *et al.*, 2015).

شکل ۵ تاثیر تک فاکتوره درصد SOR بر راندمان درون پوشانی را در مقادیر ثابت میانی سه فاکتور مقدار امگا سه، مدت زمان نگهداری و درصد SOR را نشان میدهد. در تمامی نمونه های نانوامولسیونی افزایش در غلظت سورفاکتانت تا ۱۵۵٪ (SOR=۱۵۵٪) به طور معنی داری سبب افزایش راندمان درون پوشانی شد در حالیکه با افزایش بیشتر سورفاکتانت (بیش از ۱۵۵٪) راندمان درون پوشانی کاهش یافت. نتیجه تحقیقات پیشین نیز حاکی از افزایش راندمان درون پوشانی با افزایش مقدار سورفاکتانت است (Surh *et al.*, 2017). شایان ذکر است که افزایش در غلظت سورفاکتانت سبب کاهش در اندازه ذرات می گردد که منجر به توزیع بهتر ذرات درون نانوامولسیون گردیده و همچنین با افزایش غلظت سورفاکتانت برهم کنش های آگریز میان گروهها دم هیدروفوب سورفاکتانت ها با ترکیبات زیست فعال لیپوفیل بیشتر گردیده و در نتیجه به میزان بیشتر در ساختار درونی نانوامولسیون های باقی می ماند بنابراین منجر به افزایش راندمان درونپوشانی می گردد در حالیکه با افزایش بیشتر غلظت سورفاکتانت، بخشی از آنها به جای قرارگرفتن در سطح، در توده قرار می گیرد و میسلهای سورفاکتانت تشکیل شده که باعث افزایش فشار اسمزی محلی در سیستم می شود در نتیجه فاز پیوسته بین قطرات به این مکان منتقل می گردد و موجب انبوهش (فلوکولاسیون) ناشی از تهی شدن فاز پیوسته بین دو قطره می گردد و بخشی از ترکیبات آگریز از ساختار نانوامولسیون خارج می گردد و سبب کاهش در راندمان درون پوشانی می شود.

ریزاستخراج فاز جامد با روش فضای فوقانی

یکی از تکنیک های پرکاربرد در تعیین پایداری اکسیداتیوی امولسیون ها و ارزیابی کمی ترکیبات حاصل از اکسیداسیون تکنیک ریزاستخراج فاز جامد با روش فضای فوقانی با دستگاه

عدم برازش غیر معنی دار بوده که بیانگر معنی دار بودن مدل فوق می باشد و قادر است به طور رضایت بخش راندمان درون پوشانیرا در نمونه ها توجیه کند. بر اساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) تاثیر خطی همه فاکتورهای مستقل بجز غلظت امگا سه و تاثیر درجه دوم درصد SOR در راندمان درون پوشانیمعنی دار بودند. از بین اثرات خطی، درصد SOR بیشترین ضریب و بالاترین تاثیر را داراست. میزان آنکپسولاسیون امولسیون ها در محدوده ۵۲٪ (فرمولاسیون های حاوی کازئینات سدیم در پایین ترین درصد SOR) تا ۸۷٪ (فرمولاسیون های حاوی T80:20 در بالاترین درصد SOR) بوده است. شکل ۴ تاثیر تک فاکتور نوع سورفاکتانت بر راندمان درون پوشانی را نشان می دهد. بیشترین راندمان درون پوشانی (بیشتر از ۸۰٪) مربوط به نانوامولسیون های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰:۲۰ و توئین ۸۰ بوده است و کمترین میزان راندمان درون پوشانی (۷۰٪) مربوط به نانوامولسیون های حاوی سورفاکتانت سدیم کازئینات بوده است. در مطالعات پیشین این روند مشاهده و گزارش شده است. Ton *et al* (2016) نیز در مطالعات خود در بررسی میکروانکسولاسیون روغن دانه Rambutan حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع با کازئینات سدیم، ایزوله پروتئین آب پنیر و ایزوله پروتئین سویا گزارش کردند که بیشترین راندمان درون پوشانی و اثر محافظتی از هسته هیدروفوب توسط امولسیفایرهای ایزوله پروتئین آب پنیر بوده و کمترین راندمان درون پوشانی مربوط به کازئینات سدیم بوده است. همچنین Jimenez *et al* (2006) با مطالعه بر روی تولید هگزانال در طی نگهداری میکروانکسولاسیون لینولئیک اسید با مواد دیواره ای صمغ عربی و پروتئین آب پنیر، گزارش نمودند که پروتئین آب پنیر سبب محافظت بالاتری از فرایند اکسیداسیون اسید لینولئیک نسبت به صمغ عربی داشته است.

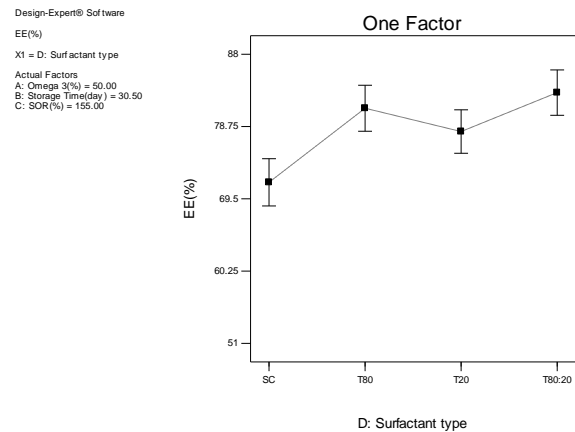
Drusch *et al* (2007) نیز با مطالعه بر روی پایداری اکسیداتیوی روغن ماهی آنکپسوله شده با پروتئین ها و صمغ عربی را بررسی نمودند که کاهش در راندمان درون پوشانی در مواد دیواره ای پروتئینی را نتیجه گرفتند. این پدیده می توان بدلیل وجود سورفاکتانت کافی برای پوشاندن کامل سطح ذرات روغن - آب در نانوامولسیون های حاوی سورفاکتانت های ریزمولکولی (توئین ها) باشد که منجر به کاهش کشش سطحی شد و ذرات ریزتر تولید گردید و این پوشش های حاوی سورفاکتانت ها به منزله یک سد محافظتی کارآمد از خروج اسیدهای چرب امگا سه به فاز پیوسته مانع به عمل می آورد و باعث نگهداری ترکیبات زیست فعال در ساختار نانوحامل می گردد. اما راندمان درون پوشانی کمتر

برازش معنی دار نبوده که بیانگر این است که مدل مناسب می باشد. براساس جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) تاثیر خطی همه فاکتورهای مستقل بجز غلظت امگا سه و تاثیر درجه دوم درصد SOR و مدت نگهداری و تاثیر برهم کنش امگا سه در مدت زمان نگهداری و امگا سه در نوع سورفاکتانت در راندمان درون پوشانی معنی دار بودند. از بین اثرات خطی، درصد SOR بیشترین ضریب و بالاترین تاثیر را دارا بوده است.

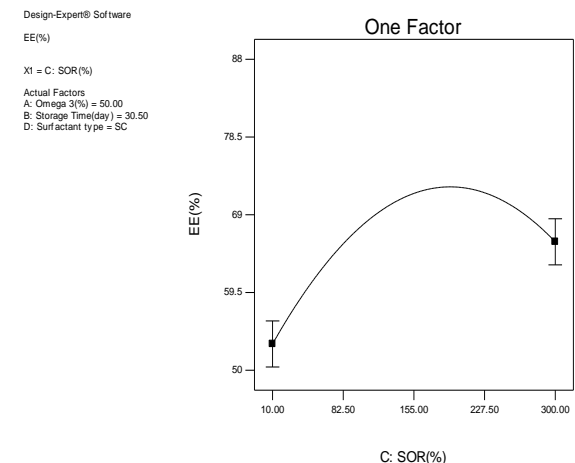
شکل ۶ برهم کنش پمقدار امگا سه و نوع سورفاکتانت بر پاسخ مجموع سطح زیر پیک ها در مقادیر ثابت دو پارامتر دیگر را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود با افزایش مقدار امگا سه، مجموع سطح زیر پیک در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰ و توئین ۸۰:۲۰ کاهش نشان داد. کمترین مجموع سطح زیر پیک در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰ در مقادیر بالای امگا سه مشاهده گردید، نمونه های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و کازئینات سدیم تاثیر معنی داری نداشتند. در حقیقت، روش HS- SPME میزان ترکیبات فرار موجود در فضای فوقانی که بر سطح فیبر نانو پلیمری جذب می شوند را اندازه گیری می کند، با توجه به اینکه تکنیک درون پوشانی باعث پوشاندن و محافظت ترکیبات بیواکتیو در مقابل عوامل مخرب شیمیایی و محیطی می شود لذا دور از انتظار نیست که با تولید نانوامولسیون ها و درون پوشانی، ترکیبات فرار کمتری در فضای فوقانی تجمع کنند که منجر به کاهش سطوح زیر پیک ها گردد، نکته قابل توجه این است که ترکیبات فرار موجود در فضای فوقانی متشکل از مجموع ترکیبات فرار موجود در اسانس موسیر ایرانی و ترکیبات فرار ناشی از اکسیداسیون امگا سه می باشد (Burt 2004).

بررسی نمودارهای کروماتوگرام سطح زیر پیک نانوامولسیون ها حاکی از کمتر بودن سطح زیر پیک ها است که موید کاهش ترکیبات فرار تجمع یافته در فضای فوقانی می باشد که می تواند به دلیل وجود لایه های سطحی محافظت کننده سورفاکتانت ها توجیه شود، بدین ترتیب میزان ترکیبات فرار کمتری در سطح فوقانی تجمع کرده است، لذا نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از آزمون راندمان درونپوشانی مطابقت داشتند. این موضوع از مقایسه نتایج راندمان درونپوشانی با نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرامها کاملا مشهود بود. قابل ذکر است که همه امولسیون ها درمقایسه با نمونه شاهد (نمونه اسانس موسیر ایرانی بدون انکپسوله شدن) سطح زیر پیک کمتری را نشان دادند همچنین Dias *et al* (2012) در پژوهش خود به بررسی روش SPME برای ردیابی محصولات ناشی از اکسیداسیون پرداختند، آنها اظهار داشتند که نمونه های نانوامولسیون

گازکروماتوگرافی از طریق اندازه گیری ترکیبات جذب شده بر سطح فیبر های مورد استفاده می باشد، این تکنیک همچنین به عنوان روش مکمل برآورد راندمان درون پوشانینیز استفاده می شود (Jirovetz *et al.*, 2002).



شکل ۴. تاثیر تک فاکتور نوع سورفاکتانت بر راندمان درون پوشانی

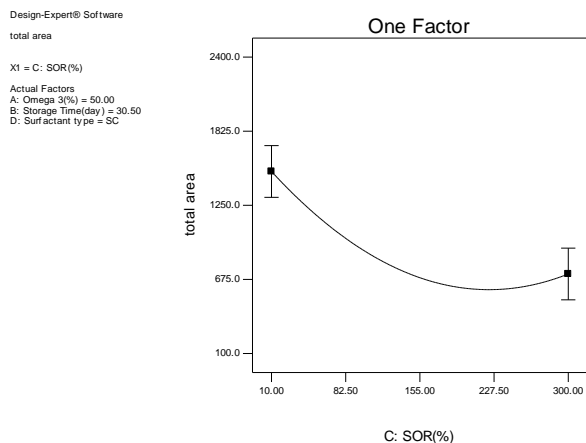


شکل ۵. تاثیر تک فاکتور SOR % بر راندمان درون پوشانی

تاثیر پارامترها مستقل بر مجموع سطوح زیر پیک ها

به منظور بررسی تاثیر ۴ فاکتور مستقل (میزان امگا سه، زمان نگهداری، درصد SOR و نوع سورفاکتانت) بر مجموع سطح زیر پیک کروماتوگرام امولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مدل های خطی، درجه دوم، اثر متقابل و مکعبی برای برازش داده های حاصل از آزمایش سطوح زیر پیک ها مورد استفاده قرار گرفتند. در میان مدل های مذکور مدل درجه دوم چند متغیره مطابق جدول ۲ به صورت مناسبی برازش داده شد، ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۲۰ و ۰/۸۶۴ بودند. به منظور اطمینان از صحت مدل انتخاب شده مطابق جدول آنالیز واریانس مربوطه شاخص عدم

مطالعه خود گزارش کردند که استفاده از ترکیبات پروتئینی برای انکپسولاسیون ترکیبات فرار، سبب برقراری برهم کنش هایی میان پروتئین ها و ترکیبات فرار شده و مانع از نفوذ ترکیبات فرار به بیرون گردید.

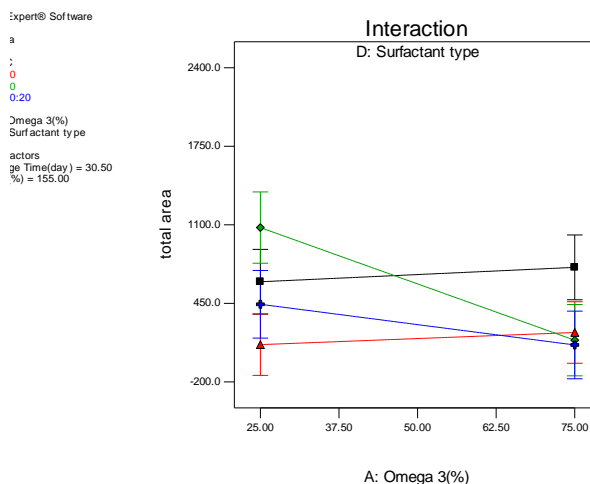


شکل ۷. نمودار تاثیر تک فاکتور SOR% در مقادیر میانی ثابت پرامترهای دیگر بر مجموع سطح زیر پیک ها

شکل ۸ کانتور پلات دوبعدی تاثیر میزان امگا سه و مدت نگهداری در مقادیر ثابت درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر مجموع سطح زیر پیک ها را نشان میدهد. همانطور که مشاهده می شود افزایش مدت زمان نگهداری و مقدار امگا سه به طور معنی داری باعث افزایش سطح زیر پیک ها شده است. علت این پدیده را میتوان اینگونه توجیه کرد که از آنجاییکه مقدار امگا سه بخشی از فاز روغنی محسوب میشود، افزایش در مقدار امگا سه سبب افزایش در مقدار فاز روغنی گردیده است، به طوریکه در غلظت های بالاتر فاز روغنی مقدار سورفاکتانت در نمونه های نانومولسیون کاهش می یابد، بنابراین هرچه غلظت سورفاکتانت کمتر باشد، مقدار سورفاکتانت کافی برای پوشاندن کامل سطح ذرات چربی وجود ندارد و نواحی از سطح ذرات سورفاکتانت خواهد بود و در نتیجه احتمال خروج ترکیبات فرار اسانس موسیر ایرانی از ساختار درونی نانومولسیون از مناطق تهی از سورفاکتانت وجود دارد و منجر به تجمع ترکیبات فرار در فضای فوقانی خواهد شد. از طرف دیگر ذرات دارای حرکت براونی (حرکت تصادفی) بوده و تمایل دارند بطور تصادفی در سرتاسر سیستم پراکنده شوند، این ذرات در حین حرکت بطور مکرر با ذرات مجاور خود برخورد می کند، اگر در حین برخورد ناگهانی مناطق تهی از سورفاکتانت در مجاور هم قرار بگیرند امکان اتصال و افزایش در اندازه ذرات را سبب میشود.

دلیل دیگری که میتوان برای این رفتار متصور شد، وجود منافذ و فضاهای بدون سورفاکتانت در سطح ذرات چربی سبب میشود که فرایند اکسیداسیون رخ دهد و ذرات چربی در

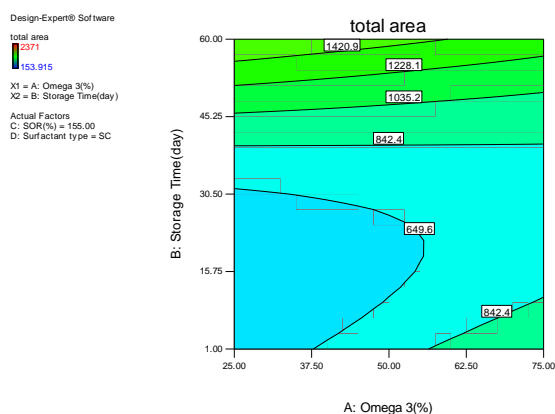
بتاکاریوفیلین در مقایسه با نمونه شاهد بتاکاریوفیلین تحت شرایط اکسیداسیونی یکسان، مجموع سطح زیر پیک کمتری نشان داده شد. Takeungwongtrakul & Benjakul (2012) میکروانکپسولاسیون روغن میگو با ترکیبات دیواره ای کازئینات سدیم، پروتئین آب پنیر و سیروپ گلوکز را مورد بررسی قرار دادند، براساس گزارش آنها افزایش ترکیبات آلدئیدی ناشی از اکسیداسیون چربی (هگزنال) که مسول بدطعمی روغن میگو می باشد توسط روش HS-SPME-GC شناسایی کردند.



شکل ۶. نمودار برهم کنش تاثیر مقدار امگا سه و نوع سورفاکتانت بر مجموع سطح زیر پیک ها

شکل ۷ نمودار تک فاکتور درصد SOR در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم بر مجموع سطح زیر پیک در مقادیر میانی ثابت پرامترهای مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری را نشان داده است. کاهش در سطح زیر پیک با افزایش درصد SOR مشاهده گردید. همانطور که در قبل ذکر شد، افزایش غلظت سورفاکتانت، با کاهش بیشتر کشش سطحی در محیط، سبب کاهش اندازه ی قطرات شود و سبب تولید ذرات با اندازه کوچکتر می شود از طرف دیگر افزایش غلظت سورفاکتانت موجب میشود تا تعداد مولکول های بیشتری از سورفاکتانت از فاز روغنی به فاز آبی پخش شوند و تولید ذرات ریز امولسیون آسانتر گردد بنابراین ذرات کوچکتر توانایی ممانعت از خروج ترکیبات فرار در فضای فوقانی بالاتری نسبت به ذرات بزرگتر خواهند داشت این نتایج کاملا با نتایج تحقیقات Dickinson & Golding (1997) و Reineccius (1989) مشاهده شد که اندازه ذرات در حفظ ترکیبات تاثیر بسزایی داشته است و ذرات بزرگتر قدرت نگهداری ترکیبات فرار کمتری دارند. Bylait et al (2001) در

(۰/۹۵۳) و ضریب تبیین اصلاح شده (۰/۹۱) مربوط به مدل‌ها می‌توان دریافت که مدل چند جمله‌ای درجه دوم مدلی کارآمد محسوب می‌شود. نتایج حاصل از آنالیز واریانس (جدول ۳) بیانگر تاثیر خطی همه فاکتورهای مستقل بجز غلظت امگا سه و تاثیر درجه دوم امگا سه و مدت نگهداری و تاثیر برهم کنش امگا سه در مدت زمان نگهداری، مدت نگهداری در درصد SOR و درصد SOR در نوع سورفاکتانت در مجموع ارتفاع پیک‌ها معنی‌دار بودند. از بین اثرات خطی، درصد SOR بیشترین ضریب و بالاترین تاثیر را دارا بوده است.



شکل ۸. کانتورپلات دو بعدی مقدار امگا سه و مدت نگهداری بر مجموع سطح زیر پیک‌ها

شکل ۹ مجموع ارتفاع کلی پیک‌ها را نسبت به مدت نگهداری و نوع سورفاکتانت را نشان می‌دهد. با افزایش مدت زمان نگهداری، مجموع ارتفاع پیک‌ها ابتدا کاهش و سپس افزایش یافته است، کمترین ارتفاع پیک‌ها در ابتدای دوران نگهداری و در نانوامولسیون‌های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ مشاهده گردید. براساس نتایج بدست آمده می‌توان بیان داشت که توئین ۸۰ یک سورفاکتانت مناسب برای تولید امولسیون به روش کم انرژی بوده است، حضور باند دو گانه استرولنات ($c18=1$) در زنجیره آبگریز در توئین ۸۰ منجر به تحرک بالاتر نسبت به سورفاکتانت‌های دیگر می‌گردد. تحرک بیشتر سورفاکتانت‌های غیراشباع نسبت به انواع اشباع می‌تواند علت این رفتار باشد که سبب تسهیل تشکیل خودبه‌خودی امولسیون می‌شود و در نتیجه ذراتی با اندازه کوچکتر تولید می‌گردد، همانطور که قبلاً گفته شد هر چه اندازه ذرات کوچکتر باشد، نشت ترکیبات بیواکتیو به خارج از ساختار نانوامولسیون کمتر می‌شود و تجمع آنها در فضای فوقانی کاهش می‌یابد در نتیجه منجر به کاهش مجموع پیک کروماتوگرام می‌شود و همچنین به دلیل پوشش دهی کامل سطح بینابین توسط سورفاکتانت

دسترس عوامل پراکسیدان قرار گیرد لذا ترکیبات حاصل از اکسیداسیون به همراه ترکیبات فرار اسانس موسیر ایرانی در سطح فیبر جمع آوری گردد که این پدیده سبب افزایش سطح زیر پیک می‌گردد. این نتایج، علاوه بر اینکه نتایج حاصل از راندمان درون پوشانی را تایید می‌کند، از طرفی حاکی از وجود ارتباط مستقیم میان سطح زیر پیک‌ها با اندازه ذرات می‌باشد. با توجه به داده‌های بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزایش در اندازه ذرات باعث افزایش سطح زیر پیک‌ها گردید که می‌تواند بیانگر راندمان کمتر درون پوشانی باشد. در پژوهش مشابهی *LIM et al.* (2012) اظهار کردند که هر چه فاز روغنی موجود در انکپسولاسیون بیشتر باشد، مقدار روغن سطحی ذرات افزایش یافته در نتیجه راندمان درون پوشانی کاهش بیشتری نشان داد. از طرف دیگر با گذشت مدت نگهداری، منجر به افزایش سطح زیر پیک‌ها گردید، قدرت امولسیون‌ها برای نگهداری ترکیبات فرار کاهش یافت این نتایج با نتایج پژوهش‌های *Augustin et al.*; *Jimenez et al.*, 2016 و *Drusch et al.*, 2009a⁴, 2006 مطابقت داشت. به نظر می‌رسد افزایش رشد ذرات به دلیل مکانیسم‌های ناپایدارکننده نانوامولسیون‌ها مانند انبوهش و رسیدگی استوالد در طی مدت زمان نگهداری رخ داده است (*Pezeshky et al.* 2016) و همانطور که قبلاً ذکر گردیده است افزایش اندازه ذرات منجر به خروج بیشتر ترکیبات فرار و جذب بیشتر آنها بر سطح فیبر نانوپلیمری می‌شود. نتایج بدست آمده با نتایج مطالعه *Dickinson & Golding* (1997) مطابقت داشت.

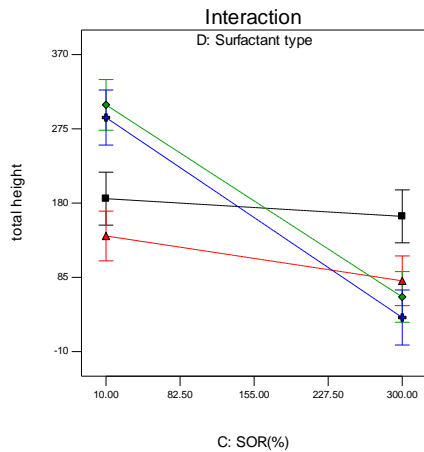
Helena et al. (2013) راندمان درون پوشانیو پایداری اکسیداتیوی میکروانکپسولاسیون روغن بذر کتان با ترکیبات صمغ عربی، پروتئین آب پنیر، نشاسته اصلاح شده و مالتو دکسترین مورد بررسی قرار دادند، آنها گزارش کردند که تعداد پیک‌ها و سطح زیر پیک‌های گاز کروماتوگرافی فضای فوقانی (عمدتاً ترکیبات هگزانال و پروپانال) حاصل از اکسیداسیون کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دادند. *Karthik & Anandharamakrishnan* (2013) گزارش نمودند با افزایش ۲۱ روز نگهداری اندازه ذرات نانوامولسیون روغن ماهی تثبیت شده با کازئینات سدیم به ۲۰۶ نانومتر افزایش یافت.

تاثیر پارامترها مستقل بر مجموع ارتفاع پیک

با توجه به جدول آنالیز واریانس آزمون عدم برازش مربوط به مدل برازش یافته بر متغیر وابسته مجموع ارتفاع پیک‌ها معنی‌دار نبوده است. همچنین مطابق جدول ۲ مقادیر ضریب تبیین

توئین ۸۰ و اتصال میان بخش های آبگریز سورفاکتانت با هسته هیدروفوب باعث حفظ بالای ماده بیواکتیو در ساختار نانوحامل می شود و از دسترسی عوامل اکسیداسیون به ذرات چربی ممانعت بعمل می آید (Saberi et al., 2013).

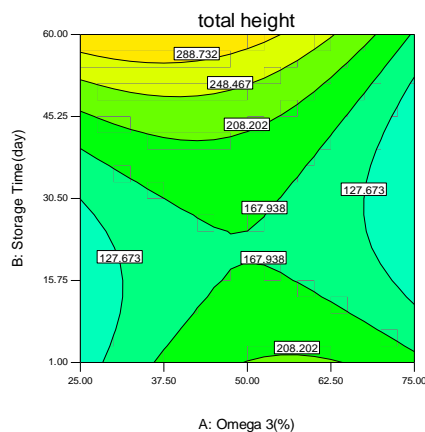
Design-Expert® Software
total height
■ D1 SC
▲ D2 T80
● D3 T20
● D4 T80:20
X1 = C: SOR(%)
X2 = D: Surfactant type
Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
B: Storage Time(day) = 30.50



شکل ۱۰. نمودار برهم کنش % SOR و نوع سورفاکتانت بر مجموع ارتفاع پیک ها

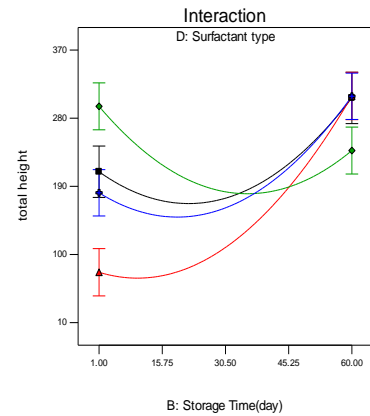
شکل ۱۱ کانتور پلات دو بعدی میزان امگا سه و مدت نگهداری بر مجموع ارتفاع پیک ها در مقادیر ثابت دو فاکتور دیگر را نشان داده است. با افزایش مدت نگهداری و افزایش میزان امگا سه ارتفاع پیک ها افزایش معنی داری داشته است. کمترین ارتفاع پیک ها زمانی حاصل می شود که میزان امگا سه و مدت نگهداری در پایین ترین سطح قرار بگیرند، در این نمونه ها میزان راندمان درون پوشانی بیشتر بوده است این نتایج با نتایج Charoen et al (2012) مطابقت داشت. Baranauskien et al (2006) به بررسی رهایش آروما از اسانس های پونه، سنبل هندی و مرزنجوش با روش ریز استخراج با فازجامد از فضای فوقانی پرداختند. ترکیبات فرار استخراج شده با روش فوق در نمونه های انکپسوله شده بطور معنی داری کمتر از نمونه های شاهد بودند. Kim et al (1996) گزارش دادند که پوشش دهی ترکیبات فرار باعث حفظ و نگهداری آنها در برابر آسیب های شیمیایی در طی تولید، نگهداری و حمل و نقل گردید.

Design-Expert® Software
total height
388.97
15
X1 = A: Omega 3(%)
X2 = B: Storage Time(day)
Actual Factors
C: SOR(%) = 155.00
D: Surfactant type = SC



شکل ۱۱. کانتور پلات دو بعدی مقدار امگا سه و مدت نگهداری بر مجموع ارتفاع پیک

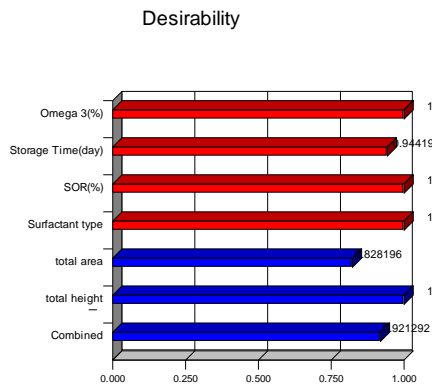
Design-Expert® Software
total height
■ D1 SC
▲ D2 T80
● D3 T20
● D4 T80:20
X1 = B: Storage Time(day)
X2 = D: Surfactant type
Actual Factors
A: Omega 3(%) = 50.00
C: SOR(%) = 155.00



شکل ۹. نمودار برهم کنش مدت نگهداری و نوع سورفاکتانت بر مجموع ارتفاع پیک ها

شکل ۱۰ تاثیر برهم کنش درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر مجموع ارتفاع پیک ها را نشان میدهد، قابل پیش بینی بود که با افزایش درصد SOR در انواع سورفاکتانت ها کاهش معنی داری در ارتفاع پیک ها مشاهده شده است. کمترین ارتفاع پیک ها در مقادیر کمتر SOR در فرمولاسیون های حاوی توئین ۸۰ و در مقادیر بالای SOR در فرمولاسیون های حاوی توئین ۲۰ بوده است. در کامی توان نتیجه گرفت، سورفاکتانت های کوچک مولکولی (توئین ها) نسبت به سورفاکتانت درشت مولکولی (کازئینات سدیم) از توانایی و سرعت بیشتری برای پوشاندن سطح ذرات برخوردار هستند و این رفتار سبب نگهداری بالاتر ترکیبات بیواکتیو فرار در درون ساختار نانوحامل ها می گردد علاوه بر این به علت متراکم تر بودن مولکولهای سورفاکتانت کوچک مولکولی در لایه بین سطحی مانع نفوذ عوامل پراکسیدان مانند فلزات واسطه، نور، اکسیژن به درون هسته لیپوفیل می شود و از تجمع ترکیبات حاصل از اکسیداسیون در فضای فوقانی به همراه ترکیبات فرار اسانس موسیر ایرانی جلوگیری می شود بنابراین ترکیبات فرار کمتری بر سطح فیبر پلی آنیلین جذب میگردد، لذا انتظار میرفت که مجموع ارتفاع پیک ها نسبت به فرمولاسیون های دیگر و نمونه کنترل کاهش زیادی داشته باشد. نتایج حاصل از آنالیز مجموع ارتفاع پیک با نتایج آنالیز مجموع سطح زیر پیک ها همخوانی دارند.

(جدول ۴) مقدار سطح زیر پیک (۵۳۴/۹)، ارتفاع پیک (۱۵) و راندمان درون پوشانی (۷۸/۳٪) بدست آمد. درجه مطلوبیت این پژوهش ۰/۹۲ بوده است.



شکل ۱۲. نمودار مطلوبیت بهینه سازی پارامترها

بررسی و تصدیق شرایط بهینه پیش بینی شده

به منظور ارزیابی مدل ها و تایید کردن صحت شرایط بهینه سازی پیش بینی شده، ترکیب بهینه متغیرها باید مورد آزمایش قرار می گرفت. بدین منظور نمونه هایی مطابق شرایط ذکر شده در جدول ۴ در پنج تکرار تهیه و مورد آزمایش قرار گرفتند. در جدول ۴ مقایسه میانگین اعداد آزمایش شده و پیش بینی شده، نشان میدهد که مدل های ساخته شده معتبر و قابل استناد می باشند.

جدول ۴. شرایط بهینه

Factor	Goal	Predicted value	Expremental value
EE(%)	maximize	۷۸/۵	۷۷
Total area	minimize	۵۳۴/۹	۵۲۷/۸۷
Total height	minimize	۱۵	۱۶/۵

نتیجه گیری کلی

تکنیک HS-SPME روشی سریع، ارزان، عاری از حلال، قابل حمل و نسبتاً مستقل از طراحی پیچیده دستگاهی برای استخراج ترکیبات فرار می باشد. این تکنیک به عنوان روش تکمیلی برای اندازه گیری راندمان درون پوشانی بکار برده شد و تطابق بالایی میان نتایج هر دو آزمون مشاهده شد. نانوامولسیون ها سبب پوشاندن ترکیبات فرار گردید و مانع از نفوذ عوامل اکسیداسیون بدرون هسته هیدروفوب شده لذا منجر به کاهش تشکیل ترکیبات فرار حاصل از اکسیداسیون تجمع یافته در فضای فوقانی شده و در نتیجه کاهش مجموع سطح زیر پیک و ارتفاع پیک ها می گردد. مقادیر بهینه اجرای امولسیون متغیرهای مستقل میزان امگا سه (۷۵٪)، مدت زمان نگهداری

قابل ذکر هست که در آنالیز های کمی با کروماتوگرافی (مخصوصاً گازی) استفاده از استاندارد داخلی پاسخ های بدست آمده را تکرار پذیر و مطمئن می کند. ولی در تحقیق ارائه شده هدف آنالیز کمی نبوده است و تنها با پیگیری سطح زیر پیک ها و ارتفاع پیک ها تاثیر فاکتورهای مورد بررسی بر روی راندمان انکپسولاسیون بررسی شده است و تا حد امکان با دقت بسیار بالایی سعی شده است فاکتورهایی مانند سرعت فاز متحرک، مقدار تزریق، طول ستون و... که پارامترهای کروماتوگرافی را تحت تاثیر قرار می دهد ثابت نگه داشته شود تا موارد ذکر شده بر پاسخ های بدست آمده تاثیر معنی داری نداشته باشد. همچنین در تیمارهای مختلف پارامترهای کروماتوگرافی (مجموع سطح زیر پیک و مجموع ارتفاع پیک) بسیار متفاوت بدست آمدند که نشان داد تاثیر فاکتورهای بررسی شده بر روی پارامترهای کروماتوگرافی بسیار زیاد بوده و همین امر بررسی اثر فاکتورها بر روی ویژگی های امولسیون را راحتتر کرده و نشان داد که بدون استاندارد داخلی نیز بررسی کیفی پارامترهای کروماتوگرافی مقدور می باشد.

بهینه سازی اجزای تشکیل دهنده امولسیون

به منظور بهینه سازی پاسخ های موثر در تولید امولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه از روش تابع مطلوبیت عددی استفاده شد. در روش تابع مطلوبیت، مطلوبیت آماری بین صفر و یک است و سطح پایین آن نشان دهنده عدم دستیابی به هدف مورد نظر می باشد و سطح بالای آن نشان دهنده برآورده شدن کامل هدف مورد نظر می باشد. وقتی هدف، بهینه سازی چندین پاسخ به طور همزمان باشد، مطلوبیت هریک از پاسخ ها تعیین شده و میانگین هندسی آن ها به عنوان شاخص برآورده شدن همزمان هدف ها مورد استفاده قرار می گیرد. شرایط بهینه برای تک تک پاسخ ها را نمیتوان به عنوان الگوی مناسب در نظر گرفت. زیرا شرایط بهینه برای یک پاسخ، ممکن است برای پاسخ دیگر شرایط نامساعدی ایجاد کند. بنابراین باید شرایطی را به عنوان الگوی ساخت معرفی کرد که تا حد امکان تمامی پاسخ ها را به نحو رضایت بخشی بهینه نماید به منظور بهینه سازی توام، ابتدا اهداف بهینه سازی مشخص گردید. یعنی پارامترهای سطح زیر پیک، ارتفاع پیک در کمینه و راندمان درون پوشانی در بیشینه در نظر گرفته شدند (شکل ۱۲). مقادیر بهینه اجرای امولسیون متغیر های مستقل میزان امگا سه (۷۵٪)، مدت زمان نگهداری (۵۷ روز)، SOR(%) (۲۳۸٪) و نوع سورفاکتانت (توئین ۲۰) تعیین شدند. در این شرایط بهینه مقادیر متغیرهای وابسته

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری مدیریت شرکت آذین شوشتر (صنایع غذایی مجید) آقایان دکتر مجید قنادان و مهندس ساسان قنادان جهت انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

(۵۷ روز)، مقدار $SOR/238\%$ و نوع سورفاکتانت (توئین ۲۰) تعیین شدند. در این شرایط بهینه مقادیر متغیرهای وابسته مقدار سطح زیر پیک (۵۳۴/۹)، ارتفاع پیک (۱۵) و راندمان درون پوشانی ($78/3\%$) بدست آمد. درجه مطلوبیت این پژوهش ۰/۹۲ بوده است.

REFERENCE

- Anton, N. & Vandamme, T.F. (2009). The universality of low-energy nanoemulsification. *International Journal of Pharmaceutics*, 377, 142–147.
- Anton, N. & Vandamme, T.F. (2011). Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm. Res*, 28 (5), 978–985.
- Augustin, M.A., Sanguansri, L. & Bode, O. (2006). Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science*, 71 (2), 25–32.
- Baranauskien, P., Venskutonis, P.T. & Dewettinck, K., R. (2006). Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices, *Food Research International*, 39, 413–425.
- Bahrani, S., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H. & Sowti khiyabani, M. (2013). Nanoencapsulation of omega-3 fatty acids using caseinate-pectin based complexes: FTIR, DSC, particle size, and encapsulation efficiency, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 3, 1–15. (In Farsi)
- Brandelli, A., Brum, L. F. W. & dos Santos, J. H. Z. (2016). Nanobiotechnology methods to incorporate bioactive compounds in food packaging. In *Nanoscience in Food and Agriculture*. Springer International Publishing, 2, 27–58.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 223–253.
- Bylait, E., Venskutonis, P. R. & Mazdžierien, (2001). Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk protein based matrices. *European Food Research and Technology*, 212, 661–670.
- Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2012). Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers. *Food Chemistry*, 131(4), 1340–1346.
- Dan Su., Qixin Zhong. (2016). Lemon oil nanoemulsions fabricated with sodium caseinate and Tween 20 using phase inversion temperature method. *Journal of Food Engineering*, 171, 214–221.
- Dias, D. O., Colombo, M., Kelmann, R. G., De Souza, T. P., Bassani, V. L., Teixeira, H. F., Veiga, L., Renata, P. & Koester, S. (2012). Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil, *Analytica Chimica Acta*, 721, 79–84.
- Dickinson. E. & Golding, M. (1997). Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 11, 13–18.
- Drusch, S., Berg, S., Scampicchio, M., Serfert, Y., Somoza, V., Mannino, S. & Schwarz, K. (2009a). Role of glycated caseinate in stabilisation of microencapsulated lipophilic functional ingredients. *Food Hydrocolloids*, 23, 942–948.
- Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schimith-Hansberg, B., Schwarz, K. (2007). Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (26), 11044–11051
- Garcia-Esteban, M., Ansorena, D., Astiasaran, I. & Ruiz, J. (2004). Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*, 64, 458–466.
- Helena, C.F., Renata, V., Tonon, R.F. & Míriam, D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials, *Journal of Food Engineering*, 115, 443–451.
- Hojjati, M., Speziale, M., Noguera-Artiaga, L. & Antonio Carbonell-Barrach, A. (2015). Volatile Composition, Texture and Sensory Description of Gaz (Traditional Persian Confection). *Journal of texture studies*, 46 (6), 440–454.
- Hu, M., McClements, D.J. & Decker, E.A. (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1696–1700.
- Jalal, R., Bagheri, S.M., Moghimi, A. & Rasuli, M.B. (2007). Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 41, 218–226.
- Jimenez, M., García, H.S. & Beristain, C.I. (2006). Spray dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (14), 2431–2437.

- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B. & Geissier, M. (2002). Analysis of the headspace aroma compounds of the seeds of the Cameroonian garlic plant *Hua gabonii* using SPME/GC/FID, SPME/GC/MS and olfactometry. *European Food Resource and Technology*, 214, 212–215.
- Joglekar, A. & May, A. (1987). Product excellence through design of experiments, *Cereal Foods World*, 32, 857–868.
- Karthik, P. & Anandharamakrishnan, C. (2013). Microencapsulation of docosahexaenoic acid by spray-freeze-drying method and comparison of its stability with spray-drying and freeze-drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2780–2790.
- Kataoka, H., Itano, M., Ishizaki, A. & Saito, K. (2009). Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216(18), 3746–50.
- Kennedy, E.T., Luo, H. & Ausman, L.M. (2012). Cost implications of alternative sources of (n-3) fatty acid consumption in the United States. *Journal of Nutrition*, 142 (3), 605–609.
- Kim, Y. D., Morr, C. V. & Schenz, T. W. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: liquid orange emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1308–1313.
- Kris-Etherton, P.M., Grieger, J.A. & Etherton, T.D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids*, 81:99–104.
- Lambropoulou, D. A. & Albanis, T. A. (2002). Headspace solid-phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3359–3365.
- Lavie, C.J., Milani, R.V., Mehra, M.R. & Ventura, H.O. (2009). Omega-3 Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal American Coll Cardiol*, 54, 585–594.
- Lee, S.J. & McClements, D.J. (2010). Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. *Food Hydrocollid*, 24, 560–569.
- LIM, H.K., TAN, C.P., BAKAR, J. & NG, S.P. (2012). Effects of different wall materials on the physicochemical properties and oxidative stability of spray-dried microencapsulated red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed oil. *Food Bioprocess Technol*, 5, 1220–1227.
- Lipan, L., Hojjati, M., El-Zaaddi, H., Sánchez-Rodríguez, L. & Carbonell-Barrachina, Á.A. (2016). Volatile Composition of Smoked and Non-Smoked Iranian Rice. *Foods*, 5 (4), 1–8.
- Maki, K.C., Yurko-Mauro, K., Dicklin, M.R., Schild, A.L., and Geohas, J.G. (2014). A new, microalgal DHA and EPA containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. *Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 91, 141–148.
- Matisova, E., Medvedova, M., Vraniakova, J. & Simon, P. (2002). Optimization of solid-phase microextraction of volatiles. *Journal of Chromatography A*, 960, 159–164.
- Nam, S.K. & Dong-Sun, L. (2004). Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass Spectrometry. *J. Sep. Sci*, 27, 96–100.
- Pawliszyn, J. (1995). New directions in sample preparation for analysis of organic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 14(3), 113–122.
- Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M. & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: preparation and characterization. *Food Bioscience*, 13, 49–55.
- Rao, J. & McClements, D. J. (2013). Optimization of lipid nanoparticle formation for beverage applications: Influence of oil type, cosolvents, and cosurfactants on nanoemulsion properties. *Journal of food engineering*, 118(2), 198–204.
- Reineccius, G. A. (1989). Flavor encapsulation. *Food Reviews International*, 5, 147–176.
- Saberi, A.H., Fang, Y. & McClements, D.J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid Interface Science*, 391, 95–102.
- Sarafraz, Y. A. & Es'haghi, Z. (2005). Two-step hollow fiber-based, liquid-phase micro extraction combined with high-performance liquid chromatography: a new approach to determination of aromatic amines in water. *Journal of Chromatography A*, 1082(2), 136–142.
- Shirey, R. E. (2000). Optimization of extractions conditions and fiber selection for semivolatile analytes using solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 279–288.
- Stenson, D. F., Lee, J. H., & Min, D. B. (2002). Solid-phase microextraction of volatile soybean oil and corn oil compounds. *Journal of Food Science*, 67, 71–76.
- Surh, J., Decker, E. A. & McClements, D. J. (2017). Utilisation of spontaneous emulsification to fabricate lutein-loaded nanoemulsion-based delivery systems: factors influencing particle size and colour. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(6), 1408–1416.
- Takeungwongtrakul, S. & Benjakul, S. (2012). Effect of Glucose Syrup and Fish Gelatin on Physicochemical Properties and Oxidative Stability of Spray-Dried Micro-Encapsulated Shrimp Oil, *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN, 1745-4549.

- Ton, N. M. N., Tran, T. T. T. & Le, V. V. M. (2016). Microencapsulation of rambutan seed oil by spray-drying using different protein preparations, *International Food Research Journal*, 23(1),123-128.
- Uluata, S., McClements, D. J. & Decker, E. A. (2015). Physical stability, autoxidation, and photosensitized oxidation of ω -3 oils in nanoemulsions prepared with natural and synthetic surfactants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(42), 9333-9340.
- Walker, R.M., Decker, E.A. & McClements, D.J. (2015). Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: effect of surfactant concentration and particle size. *Journal of Food Engineering*, 164,10-20.
- Zolgharnein, J., Shahmoradi, A. & Ghasemi, J.B. (2013). Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto Robinia tree leaves. *Journal of Chemometrics* , 27(1),12-20.